

©oso

Bulletin of the Japanese Association for Truffle Science

Volume 5, Issue 1, March 2022

Special Volume on *Elaphomyces* Part 1/2

Truffology

(日本地下生菌研究会会報)

第5巻1号(2022年3月)

ツチダンゴ属特集巻

Contents

(Volume 5, Issue 1, March 2022)

Preface

Takamichi Orihara: In celebration of publication of Truffology volume 5 (in Japanese) 1

Original peer-reviewed articles

Takamichi Orihara, Michael A. Castellano, Muneyuki Ohmae, Yoshinori Kaneko, Kentaro Hosaka:
Taxonomic re-examination and phylogeny of neglected Japanese black deer truffles, *Elaphomyces miyabeanus* and *E. nopporensis* (in English) 3

Kohei Yamamoto, Gen Sugawa, Keizo Takeda, Yousuke Degawa: *Tolypocladium bacillisporum*
(Ophiocordycipitaceae): A new parasite of *Elaphomyces* from Japan (in English) 15

Taiga Kasuya, Mihoko Uzawa, Kentaro Hosaka: *Scleroderma capeverdeanum*, a subhypogeous fungus
new to Japan, collected from the *Eucalyptus* plantation in Ibaraki Prefecture (in English) 23

Muneyuki Ohmae, Kohei Yamamoto, Akira Hashimoto, Moriya Ohkuma: First report of a hypogeous
basidiomycete, *Hymenogaster citrinus* (Agaricales, Hymenogastraceae) from Japan (in Japanese with
English abstract) 33

Specimen lists

Haruhiko Sakuraba, Mie Sakuraba: Truffles and truffle-like fungi collected in 2020 and 2021 in
Kagawa Prefecture (in Japanese) 41

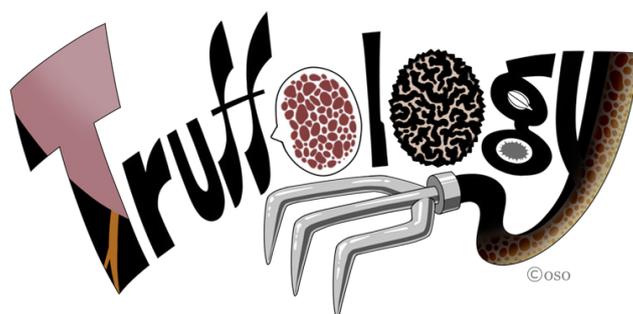
Norito Mori: Truffles and truffle-like fungi collected in 2020 and 2021 in Osaka Prefecture and the
adjacent areas (in Japanese) 47

Essays and other articles

oso sugiru: Encounter with *Elaphomyces appalachiensis* and its observation (in Japanese) 51

Hidehito Okada: Introduction to "Consumption of the ectomycorrhizal fungi *Rhizopogon roseolus*
and *R. luteolus* by *Chamaesyrrhus japonicus* (Diptera: Syrphidae)" (in Japanese) 55

Kentaro Hosaka, Hiromi Sasaki: Movie preview: The Truffle Hunters (in Japanese) 59



巻頭言 (Preface)

日本地下生菌研究会会報『Truffology』 発刊 5 周年に寄せて

In celebration of publication of Truffology volume 5

折原 貴道 (日本地下生菌研究会 会長)

Takamichi Orihara (President of the Japanese Association for Truffle Science)

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

Kanagawa Prefectural Museum of Natural History, 499 Iryuda, Odawara, Kanagawa 250-0031, Japan

E-mail: t_orihara@nh.kanagawa-museum.jp

Article Info: Submitted: 18 March 2022

Published: 31 March 2022

日本地下生菌研究会 (The Japanese Association for Truffle Science; JATS) は 2016 年に発足し、今年で 7 年目を迎えた。その間、地下生菌の研究の多面的発展や知識の普及を目的とする、世界的にもユニークな研究会として、地下生菌の野外観察会やオンライン同定会、会員による研究発表 (一般講演) やシンポジウム、メーリングリストでの会員同士の情報交換など、多様な活動を実施してきた。その成果もあり、会の発足時にはおよそ 30 名であった会員数は、6 年目となる 2021 年には 100 名を超え、現在も緩やかではあるが増加している。一般的な地上生きの菌類ではなく、地下生菌とその関連菌という、いわば少数派の菌類を主に扱う研究会として、この会員数の増加ペースは会の発足当初の想定を超えるものであった。

本研究会の行う事業の中でも、その中心に位置づけられるのが、オンラインで無料公開される本誌『Truffology (日本地下生菌研究会会報)』の発行である。本誌の目指すところは、第 1 巻第 1 号の巻頭言に詳述したように (折原, 2018)、査読付き原著論文だけでなく、より小規模で投稿の敷居も低い観察記録や、学術資料として残りにくい国内各地からの採集記録、それに加え地下生菌にまつわるエッセイなど、多様な性格の記事を集約するプラットフォームの役目を果たすことである。それにより、国内のローカルな知見から国際的発信力のある研究まで網羅し、かつプロの研究者もアマチュアの愛好家も隔てなく学術的に交流し、新たな知識を得る場として機能することが期待される。2018 年 3 月発行の第 1 巻 1 号から毎年 1 回の発行を継続し、2021 年の第 4 巻 1 号までに合計 31 の記事 (内訳: 原著論文 10、観察記録 7、普及記事 7、標本リスト 3、巻頭言 2、総説 1、訂正 1) が掲載された。これにより、国内の地下生菌に関する知見は飛躍的に増加し、上述の本誌の目的に対しある一定の

成果が得られたと言ってよいだろう。現状では、掲載記事は日本国内の地下生菌を対象としたものにはほぼ限られているが、英文による新種記載や新産種報告の記事なども含まれ、それらを通じて、徐々にではあるが本誌に対する国際的な認知も広まりつつある。

本誌は今年 (2022 年)、5 周年を迎え、山本航平編集長を中心とする新たな編集体制のもと、第 5 巻を発行する。新たな試みとして、第 5 巻では地下生子囊菌ツチダンゴ属 *Elaphomyces* Nees を特集し、本属に関連する複数の記事を取り上げる。本属については、国内では今井三子 (1900–1976)、小林義雄 (1907–1993) 両博士による古典的な分類の研究があるが、近年、世界的に多数の新種が記載され、国内での種多様性についても改めて着目されつつある分類群である。本特集が、日本におけるツチダンゴ属研究の新たな端緒となることを期待したい。

末筆になるが、本誌の出版・発行にあたり、継続的かつ献身的なご協力を賜った編集委員の木下晃彦博士、大和政秀教授、山本航平博士、およびオンライン出版にあたりご尽力いただいた本研究会ウェブページ担当の大前宗之氏にこの場を借りてお礼申し上げる。

引用文献

折原貴道 (2018) 日本地下生菌研究会の設立、および日本地下生菌研究会会報 “Truffology” 発刊を記念して—日本の地下生菌研究のこれまでとこれから—。Truffology 1: 2–4.

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

Taxonomic re-examination and phylogeny of neglected Japanese black deer truffles, *Elaphomyces miyabeanus* and *E. nopporensis*

クロツチダンゴ *Elaphomyces miyabeanus* およびコクロツチダンゴ *E. nopporensis* の分類学的再検討と系統

Takamichi Orihara^{1*}, Michael A. Castellano², Muneyuki Ohmae³, Yoshinori Kaneko⁴, Kentaro Hosaka⁵

折原 貴道^{1*}, Michael A. Castellano², 大前 宗之³, 金子 義紀⁴, 保坂 健太郎⁵

¹Kanagawa 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

²USDA, Forest Service, Northern Research Station, Corvallis, Oregon 97331, USA

³Hokken 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

⁴Yamakita-machi, Asigarakami-gun, Kanagawa, Japan
神奈川県足柄上郡山北町

⁴Department 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

*Corresponding author (主著者)

E-mail: t_orihara@nh.kanagawa-museum.jp

Abstract

Two Japanese black deer truffles, *Elaphomyces miyabeanus* and *E. nopporensis*, were described from Hokkaido in 1929 by Dr. Sanshi Imai. Since then, there have been no reliable, formal records of either species. Both species were collected from the same locality on the same day, and are morphologically similar to each other. We successfully located authentic specimens including syntypes of each species, which had been scattered and lost, and we critically examined their morphology. We also collected fresh ascomata of *E. miyabeanus* / *E. nopporensis* from the type locality and central Honshu. Based on examination of the rediscovered authentic specimens and the fresh ascomata along with the original descriptions by Dr. Sanshi Imai, we concluded that *E. nopporensis* was small, dried, old ascomata of *E. miyabeanus* and should be synonymized into the latter species. Phylogenetic analyses based on the internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal DNA placed *E. miyabeanus* within sect. *Ceratogaster* subsect. *Sclerodermei* along with *E. anthracinus*. The resultant tree also showed that *E. miyabeanus* was conspecific with *Elaphomyces* sp. collected in Norway, suggesting that the species is broadly distributed across northern Eurasia.

要旨

クロツチダンゴ *Elaphomyces miyabeanus* およびコクロツチダンゴ *E. nopporensis* は、今井三子博士により北海道から1929年に記載された黒色のツチダンゴ類である。しかし、新種記載以降、両種の確実な報告は無く、その実態は不明である。両種は同日、同一産地（現在の道立自然公園野幌森林公園付近）にて採集されており、形態的に酷似している。著者

らは北海道大学総合博物館および日本きのこセンター菌蕈研究所にて、両種のシントタイプを含む複数の標本を再発見した。さらに、タイプ産地および本州中部（山梨県）にて、両種と形態的特徴の一致する子実体を新たに採集した。これらの標本および原記載の情報から両種の形態的比較検討を行った結果、コクロツチダンゴ *E. nopporensis* は、乾燥の進んだ、古い小型のクロツチダンゴ *E. miyabeanus* 子実体であると結論した。核リボソーム rDNA ITS 領域に基づく分子系統解析の結果、*E. miyabeanus* はツチダンゴ属 *Ceratogaster* 節 *Sclerdermei* 亜節に含まれ、*E. anthracinus* に近縁であること、ノルウェー産の標本と同一種であることが示された。この結果から、本種はユーラシア大陸北部に広く分布していることが示唆された。

Article Info: Submitted: 8 February 2022 Accepted: 21 March 2022 Published: 31 March 2022

Introduction

The deer truffle genus, *Elaphomyces* T. Nees (Elaphomycetaceae, Eurotiales, Ascomycota) is one of the largest genera composed of truffle-like fungi. Currently, *Elaphomyces* comprises approximately 170 infrageneric taxa (according to the MycoBank database, searched on 3 January, 2022) both from the Northern and Southern Hemispheres. *Elaphomyces* spp. are ectomycorrhizal, which is exceptional in the Eurotiales, and some *Elaphomyces* spp. are also known as hosts of the fungicolous *Tolyocladium* spp.

In Japan, *Elaphomyces* has attracted attention by mycologists since very early in the taxonomic history of Japanese truffle-like fungi, mainly as hosts of mycoparasitic fungi (e.g., Kawamura, 1914; Kobayasi, 1960; Lloyd, 1916; Umemura, 1923; Yasuda, 1919). It was Dr. Sanshi Imai (1900–1976) who revealed a potentially high diversity of Japanese *Elaphomyces* spp. for the first time, describing five new species as well as the widely distributed *E. granulatus* Fr. and *E. variegatus* Vittad. (Imai, 1929, 1934, 1938, 1939). Of these, *E. miyabeanus* S. Imai (Japanese name: Kuro-tsuchidango) and *E. nopporensis* S. Imai (Japanese name: Kokuro-tsuchidango) are the first two black deer truffles described from Japan (Imai, 1929). Both species were collected several times from “Nopporo Forest” (i.e., Nopporo Forest Park as it is known today), Hokkaido Prefecture, on the same day. Some of those specimens were parasitized by *Tolyocladium jezoense* (S. Imai) Quandt, Kepler & Spatafora. Morphologically, both species appear similar but *E. miyabeanus* can be distinguished from *E. nopporensis* by having larger ascomata, a peridium with partial pyramidal warts and slightly larger ascospores (Imai, 1929). It should also be noted that only mature or old ascomata of *E. nopporensis* were collected by S. Imai.

Since the original description, there have been no reliable, formal records of either species although similar black truffles have been sporadically recorded as hosts of *T. jezoense* from Honshu (Shimizu, 1997). Also, it was not clear whether the type specimens of either species were extant. To clarify the true diversity of Japanese black *Elaphomyces* spp., we first need to know the taxonomic entity and phylogeny of the species based on the current systematic framework

of *Elaphomyces*. We therefore tried to locate authentic specimens of *E. miyabeanus* and *E. nopporensis* in several Japanese herbaria and made field surveys throughout Japan to locate fresh specimens of both species. As a result, we successfully located several herbarium specimens of *E. miyabeanus* and *E. nopporensis* collected by S. Imai and taxonomically re-evaluated the two species. Furthermore, we obtained fresh materials of *E. miyabeanus* from several localities and examined its phylogenetic position based on the internal transcribed spacer (ITS) region of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA).

Materials and methods

Taxon sampling and morphological observation

Authentic herbarium specimens of *E. miyabeanus* and *E. nopporensis* collected by S. Imai were investigated in Hokkaido University Museum (SAPA), National Museum of Nature and Science, Japan (TNS) and Tottori Mycological Institute (TMI). The specimens were photographed and were subjected to microscopic observation.

Field surveys were conducted in various types of forests in Hokkaido and Honshu. Fresh ascomata were collected using a garden rake and were photographed in the field. After morphological observation, the collected ascomata were air-dried for 2 days at 48°C or freeze-dried and then stored in sterile plastic bags. The specimens are deposited in Kanagawa Prefectural Museum of Natural History, Japan (KPM).

For light microscopy, hand-cut sections of dried specimens were presoaked in 70% ethanol and 3% KOH. After briefly rinsing out those sections with distilled water, they were mounted in lacto-glycerol. A MT5310L microscope (Meiji Techno Co., Ltd., Saitama, Japan) was used for the observation. Photomicrographs were captured using a WRAYMER NOA-2000 camera (WRAYMER Inc., Osaka, Japan). Measurement under the microscope was performed with MicroStudio software (WRAYMER Inc.). Measurement of spores includes outer ornamentation and an outermost layer if any. Scanning electron microscopy (SEM) was performed with a HITACHI TM-4000Plus Tabletop Microscope (Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan).

Small fragments of a dried gleba and spore mass were set on a sample stage with a double-sided carbon tape and were observed at 15 kV.

DNA extraction, PCR amplification and sequencing

DNA was extracted from peridial tissue of a fresh *E. miyabeanus* specimen (KPM-NC 29301) and dried, syntypes of *E. miyabeanus* deposited in TMI using the protocol of Izumitsu et al. (2012). PCR amplification of the ITS of nrDNA followed Orihara et al. (2012) with the exception of reducing the elongation time before the final elongation step to 60S. The primer pair used was ITS1F (Gardes & Bruns, 1993) / ITS4 (White et al., 1990). PCR amplification from the syntypes was not successful. Amplified PCR product was purified with Illustra™ ExoProStar™ (Cytiva, Tokyo, Japan) based on the manufacturer's instructions. Sequencing steps of Orihara et al. (2012) were followed.

Phylogenetic analyses

For the ITS dataset, we retrieved nucleotide sequences that covered all the taxa of sect. *Ceratogaster* shown in Paz et al. (2017) from the International Nucleotide Sequence Database (INSD). We also included sequences of unidentified *Elaphomyces* spp. and environmental sequences from ectomycorrhizal (ECM) roots hit by the BLAST search in the NCBI website (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). ITS sequences used for the phylogenetic analyses are listed in Table 1. Species in sect. *Ascoscleroderma* were selected for outgroups. The dataset was aligned with the online version of MAFFT version 7 (Kato & Standley, 2013) under default settings (i.e., the alignment algorithm is automatically selected from FFT-NS-1, FFT-NS-2, FFT-NS-i or L-INS-i). Subsequently, the sites with obvious alignment errors were manually adjusted in SeaView version 4 (Gouy et al., 2010). We referred to the results of the Gblocks option (Castresana, 2000) in SeaView to exclude ambiguously aligned sites for the following analyses.

Maximum likelihood (ML) analyses were performed with RAxML 8.2.10 (Stamatakis, 2014) and the online version of PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010). In the RAxML analysis, the best substitution model for the whole dataset was estimated by the Akaike Information Criterion (AIC) under jModelTest2 (Darriba et al., 2012; Guindon & Gascuel, 2003). The ITS dataset was partitioned into partial 18S-5.8S-partial 28S and ITS1-ITS2 so that different α -shape parameters, GTR rates, and empirical base frequencies could be assigned to each partition. RAxML analysis was conducted under the GTR+G model with rapid bootstrap replicates set to 1000. PhyML analysis was implemented under default settings with the GTR+G model, which was automatically estimated as a best-fit model based on the SMS

algorithm (Lefort et al., 2017). For calculating branch supports in this analysis, the SH-like approximate likelihood-ratio test (SH-aLRT; Anisimova & Gascuel, 2006) was conducted instead of bootstrapping.

Bayesian analyses were conducted with MrBayes 3.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). The ITS dataset was partitioned in the same pattern as in RAxML analysis, and the resultant two partitions were independently subjected to a substitution-model estimation using jModelTest2 under AIC. The K80+I+G was selected as the best-fit model for the partial 18S-5.8S-partial 28S, and GTR+G was for the ITS1-ITS2 partition. Bayesian posterior probabilities (PPs) were estimated by the Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo method (Geyer, 1991). The two parallel runs were conducted with one cold and seven heated chains each for 3M generations. Temperature parameter of the seven heated chains in both runs was set to 0.20 (as a default). Trees were saved to a file every 1000th generation. We determined that the two runs reached convergence when the average standard deviation of split frequencies (ASDSF) was continuously lower than 0.01. The ASDSF was monitored every 5000 generations. Trees obtained before reaching convergence were discarded as the burn-in, and the remaining trees were used to calculate a 50% majority consensus topology and to determine PP values for individual branches.

Results

Investigation of old *Elaphomyces* specimens in the mycological herbaria

In November 2017, three of the authors (i.e., T. Orihara, M.A. Castellano and K. Hosaka) intensively searched old, unsorted specimens of truffle-like fungi deposited in SAPA, and we found one *E. miyabeanus* specimen parasitized by *Tolypocladium jezoense* (= *Cordyceps jezoensis* S. Imai) and one *E. nopporensis* specimen, both of which were collected and identified by S. Imai (Fig. 1A–C). The former was one of the syntypes of *T. jezoense* and the earliest record of both *E. miyabeanus* and *T. jezoensis* known today. The latter was one of the syntypes of *E. nopporensis*. The first author subsequently searched old specimens collected by S. Imai in TMI in November 2018, and found several additional specimens identified as *E. miyabeanus* and *E. nopporensis* including syntypes of both species (Fig. 1D–I). All of these dried specimens in SAPA and TMI were preserved in good condition. We could not find any specimens of *E. miyabeanus* and *E. nopporensis* in TNS.

Field sampling of fresh ascomata

We conducted field samplings several times in the type locality of *E. miyabeanus* and *E. nopporensis* (i.e., the Nopporo Forest Park,

Table 1. INSD (GenBank) accession numbers of the ITS sequences used for the phylogenetic analyses (UECM: uncultured ectomycorrhizal roots)**表 1.** 分子系統解析に用いた ITS 領域塩基配列の INSD (GenBank) 登録番号

Taxa	Locality	Voucher no.	Reference	ITS acc. no.
<i>E. aculeatus</i>	SPAIN, Asturias	IC 27111115 (Herb. pers. A. Paz)	Paz et al. (2017)	KX238821
<i>E. aculeatus</i>	SPAIN, Asturias	IC 10041103 (Herb. pers. A. Paz)	Paz et al. (2017)	KX238844
<i>E. anthracinus</i>	NORWAY, Vestland Co., Stord	O-F-22176	Unpubl. data by Larsson, E. and Molia, A.	KR029773
<i>E. anthracinus</i>	NORWAY, Vestland Co., Stord	O-F-22177	Unpubl. data by Larsson, E. and Molia, A.	KR029774
<i>E. anthracinus</i>	SPAIN, Cantabria	LIP-0001144 (lectotype)	Paz et al. (2017)	KX238803
<i>E. anthracinus</i>	SPAIN, Cantabria	Herb. pers. A. Paz	Paz et al. (2017)	KX238804
<i>E. anthracinus</i>	SPAIN, Cantabria	Herb. pers. A. Paz	Paz et al. (2017)	KX238813
<i>E. anthracinus</i> f. <i>talosporus</i>	SPAIN, Asturias	LIP-0001145 (holotype)	Paz et al. (2017)	KX238805
<i>E. foetidus</i>	SPAIN, Caceres	LIP-0001138 (epitype)	Paz et al. (2017)	KX238797
<i>E. leonis</i>	SPAIN, Cantabria	IC 14111101 (Herb. pers. A. Paz)	Paz et al. (2017)	KX238814
<i>E. leucosporus</i>	SPAIN, Cantabria	IC 24051203 (Herb. pers. A. Paz)	Paz et al. (2017)	KX238816
<i>E. leveillei</i>	SPAIN, Asturias	LIP-0001148 (epitype)	Paz et al. (2017)	KX238856
<i>E. maculatus</i>	SPAIN, Cantabria	LIP-0001149	Paz et al. (2017)	KX238799
<i>E. moretii</i> var. <i>echinatus</i>	NORWAY, Vest-Agder	IC 27091306 (Herb. pers. A. Paz)	Paz et al. (2017)	KX238854
<i>E. persoonii</i>	SPAIN, Cantabria	IC 18031201 (Herb. pers. A. Paz)	Paz et al. (2017)	KX238828
<i>E. septatus</i>	SPAIN, Cantabria	IC 10041107 (Herb. pers. A. Paz)	Paz et al. (2017)	KX238807
<i>E. spirosporus</i>	SPAIN, Caceres	LIP-0001152 (holotype)	Paz et al. (2017)	KX238796
<i>E. virgatosporus</i>	SPAIN, Asturias	IC 26051213 (Herb. pers. A. Paz)	Paz et al. (2017)	KX238811
<i>E. iuppitercellus</i>	CAMEROON, East Province	M3 (from an ECM root tip)	Castellano et al. (2016)	KT694140
<i>E. miyabeanus</i>	JAPAN, Yamanashi Pref., Narusawa Village	KPM-NC 29301	This study	OM286885
<i>Elaphomyces</i> sp.	MEXICO, Mexico State, Temascaltepec	GO-2009-040	Unpubl. data by Garibay Orijel, R. and Pina Paez, C.	KJ594995
<i>Elaphomyces</i> sp.	MEXICO, Mexico State, San Simon de Guerrero	GO-2009-028	Unpubl. data by Garibay-Orijel, R. and Pina Paez, C.	KJ594996
<i>Elaphomyces</i> sp.	ROMANIA, ECM of <i>Quercus robur</i>	LM 2779	Suz et al. (2014)	KM576390
<i>Elaphomyces</i> sp.	USA	FLAS_AC727	Unpubl. data by Corrales, A. et al.	MH496798
<i>Elaphomyces</i> sp.	PANAMA	AC-2017a	Unpubl. data by Corrales, A. et al.	KY825739
<i>Elaphomyces</i> sp.	USA, FL	FLAS-F-60353	Unpubl. data by Richter, B. et al.	MF074844
<i>Elaphomyces</i> sp.	USA, FL	FLAS-F-61848	Unpubl. data by Kaminsky, B. et al.	MH399885
<i>Elaphomyces</i> sp. (sp. 6)	NORWAY, Viken, Ullensaker	O-F-22082	Unpubl. data by Larsson, E. and Molia, A.	KR029769
<i>Elaphomyces</i> sp. (sp. 6)	NORWAY, Oslo fylke, Oslo	O-F-245336	Unpubl. data by Larsson, E. and Molia, A.	KR029770
<i>Elaphomyces</i> sp. (sp. 6)	NORWAY, Viken, Ringerike	O-F-245524	Unpubl. data by Larsson, E. and Molia, A.	KR029771
UECM of <i>Quercus crispula</i>	JAPAN	M0400	Unpubl. data by Ishida T. A. et al.	KC791026
UECM of <i>Quercus kelloggii</i>	USA, CA, Riverside County, James Reserve	JR9	Unpubl. data by Taniguchi et al.	KC791026

Hokkaido Pref.). On 1 October 2018, one of the authors (M. Ohmae) collected a single overmature ascoma that was morphologically identical to *E. nopporensis* (Fig. 2A): the ascoma had a rough, black peridium that became papery due to dehydration and over-maturity, and a shrunken blackish gleba. Subsequently, additional old ascomata were collected at a different site in the type locality on 22 Sep. 2019. Trials of ITS sequencing from both specimens failed.

We also collected ascomata that were morphologically identical

to *E. miyabeanus* from a subboreal coniferous forest in Yamanashi Prefecture, central Honshu (Fig. 2D–H). ITS sequence was successfully obtained from this specimen (KPM-NC 29301; Table 1) and subjected to the following phylogenetic analyses. Additionally, we collected black *Elaphomyces* ascomata that appeared very similar to *E. miyabeanus* from Ehime Prefecture, Shikoku (KPM-NC 29304), but this specimen was different from *E. miyabeanus* in the ascospore morphology (Fig. 2I; see “Notes” below for more details).



Fig. 1. Authentic specimens of *E. miyabeanus* and *E. nopporensis* recorded in Imai (1929) and rediscovered from SAPA and TMI herbaria. A–C: SAPA specimens of *E. miyabeanus* parasitized by *Tolypocladium jezoense* (upper of A and B; syntype of *T. jezoense* [Imai, 1929]) and *E. nopporensis* (lower of A and C; isosyntype of *E. nopporensis*). D–I: TMI specimens Newly designated lectotype of *E. miyabeanus* (D [middle], E, G; TMI 37400) and one of the syntypes of *E. nopporensis* (F, H, I; TMI 37401). Both of the specimens were collected by Dr. S. Imai on 4 July 1926. G: Ascospores of *E. miyabeanus*. H: Ascospores of *E. nopporensis*. Note that the outer warty spore walls and the inner cores are separated in most ascospores. I: SEM photomicrograph of partially angular ascospore (right) of *E. nopporensis* and remnants of spore walls (arrows). Bars: E–F = 1 cm; G–H = 20 µm; I = 10 µm.

図 1. Imai (1929) における記載に用いられたクロツチダンゴ *E. miyabeanus* およびクロツチダンゴ *E. nopporensis* 標本（北海道大学総合博物館 [SAPA] および日本きのこセンター菌茸研究所 [TMI] 所蔵）。A–C: SAPA 所蔵のエゾハナヤスリタケ *Tolypocladium jezoense* に寄生された *E. miyabeanus* 標本（A 上部および B；本標本は *Tolypocladium jezoense* のシントタイプに相当）および *E. nopporensis* 標本（A 下部および C；本標本は *E. nopporensis* のアイソシントタイプに相当）。D–I: 新たにレクトタイプ指定された TMI 所蔵の *E. miyabeanus* 標本（D [中央], E, G; TMI 37400）および *E. nopporensis* シントタイプ標本（F, H, I; TMI 37401）。いずれも今井三子博士により 1926 年 7 月 4 日採集。G: *Elaphomyces miyabeanus* 子嚢胞子。H: *Elaphomyces nopporensis* 子嚢胞子。多くの胞子において、短い刺状突起に覆われた胞子外壁と、その内部の胞子中心部が分離している。I: *Elaphomyces nopporensis* の一部角張った子嚢胞子（右側）および胞子外壁の残骸（矢印）の SEM 画像。

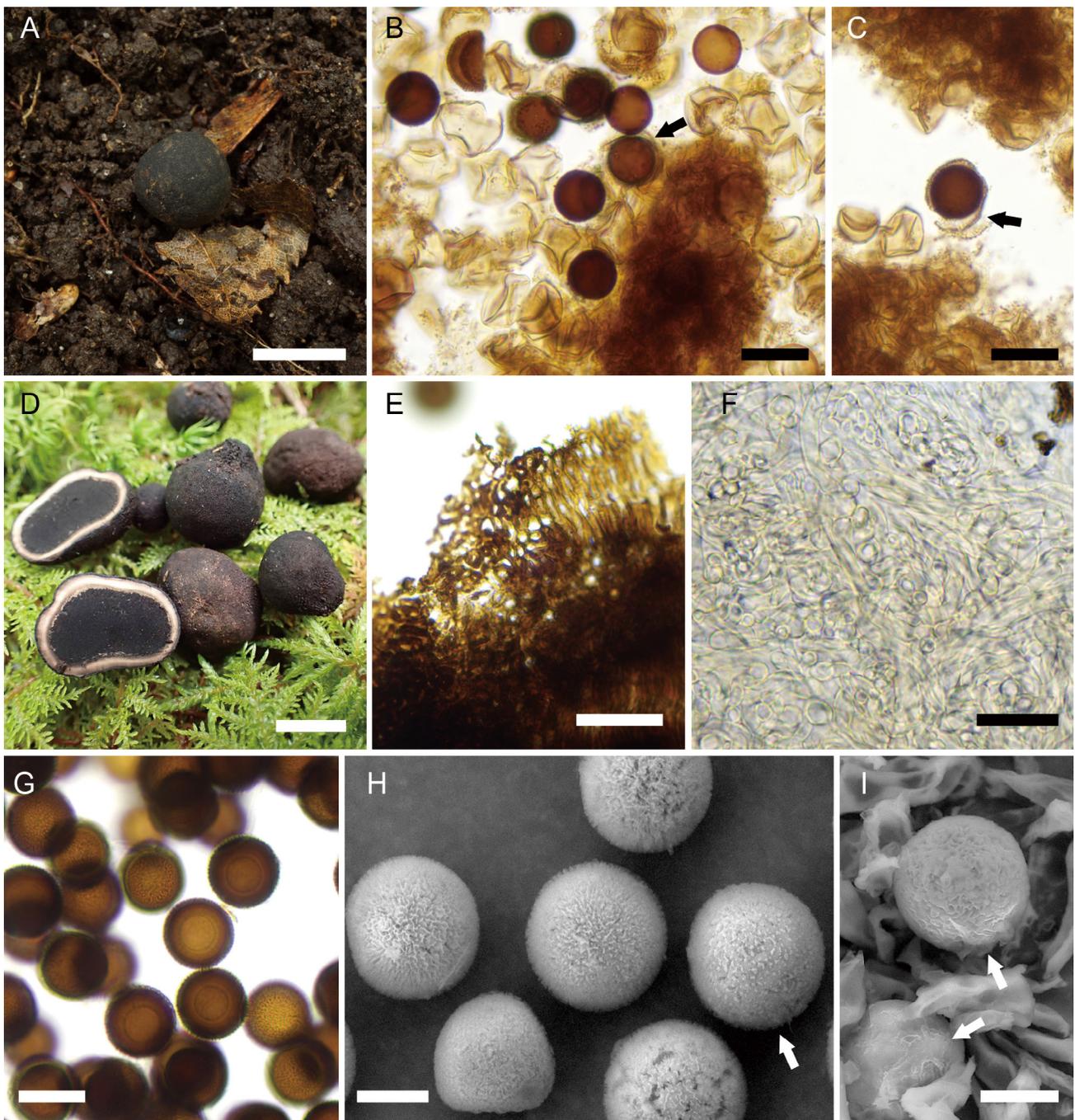


Fig. 2. A–C: *Elaphomyces nopporensis* (= small, old, dried ascoma of *E. miyabeanus*) newly collected from the type locality (KPM-NC 25100). A: Ascoma. B–C: Ascospores; in most ascospores the outer exosporium was shrunken and separated from the inner dark brown core (arrows). D–H: Newly collected *E. miyabeanus* specimens (KPM-NC 29301). D: Ascomata. E: Peridiopellis. F: Inner peridial tissue. G: Ascospores. H: Ascospores in various developmental stages under SEM. Immature ascospores are covered with an evanescent, plate-like, warty layer (arrow). I: SEM photomicrograph of an ascospores of *E. anthracinus* collected from Japan (KPM-NC 29304). Arrows indicate evanescent, outermost veil-like materials. Bars: A, D = 1 cm; B–C, E–G = 20 μm, H–I = 10 μm.

図 2. A–C: タイプ産地(野幌森林公園)で発生が確認されたクロコッチダング *E. nopporensis* (*E. miyabeanus* の乾燥した小型の老菌) 標本 (KPM-NC 25100). A: 子嚢果. B–C: 子嚢胞子. ほとんどの子嚢胞子で胞子外壁が収縮し、内部の暗褐色の胞子中心部と分離していることが確認される (矢印). D–H: 本研究において新たに採集されたクロコッチダング *E. miyabeanus* 標本 (KPM-NC 29301; 山梨県南都留郡鳴沢村産). D: 子嚢果. E: 最外殻皮. F: 殻皮実質の菌糸. G: 子嚢胞子. H: 様々な成熟段階の子嚢胞子の SEM 画像. 未熟な胞子はいぼ状突起のある消失性の胞子最外層に覆われる (矢印). I: 日本産 *E. anthracinus* 子嚢胞子の SEM 画像 (KPM-NC 29304; 愛媛県北宇和郡鬼北町産). 矢印は消失性の胞子最外膜を示す.

Phylogenetic analyses

The ITS dataset was composed of 607 aligned nucleotide positions and contained 32 sequences in total, including newly generated sequence of *E. miyabeanus* specimen (KPM-NC 29301; GenBank accession no.: OM286885). In the RAxML analysis, the final ML optimization of log likelihood (lnL) was -3510.721128. In the PhyML analysis, the final lnL was -3570.619692. In the Bayesian inference, the two parallel runs reached convergence after ca. 1.9M generations. Accordingly, we discarded the first 1900 trees in each run, and the remaining 1101 trees in each run were summarized to approximate

Bayesian PPs. The total arithmetic and harmonic mean of estimated marginal lnL for runs were -3456.18 and -3490.43, respectively.

The resulting overall ML and Bayesian topologies were identical although statistic support of some branches varied considerably among the three methods (i.e., MLBS/SH-aLRT/PP). We therefore show only the RAxML tree (Fig. 3). The tree mostly recovered overall relationships within *Elaphomyces* sect. *Ceratogaster* shown by Paz et al. (2017) with some minor exceptions (e.g., the relationships among *E. aculeatus* Vittad., *E. virgatosporus* Hollós and *E. anthracinus* Vittad. clades). The *E. miyabeanus* specimen from Yamanashi Pref.,

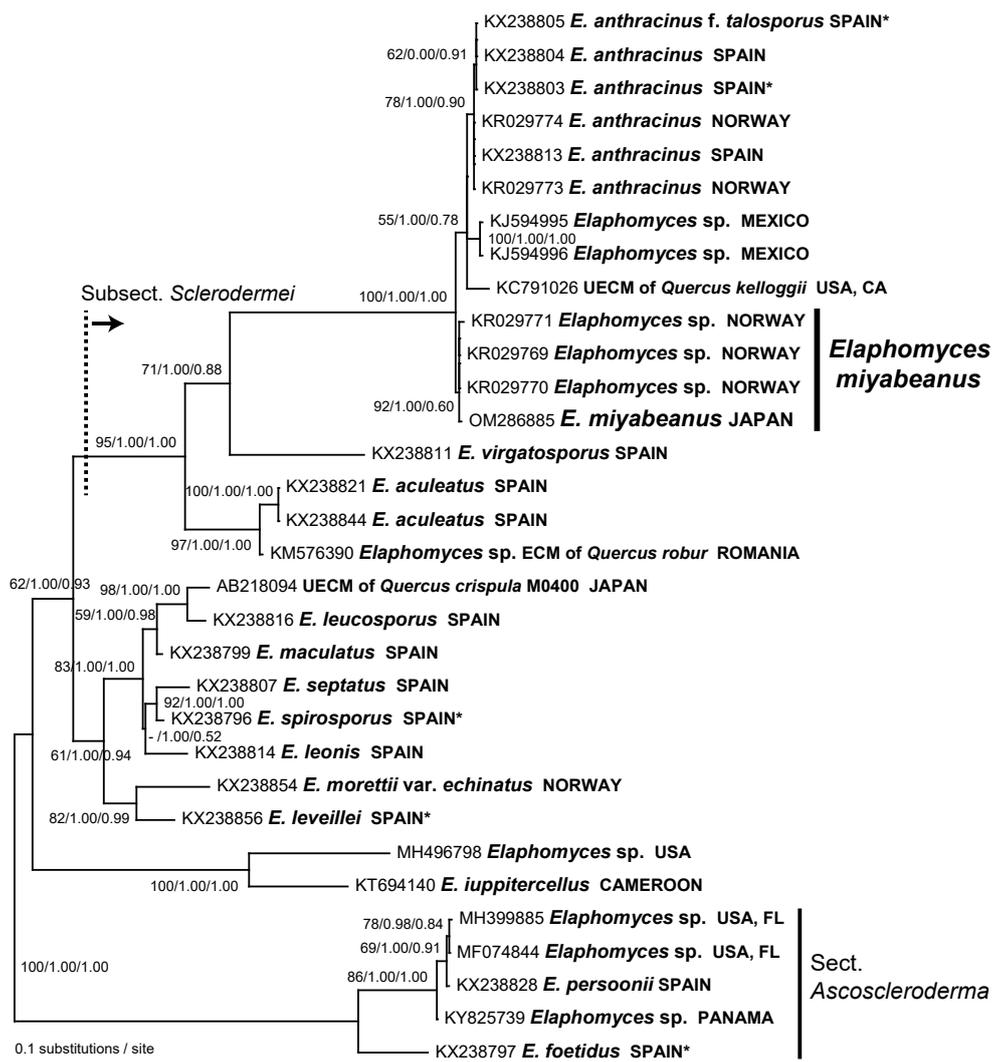


Fig. 3. RAxML Maximum likelihood (ML) tree of *Elaphomyces* sect. *Ceratogaster* based on the nuclear rDNA ITS dataset. Sequence of *E. miyabeanus* specimen (OM286885) was generated for this study. Values of RAxML rapid bootstrapping (MLBS), the SH-aLRT test by PhyML and Bayesian PPs are designated above or below branches or at nodes (MLBS/SH-aLRT/PP). The GenBank accession numbers are shown followed by taxon names as registered in GenBank. Sequences from holotype, lectotype or epitype specimens are indicated as asterisks (*). Species of *Elaphomyces* sect. *Ascoscleroderma* are selected as outgroups. UECM: uncultured ectomycorrhizal root.

図 3. 核 rDNA ITS 領域のデータセットに基づく、RAxML によるツチダンゴ属 *Ceratogaster* 節の最尤系統樹。クロツチダンゴ *E. miyabeanus* 標本から新たに得られた配列 (OM286885) を含む。RAxML 高速ブートストラップ法 (MLBS), PhyML による SH 補正近似尤度比検定 (SH-aLRT test), およびベイズ事後確率 (PP) の値を各分岐に示す (MLBS/SH-aLRT/PP)。本節の姉妹群に相当する、ツチダンゴ属 *Ascoscleroderma* 節に含まれる種を外群に用いた。UECM: uncultured ectomycorrhizal root.

Japan was placed within sect. *Ceratogaster* subsect. *Sclerodermei* (Vittad.) Bellanger & P.-A. Moreau and was shown to be closely related to European *E. anthracinus*, *Elaphomyces* sp. from Mexico and an environmental ECM sample from the USA. The ITS1-5.8S-ITS2 nucleotide identities between *E. miyabeanus* and *E. anthracinus* were 95.46% (589 bp / 617 bp; query coverage: 100%). *Elaphomyces miyabeanus* formed a species-level clade with unidentified *Elaphomyces* sp. sequences from Norway (i.e., “*Elaphomyces* sp. 6” according to the taxon-name label by Larsson E. & Molia A.) although the support by Bayesian PP was unexpectedly low (i.e., PP = 0.60). The ITS1-5.8S-ITS2 nucleotide identities between *E. miyabeanus* and one of “*Elaphomyces* sp. 6” were 98.54% (608 bp / 617 bp; query coverage: 100%).

Taxonomy

Taxonomic relationship between *E. miyabeanus* and *E. nopporensis*

Imai (1929) noted that he repeatedly collected *E. miyabeanus* and *E. nopporensis* on the same days in the same locality (“Nopporo Forest”). However, the number of *E. nopporensis* specimens were relatively small, and no young ascomata of the species were found (Imai, 1929). The peridium of the species is papery, which is a typical character of dried, old ascomata of black deer truffles, and the surface of both species are more or less rough although in *E. miyabeanus* large pyramidal warts partially remain on the apical or rarely on the basal part (Imai, 1929). According to Imai (1929), the ascospores of *E. nopporensis* are smaller than those of *E. miyabeanus* but their sizes overlap within the range of those of *E. miyabeanus* (i.e., 15–17.5 μm in *E. nopporensis* vs. 15–22 μm in *E. miyabeanus*).

Our observation of the rediscovered syntypes of both the species confirmed that the descriptions by Imai (1929) were mostly accurate, except for the ascospore size of *E. nopporensis*. In some ascomata the ascospores were shrunken and the exosporium and outermost ornamentation were often collapsed or separated from the inner core. As a result, many of the remaining ascospores were smaller in size than those of the *E. miyabeanus* specimens, but in well-preserved ascomata of *E. nopporensis* the ascospore size was larger than the original description and close to that of *E. miyabeanus* (i.e., 15.2–21.9 μm ; n = 30).

As noted above, the newly collected ascomata from the type locality (KPM-NC 25100, 27903) represented typical macroscopic features of *E. nopporensis*. Similar to the *E. nopporensis* syntypes, in most ascospores the outermost spore wall was shrunken and separated from the inner spore core (Fig. 2B–C). In other cases, ascospores looked heavily depressed or somewhat angular, or only the outermost layer remained (Figs. 1H–I, 2B).

Based on these observations, we conclude that *E. nopporensis* is a small, dried, old, overmature ascoma of *E. miyabeanus* and should be synonymized into the latter species. The characteristic large warts on the surface of *E. miyabeanus* ascomata apparently fall off on old ascomata (= *E. nopporensis*) or are absent on smaller ascomata. We herein designate lectotype of *E. miyabeanus* from the syntype specimens preserved in TMI. The lectotype specimen (TMI 37400), which was collected on 4 July 1926 by S. Imai, consists of many ascomata of various developmental stages and is morphologically one of the most well-preserved syntype specimens. Although we successfully obtained an ITS sequence from the specimen collected from central Honshu (KPM-NC 29301), we will not designate epitype of *E. miyabeanus* until fresh ascomata in good condition with its nucleotide sequences including the barcoding region are obtained near the type locality.

***Elaphomyces miyabeanus* S. Imai**, Transactions of the Sapporo Natural History Society 11: 35 (1930).

[MycoBank ID: 271439]

= *Elaphomyces nopporensis* S. Imai, Transactions of the Sapporo Natural History Society 11: 36 (1930).

[MycoBank ID: 272439].

Figs. 1, 2A–H.

Lectotype (designated here!): JAPAN, Hokkaido Pref., Ishikari Prov., Nopporo Forest (the present Nopporo Forest Park), 4 Jul. 1926, S. Imai, TMI 37400 [MycoBank Typification ID: 10006470].

Description: Ascomata solitary or gregarious, 3–30 mm in diam., rigid, hard, globose to subglobose, often with a slight apical projection and irregular depression, surface black, almost smooth to the naked eye but more or less rough under loupe or stereomicroscope, often with pyramidal-obtuse warts around the apical projection and basal depression. Mycelia on the surface of ascomata inconspicuous. Outer peridium thin, up to 0.4 mm thick, black, rigid, fragile, separable from inner peridium. Inner peridium up to 2 mm thick, off-white to pale brown with a reddish tinge, more or less firm, rubbery, evanescent when dry and overmature. Gleba filled with a black spore mass with white sterile veins running more or less radially. The outermost part of gleba appears as a pale reddish brown hyphal layer. Spore mass more or less firm when immature, becoming powdery at maturity. Odor not distinct.

Outer peridium and warts of thick-walled (0.7–3 μm), filamentous or palisade-like, dark brown hyphae 2.5–5.5 μm broad and firmly adherent to one another, running in several directions. Inner peridium of whitish to pale brown, filamentous hyphae 2.5–10 μm broad, running perpendicularly in two directions, walls 0.6–1.5 μm thick.

Global hyphae of densely interwoven, evanescent, partially inflated, dark brown, thin-walled (<1.1 µm) filamentous hyphae 3–10 µm broad, with inflated, clavulate, terminal cells. Asci not seen, but Imai (1929) described them as 8-spored. Ascospores 15.2–25.5 µm in diam. including ornamentation (average size in lectotype: 21.8 µm; standard deviation: 1.57 [n = 50]), globose, composed of multiple wall layers: outermost walls 0.8–2 µm thick, dark brown, surface finely reticulate under SEM, densely covered with blunt to acute spines 0.6–2.5(–3) µm long partially adhered to each other to form a minute, incomplete reticulum, often collapsed or separated from the inner wall in old, overly dried specimens; in young ascospores the spiny ornamentation is completely or partially covered with evanescent, plate-like, warty layer; inner walls 4–5 µm thick, apparently composed of 4–5 layers, but sometimes not distinct especially in old, overmature specimens, dark to medium brown.

Habitat, distribution and season: mostly hypogeous but occasionally sub-epigeous under various ectomycorrhizal tree species such as *Quercus* spp. and *Abies veitchii*; Japan and Norway, but potentially broadly distributed across northern Eurasia; summer to winter.

Japanese name: *Kuro-tsuchidango* (“kuro” = black, “tsuchidango” = deer truffle in Japanese).

Other specimens examined: JAPAN, Hokkaido Pref., Ishikari Prov., Nopporo Forest (the present Nopporo Forest Park), parasitized by *T. jezoense*, 8 Oct. 1923, *S. Imai*, deposited in SAPA; *ibid*, 15 Nov. 1925, *S. Imai*, TMI 37402; *ibid*, 4 Jul. 1926, *S. Imai*, a syntype of *E. nopporensis*, TMI 37401 (duplicate in SAPA); *ibid*, parasitized by *T. jezoense*, 7 Oct. 1927, *S. Imai*, a syntype of *E. nopporensis*, TMI 37403; *ibid*, 21 Oct. 1928, *S. Imai*, TMI 37404; *ibid*, parasitized by *T. jezoense*, 17 Oct. 1929, *S. Imai*, TMI 37405; *ibid*, 30 Oct. 1938, *S. Imai*, TMI 37406; Ebetsu-shi, Nishi-nopporo, Nopporo Forest Park, under *Quercus crispula*, 1 Oct. 2018, *M. Ohmae*, KPM-NC 25100; Sapporo-shi Atsubetsu-ku, Atsubetu-cho-konopporo, Nopporo Forest Park, near Hokkaido Museum and the Centennial Memorial Tower, under *Q. crispula*, 22 Sep. 2019, *S. Hatakeyama*, KPM-NC 27903; Yamanashi Pref., Narusawa Village, northeastern slope of Mt. Fuji, under *Abies veitchii*, alt. ca. 2100 m, 19 Sep. 2021, *Y. Kaneko*, KPM-NC 29301.

Notes: We also collected several black ascomata that appeared quite similar to *E. miyabeanus* from Ehime Prefecture (Kitauwa-gun Kihoku-cho, Narukawa Gorge, under *Castanopsis cuspidata* and *Quercus* spp., 13 Dec. 2021, *T. Teramoto*, *T. Orihara* & *K. Yamamoto*, KPM-NC 29304). The ascomata were 10–22 mm in diam., and the surface was almost smooth to the naked eye and lacked large warts. Ascospores were almost the same in size as *E. miyabeanus* ascospores (i.e., 18.5–23.1 µm; average 20.5 µm [n = 25]), but SEM observation

revealed that the ascospores had a nearly complete reticulum fully or partially covered with an evanescent veil-like material (Fig. 2I). Those characters match well with the description of the *E. anthracinus* by Castellano et al. (2017). We therefore tentatively identify the specimen KPM-NC 29304 as *E. anthracinus*.

Discussion

Taxonomy of black *Elaphomyces* species, which mostly belong to sect. *Ascoscleroderma* (Clémencet) Bellanger & P.-A. Moreau, *Ceratogaster* and *Malacodermei* (Vittad.) Tul. & C. Tul., have long been neglected in Japan since Kobayasi (1960) despite the recent remarkable progress on global biodiversity of *Elaphomyces* (e.g., Castellano et al., 2011, 2012a, b, c, 2016, 2018, 2021; Paz et al., 2017). However, Hatakeyama & Orihara (2020) reported *E. asahimontanus* Kobayasi, currently endemic to Japan, for the first time since Kobayasi (1960), and gave detailed morphology and ecology of the species. In this study, we focused on two historically forgotten black deer truffles, *E. miyabeanus* and *E. nopporensis*, and concluded that they were identical species. It should be noted that both species had not been collected for more than 80 years. Most known Japanese *Elaphomyces* spp. were described more than a half century ago, and require critical reassessment and modern descriptions to incorporate them into the current framework of *Elaphomyces* systematics. This study is an important step to understand the diversity of black *Elaphomyces* species in East Asia.

Both *E. miyabeanus* and *E. nopporensis* were originally described by Imai (1929). They were, therefore, published on the same date and have equal taxonomic priority (cf. Article 11.5 of the current version of the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants [Shenzhen Code, 2018]; https://www.iapt-taxon.org/nomen/pages/main/art_11.html). We adopt the name *E. miyabeanus* for the combined species because *E. nopporensis* is only represented by an overly dried, old ascomata and does not represent its typical morphology. As a result, *E. miyabeanus* will be treated as having a priority over *E. nopporensis* according to Article 11.5 of the Shenzhen Code.

Elaphomyces miyabeanus shares many morphological characteristics with *E. anthracinus* such as an almost smooth black peridial surface, blackish spore mass, medium-sized ascospores (20–24 µm) with low ornamentation (Castellano et al., 2018). However, *E. miyabeanus* differs from the latter species in the peridium being partially covered with large, pyramidal warts and the ascospore ornamentation forming an incomplete reticulation or more or less isolated spines. In addition, the young ascospores of *E. miyabeanus* are covered with a plate-like, warty layer (Fig. 2H). Our ITS phylogeny also supported that

these two species were closely related but genetically distinct (Fig. 3). Kobayasi (1960) and Japanese Society of Cordyceps Research (2014) recorded *E. anthracinus* from Japan, but they did not provide a detailed morphological description. We collected ascomata morphologically identical to *E. anthracinus* from Ehime Prefecture, Japan, and confirmed that *E. anthracinus* and *E. miyabeanus* are morphologically distinguishable (Fig. 2I).

Paz et al. (2017) proposed *E. anthracinus* f. *talosporus* A. Paz & Lavoise for the *E. anthracinus* specimens that have globose-polyhedral ascospores, but no particular genetic divergence was found between the two forms. As noted above, the ascospores of dried, old ascomata of *E. miyabeanus* in poor condition tend to become somewhat angular-polyhedral or shrunk. We consider that this tendency is not related to genetic divergence, but could be caused by several environmental and/or biological factors. For example, such shrinkage may be caused by the parasitism by *T. jezoence* because the glebal hyphae of *E. nopporensis* are often intermingled with alien, off-white hyphae (Fig. 1F). It is quite possible that morphology of *E. anthracinus* ascospores are also heavily influenced by environmental and/or biological factors. Critical observation of the ascospores of *E. anthracinus* f. *talosporus* in relation to ascomata conditions will be necessary to clarify the cause of the spore deformation.

The ITS phylogeny indicates that *E. miyabeanus* is potentially conspecific with *Elaphomyces* sp. from Norway (Fig. 3). Paz et al. (2017) previously reported that those Norwegian specimens were genetically divergent from *E. anthracinus* s.str. However, they tentatively retained them within *E. anthracinus* (as “*E. anthracinus* f. *talosporus*” presumably based on the morphology of the shrunken, irregular-shaped ascospores) because they could not ascertain any distinct species-level morphological difference. Additional Japanese records of *E. miyabeanus* are from both deciduous broad-leaved and coniferous forests in subboreal regions. These results suggest that *E. miyabeanus* may be widespread in northern Eurasia, and is possibly misidentified as more widely known *E. anthracinus*. This is an interesting example that clarifying the entities of historically overlooked truffle-like fungi in Asia can sharpen our understanding of the distribution and systematics of another taxon in a different region of the world.

Acknowledgements

We are grateful to Sota Hatakeyama, Fumitaka Nagao, Saori Orihara, Tatsumi Teramoto and Kohei Yamamoto for providing valuable specimens or helping our field surveys. Kohei Yamamoto also kindly shared some photos of *E. anthracinus* collected from Ehime Pref. with us (KPM-NC 29304). Takahito Kobayashi and Shuji Ushijima

kindly helped our search for herbarium specimens at SAPA and TMI, respectively. This study was financially supported by JSPS KAKENHI Grant-in-Aid for Young Scientists (B) (nos. 17K15184), JSPS KAKENHI Grants 24680085, 20K06805 and the Grant-in-Aid from Institute for Fermentation, Osaka (IFO). Additional fieldwork and other research activities were financially supported by JSPS Invitation Fellowship for Research in Japan (Short-term) to MAC.

References

- Anisimova M., Gascuel O. (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic Biology* 55: 539–552.
- Castellano M.A., Beever R.E., Trappe J.M. (2012a) Sequestrate fungi of New Zealand: *Elaphomyces* (Ascomycota, Eurotiales, Elaphomycetaceae). *New Zealand Journal of Botany* 50: 423–433.
- Castellano M.A., Crabtree C.D., Mitchell D, Healy R.A. (2021) Eight new *Elaphomyces* species (Elaphomycetaceae, Eurotiales, Ascomycota) from eastern North America. *Fungal Systematics and Evolution* 7: 113–131.
- Castellano M.A., Dentinger B.T.M., Séné O., Elliott T.F., Truong C., Henkel T.W. (2016) New species of *Elaphomyces* (Elaphomycetaceae, Eurotiales, Ascomycota) from tropical rainforests of Cameroon and Guyana. *IMA Fungus* 7: 59–73.
- Castellano M.A., Elliott T.F., Trappe J.M. (2018) Three new black *Elaphomyces* species (Elaphomycetaceae, Eurotiales, Ascomycota) from eastern North America with notes on selected European species. *Fungal Systematics and Evolution* 1: 1–12.
- Castellano M.A., Guerrero G.G., Jiménez J.G., Trappe J.M. (2012b) *Elaphomyces appalachiensis* and *E. verruculosus* sp. nov. (Ascomycota Eurotiales, Elaphomycetaceae) from eastern North America. *Revista Mexicana de Micología* 35: 17–22.
- Castellano M.A., Henkel T.W., Miller S.L., Smith M.E., Aime M.C. (2012c) New *Elaphomyces* species (Elaphomycetaceae, Eurotiales, Ascomycota) from Guyana. *Mycologia* 104: 1244–1249.
- Castellano M.A., Trappe J.M., Vernes K. (2011) Australian species of *Elaphomyces* (Elaphomycetaceae, Eurotiales, Ascomycota). *Australian Systematic Botany* 24: 32–57.
- Castresana J. (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17: 540–552.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- 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.
- Geyer C.J. (1991) Markov chain Monte Carlo maximum likelihood. In: Keramidas E.M. (ed.) *Computing science and statistics*.

- Proceedings of the 23rd Symposium on the Interface. Interface Foundation, Fairfax, VA, pp. 156–163.
- Gouy M., Guindon S., Gascuel O. (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27: 221–224.
- Guindon S, Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59: 307–321.
- Guindon S., Gascuel O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696–704.
- Hatakeyama S, Orihara T. (2020) *Elaphomyces asahimontanus* rediscovered from Japan 60 years after its original description. *Truffology* 3: 33–37. (in Japanese)
- Imai S. (1929) On the fungus-inhabiting *Cordyceps* and *Elaphomyces* in Japan. *Transactions of the Sapporo Natural History Society* 11: 31–37.
- Imai S. (1934) On a new species of *Cordyceps* parasitic on *Elaphomyces* in Japan. *Proceedings of the Imperial Academy (Japan)* 10: 677–679.
- Imai S. (1938) Third note on *Elaphomyces* and fungus-inhabiting *Cordyceps* in Japan. *Proceedings of the Imperial Academy (Japan)* 14: 18–20.
- Imai S. (1939) Fourth notes on *Elaphomyces* in Japan. *Proceedings of the Imperial Academy (Japan)* 15: 146–147.
- Izumitsu K., Hatoh K., Sumita T., Kitade Y., Morita A., Tanaka C., Gafur A., Ohta A., Kawai M., Yamanaka T., Neda H., Ota Y. (2012) Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience* 53: 396–401.
- Japanese Society of Cordyceps Research (2014) An illustrated guide to ecology of Japanese *Cordyceps*. Seibundo-Shinkosha, Tokyo. (in Japanese)
- Katoh K., Standley D.M. (2013) MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- Kawamura S. (1914) Illustrations of Japanese fungi Vol. 4. The Bureau of Forestry, the Ministry of Agriculture and Commerce, Tokyo. (in Japanese)
- Kobayasi Y. (1960) On the *Elaphomyces* found in Japan. *Nagaoa* 7: 35–50.
- Lefort V., Longueville J.-E., Gascuel O. (2017) SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution* 34: 2422–2424.
- Lloyd C.G. (1916) Mycological notes 44. Index of the Mycological Writings 5: 605–620.
- Orihara T., Smith M.E., Shimomura N., Iwase K., Maekawa N. (2012) Diversity and systematics of the sequestrate genus *Octaviania* in Japan: two new subgenera and eleven new species. *Persoonia* 28: 85–112.
- Paz A., Bellanger J., Lavoise C., Molia A., Ławrynowicz M., Larsson E., Iburguren I.O., Jeppson M., Læssøe T., Sauvé M., Richard F., Moreau P. (2017) The genus *Elaphomyces* (Ascomycota, Eurotiales): a ribosomal DNA-based phylogeny and revised systematics of European ‘deer truffles’. *Persoonia* 31: 197–239.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Shimizu D. (1997) Illustrated vegetable wasps and plant worms in colour. Ie-no-hikari Association, Tokyo. (in Japanese)
- Stamatakis A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312–1313.
- Umemura J. (1923) Nukata-gun Okazaki-mura no Yamato-tanpo-take to Yamato-tsuchidango. In: Aichi Prefecture (eds.): Aichi-ken Shiseki-meisho Ten-nen Kinen-butsu Chosa Hokoku No. 1, Aichi, pp. 1–3. [梅村甚太郎 (1923) 額田郡岡崎村ノ大和たんぽたけト大和つちだんご. 愛知県編. 愛知県史蹟名勝天然紀念物調査報告 第1, pp. 1–3, 愛知県.] (in Japanese)
- 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.
- Yasuda A. (1919) Tochukaso-no-hanashi. *Rigakukai* 16: 804–812. [安田篤 (1919) 冬蟲夏草の話. 理學界 16: 804–812.] (in Japanese)

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

Tolypocladium bacillisporum (Ophiocordycipitaceae): A new parasite of *Elaphomyces* from Japan

国内から採集されたツチダンゴ属生の新種シロアシヒメハナヤスリタケ *Tolypocladium bacillisporum* (オフィオコルディセプス科)

Kohei Yamamoto^{1*}, Gen Sugawa², Keizo Takeda³, Yousuke Degawa²山本 航平^{1*}, 須川 元², 武田 桂三³, 出川 洋介²

¹Tochigi Prefectural Museum, 2-2 Mutsumi-cho, Utsunomiya-shi, Tochigi 320-0865, Japan
栃木県立博物館, 〒 320-0865 栃木県宇都宮市睦町 2-2

²Sugadaira Research Station, Mountain Science Center, University of Tsukuba, 1278-294 Sugadairakogen, Ueda-shi, Nagano 386-2204, Japan
筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所, 〒 386-2204 長野県上田市菅平高原 1278-294

³Japanese Society of Cordyceps Research, Tsuruoka-shi, Yamagata, Japan
日本冬虫夏草の会, 山形県鶴岡市

*Corresponding author (主著者)

E-mail: kohei081@yahoo.co.jp

Abstract

The genus *Tolypocladium* (Ophiocordycipitaceae) includes species that are parasitic on the truffle-like ascomycete *Elaphomyces*. In addition to the 16 known species of mycoparasitic *Tolypocladium* from Japan, at least 19 undescribed species have been recorded from there. One of these species, called in Japan as “*Shiroashi-hime-hanayasuri-take*”, is a parasite of the *Elaphomyces* sect. *Ceratogaster*, and has been collected from Hokkaido Pref., Japan. We found a new locality for this species in Miyagi Pref., and conducted morphological observations, isolation, and molecular phylogenetic analyses of the specimens from Japan. The part-spore shape of this species was different from that of *T. jezoense*, a macromorphologically similar species and the phylogenies strongly indicated that “*Shiroashi-hime-hanayasuri-take*” is an independent species. Accordingly, this undescribed species is herein proposed as a new species, *T. bacillisporum*.

要旨

トリボクラジウム属 (オフィオコルディセプス科) には、トリュフ型の子嚢菌類であるツチダンゴ属に寄生する種が含まれる。日本国内からは 16 既知種に加え、少なくとも 19 種の未記載種が報告されている。その内の一種であるシロアシヒメハナヤスリタケは、ツチダンゴ属 *Ceratogaster* 節の一種を宿主とし、北海道から報告されている。我々は宮城県内より本種の新産地を見出し、日本産標本について形態観察、分離培養、分子系統解析を行った。その結果、本種は子実体の外観が類似するエゾハナヤスリタケとは部分胞子の形が異なり、系統学的に独立種であることが強く支持された。以上の結果に基づき、本種を新種 *Tolypocladium bacillisporum* として記載した。

Article Info: Submitted: 25 February 2022 Accepted: 24 March 2022 Published: 31 March 2022

Introduction

The family Ophiocordycipitaceae (Hypocreales) described by Sung et al. (2007), includes not only numerous arthropod pathogens but also mycoparasites of the truffle-like ectomycorrhizal ascomycete *Elaphomyces* (Elaphomycetaceae, Eurotiales). Those mycoparasites were formerly known as *Elaphocordyceps* spp., but the genus was recently synonymized into *Tolypocladium* (Quandt et al., 2014). Besides mycoparasites of *Elaphomyces*, *Tolypocladium* also includes insect pathogens, soil inhabitants, and endophytes (Gazis et al., 2014; Quandt et al., 2014). Since Nikoh & Fukatsu (2000) suggested that the common ancestor of extant cicada pathogenic and mycoparasitic *Tolypocladium* spp. was likely to be a cicada pathogenic fungus, inter-kingdom host jumping within the genus has been receiving increased attention (Quandt et al., 2016, 2018).

So far, there are 24 described species of *Tolypocladium* parasitizing *Elaphomyces* (Index Fungorum [<http://www.indexfungorum.org/>], accessed on 10 Feb. 2022), and at least 16 known species have been reported from Japan (Kobayasi & Shimizu, 1960; Shimizu, 1997). Furthermore, Shimizu (1997) and Japanese Society of Cordyceps Research (2014) suggested that 19 taxonomically unsettled species were present in Japan. One of these *Tolypocladium* species with the Japanese name “*Shiroashi-hime-hanayasuri-take*” (from the Japanese *shiroashi* = whitish stipe, *hime* = small, and *hanayasuri-take* = *T. ophioglossoides* (J.F. Gmel.) C.A. Quandt, Kepler & Spatafora; hereafter referred to as “*Shiroashi*”) was illustrated in a book (Japanese Society of Cordyceps Research, 2014). This species is parasitic on a species of sect. *Ceratogaster*, which was tentatively identified as *Elaphomyces* cf. *anthracinus* Vittad., and known only from Hokkaido Pref., Japan (Japanese Society of Cordyceps Research, 2014), but was recently also found in Miyagi Pref., Japan by the second author. Here, we critically examined the morphology and phylogenetic position of this species from Hokkaido Pref. and Miyagi Pref., and provide a taxonomic treatment.

Materials and methods

Morphological observations

Morphological observations were conducted based on fresh and freeze-dried specimens of “*Shiroashi*” following the methods of Yamamoto et al. (2020). Hand-cut sections of ascomata and ascospores discharged from perithecia were mounted in lactoglycerol and observed under a light microscope (BX40; Olympus, Tokyo, Japan). All measurements were made using PhotoRuler version 1.1.3 (<http://inocybe.info/>). After observation and isolation, fresh specimens were freeze-dried and oven-dried at 60°C. The specimens were deposited in the herbarium of Tochigi Prefectural Museum (TPM) and the National Museum of

Nature and Science, Tokyo (TNS) in Japan under TPM-M-9859, 9860, 9861 and TNS-F-82223, respectively.

Isolation and observation of mycelial growth

Ascospores discharged from mature perithecia onto potato dextrose agar (PDA; Nissui, Tokyo, Japan) were used to obtain cultures (Uchiyama, 1999). Plates were incubated at 20°C in the dark until germination. Germinated ascospores were transferred to another plate. The established isolates, C23 from TPM-M-9859, C53 from TPM-M-9860 and 202009-1 from TPM-M-9861, were deposited in the Medical Mycology Research Center, Chiba University (Chiba, Japan) under accession numbers IFM 67757 (for C23), IFM 67758 (C53), and IFM 67759 (202009-1). Mycelial growth on PDA was measured based on Yamamoto et al. (2020).

DNA sequencing and phylogenetic analyses

DNA was extracted from cultured mycelia on PDA, as described by Izumitsu et al. (2012), or CTAB method (Ishida et al., 1999). PCR was performed using KOD FX Neo (Toyobo, Osaka, Japan) as described by Yamamoto et al. (2021) or using KOD FX (Toyobo) in a total volume of 25 µL containing 5 µL dNTPs (0.4 mM each), 0.75 µL of each primer (0.3 µM each), 12.5 µL 2× PCR buffer for KOD FX (Toyobo), 0.5 µL 1.0 U µL⁻¹ KOD FX, 1.5 µL template DNA, and 4 µL sterile distilled water. For C23 and C53, amplification of (1) the small subunit (18S)-internal transcribed spacer (ITS)-large subunit (28S) of nuclear rDNA operon and (2) the translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) was performed using the primer pairs NS1 (White et al., 1990) and LR5 (Vilgalys & Hester, 1990), and 983F and 2218R (Rehner & Buckley, 2005), respectively. For 202009-1, amplification of (3) the ITS was performed using ITS5 and ITS4 (White et al., 1990). The PCR conditions were as follows: (1) 94°C for 2 min and 40 cycles of 98°C for 10 s, 51°C for 30 s, and 68°C for 3.5 min; (2) 94°C for 2 min, 10 cycles of 98°C for 10 s, 60°C for 30 s, and 68°C for 1 min 45 s, followed by 30 cycles of 98°C for 10 s, 55°C for 30 s, and 68°C for 1 min 45 s; (3) 94°C for 5 min and 10 cycles of 98°C for 10 s, 55°C for 30 s (0.5°C decrease per cycle), and 68°C for 1 min, followed by 25 cycles of 98°C for 10 s, 50°C for 30 s, and 68°C for 1 min. The PCR products were purified using Illustra™ ExoProStar™ (GE Healthcare, Amersham, UK) or Applied Biosystems™ ExoSAP-IT™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and sent to MacroGen Japan (Tokyo, Japan) or FASMAC (Kanagawa, Japan) for sequencing, using the same primers for PCR [except for NS1, NS5, NS6, ITS3, ITS4, ITS1 (White et al., 1990), and LR5 for (1)]. The resulting bidirectional sequences were edited using 4Peaks 1.8 (<http://nucleobytes.com/4peaks>) and assembled using MEGA 11 (Tamura et al., 2021). Newly generated

sequences were deposited in the DNA Data Bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) under LC684522–LC684526.

For phylogenetic analyses of the combined dataset of 18S, ITS, 28S and *tef1*, all *Tolypocladium* species parasitic on *Elaphomyces* for which sequences were available, i.e. *T. capitatum* (Holmsk.) C.A. Quandt, Kepler & Spatafora, *T. cucullae* Y.P. Xiao & T.C. Wen, *T. flavonigrum* Noisrip., Tasan., Khons. & Luangsa-ard, *T. fractum* (Mains) C.A. Quandt, Kepler & Spatafora, *T. guangdongense* (T.H. Li, Q.Y. Lin & B. Song) V. Papp, *T. inusitaticapitatum* F.M. Yu, Q. Zhao & K.D. Hyde, *T. japonicum* (Lloyd) C.A. Quandt, Kepler & Spatafora, *T. jezoense* (S. Imai) C.A. Quandt, Kepler & Spatafora, *T. ophioglossoides*, and *T. valliforme* (Mains) C.A. Quandt, Kepler & Spatafora, were retrieved from the International Nucleotide Sequence Databases and included. We also included several insect pathogenic *Tolypocladium* spp., i.e. *T. dujiaolongae* Y.P. Cao & C.R. Li, *T. fumosum* Ruzsk.-Mich., J. Pawłowska & Wrzosek, *T. inegoense* (Kobayasi) C.A. Quandt, Kepler & Spatafora, and *T. paradoxum* (Kobayasi) C.A. Quandt, Kepler & Spatafora, which were suggested to be close to “*Shiroashi*” based on the results of National Center for Biotechnology Information nucleotide BLAST search (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and an endophytic species, *T. amazonense* Gazis, Skaltsas & P. Chaverri, which is distantly related to the above-mentioned species parasitic on *Elaphomyces* and insects (Gazis et al., 2014). *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson (Ophiocordycipitaceae) was selected as an outgroup. The sequences were aligned according to Yamamoto et al. (2020). Topological conflicts with significant support among the four trees (18S, 933 bp; ITS, 522 bp; 28S, 859 bp; *tef1*, 1,006 bp) were checked directly by topological comparison of the preliminary maximum likelihood (ML) trees. Next, the four datasets were combined into a single 3,320 bp dataset and deposited in TreeBASE (accession URL: <http://purl.org/phylo/treebase/phylovs/study/TB2:S29449>). ML analysis of the combined dataset was conducted based on Yamamoto et al. (2020) using raxmlGUI 2.0 (Edler et al., 2020) under a general time reversible model of nucleotide substitution, with a discrete gamma distribution (+G) and invariant sites (+I), as selected by MEGA 11. A maximum parsimony (MP) analysis was conducted based on Yamamoto et al. (2020).

Results and Discussion

The stromata of “*Shiroashi*” (Fig. 1A–B) were characterized by the aboveground clavate part, which was olive-colored at maturity and yellowish-green when young (Fig. 1C), and underground white rhizomorphs. This species was often found near broad-leaved trees (Fig. 1D), e.g. *Quercus* and *Carpinus* known to form

ectomycorrhizal associations with *Elaphomyces* (Paz et al. 2017). The host was *Elaphomyces* cf. *anthracinus* (Fig. 1E). The perithecia were vertically immersed in the fertile head (Fig. 1F–G). Mycoparasitic *Tolypocladium* spp., such as *T. guangdongense* (Lin et al., 2008), *T. japonicum*, *T. jezoense*, *T. ophioglossoides*, *T. tenuisporum* (Mains) C.A. Quandt, Kepler & Spatafora, and *Elaphocordyceps* × *jezoenoides* (Kobayasi) Hirok. Sato, S. Ban, Masuya & Hosoya are characterized by the clavate stromata (Mains 1957; Kobayasi & Shimizu, 1960). Among them, only *T. jezoense* parasitizes species of sect. *Ceratogaster* including *E. anthracinus* (Kobayasi & Shimizu, 1960), and *T. jezoense* is macromorphologically very similar to “*Shiroashi*.” However, the latter formed smaller perithecia (700–720 × 200–250 μm in *T. jezoense* vs. 480–590 × 195–235 μm in “*Shiroashi*”) (Kobayasi & Shimizu, 1960; Fig. 1H), shorter and narrower asci (450–500 × 13–19 μm vs. 220–370 × 8–12 μm) (Kobayasi & Shimizu, 1960; Fig. 1I–J), and ascospores with a large number of septa (15 vs. 31 or 63) (Japanese Society of Cordyceps Research, 2014; Fig. 1K). Furthermore, there was almost no overlap between the length of the part-spore of “*Shiroashi*” (3.5–12.3 μm; Fig. 1L–M) and those in all of the above-mentioned species (≥10 μm long) except *T. ophioglossoides* and *T. tenuisporum*. These two species clearly differ from “*Shiroashi*” in the length of their perithecia (≥600 μm) (Mains 1957; Kobayasi & Shimizu, 1960). The ascospores of “*Shiroashi*” germinated on PDA within 1 week and formed white colonies within a month (Fig. 1N–O).

18S-ITS-28S rDNA operon (3,395 bp and 2,853 bp) and *tef1* (952 bp and 979 bp) sequences were obtained from the isolates C23 and C53, respectively. An ITS sequence (498 bp) was obtained from the isolates 202009-1. Sequences of each locus were identical except for the ITS region: a single nucleotide deletion was present in 202009-1. The BLAST search showed that ITS sequences from Japanese specimens were most similar to sequences of *Tolypocladium* spp., but the homology was less than 96%. Fig. 2 shows the ML phylogeny of the combined rDNA and *tef1* dataset (ln L = –8869.48349). The MP statistics were as follows: tree length = 806, consistency index = 0.65, retention index = 0.697, and composite index = 0.453. The sequences from isolates of “*Shiroashi*” and the three abovementioned clavate, mycoparasitic species of *Tolypocladium* formed a well-supported clade (bootstrap support: 94/79). “*Shiroashi*” is a unique species in this clade because it has much smaller part-spores than the other closely related species.

Morphological comparisons and phylogenetic analyses strongly indicated that “*Shiroashi*” is an undescribed species. Here, we propose a new name, *T. bacillisporum* for “*Shiroashi*” and provide its taxonomic description.

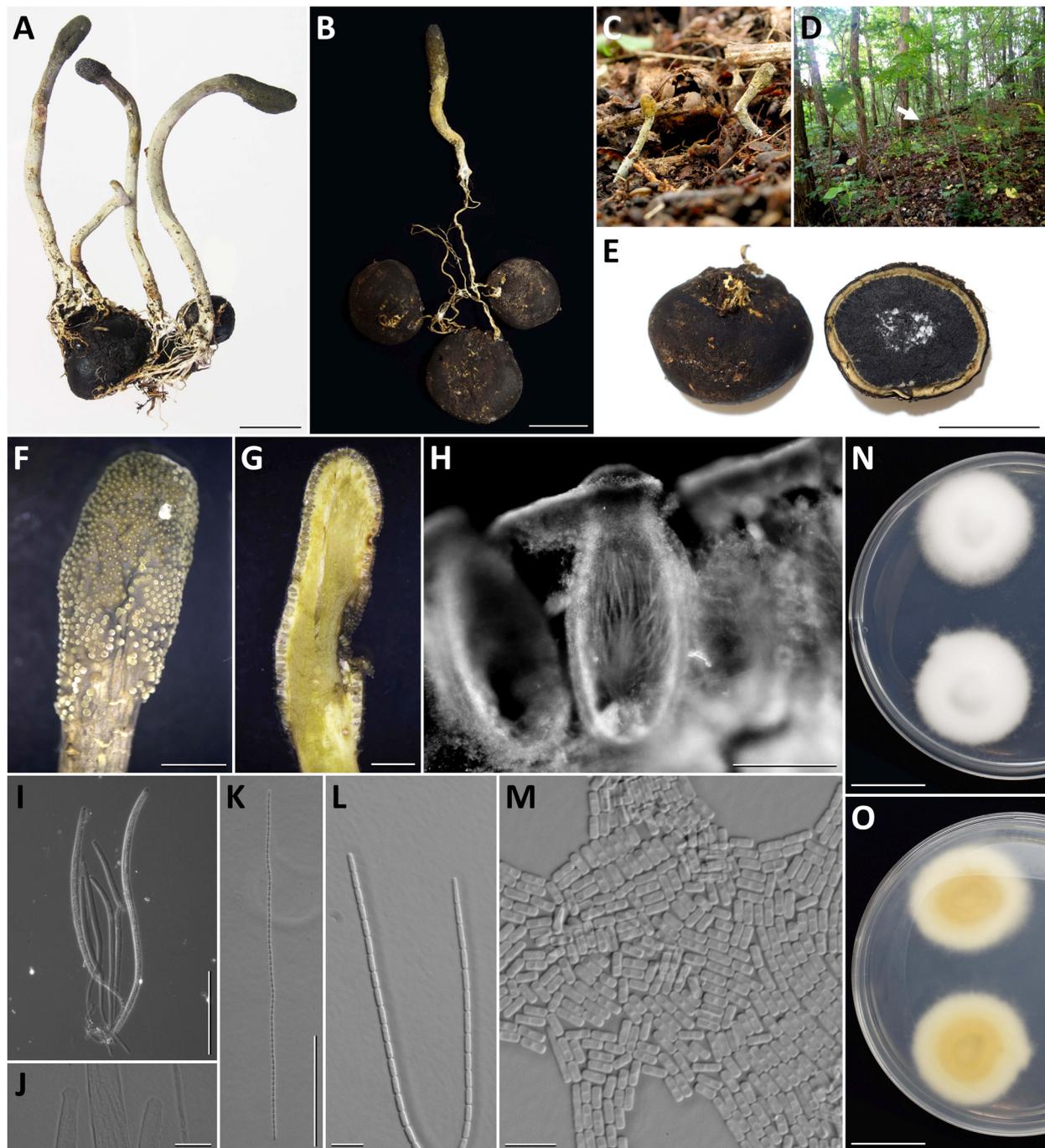


Fig. 1. *Tolypocladium bacillisporum* collected in Hokkaido Pref. (A, C–G: TPM-M-9860) and Miyagi Pref. (B, H–M: TPM-M-9861), and ex-type culture C23 (N, O). (A–B) Ascomata. (C) Young stromata in natural habitat. (D) Habitat. Arrow indicates the position of ascomata. (E) Host ascoma showing surface (left) and gleba (right). (F) Fertile head. (G) Longitudinal section of fertile head. (H) Perithecia. (I) Asci. (J) Apical cap of two asci. (K) Ascospore with 63 septa. (L) Tips of two ascospores. (M) Part-spores. (N–O) Upper (N) and reverse (O) sides of colonies on PDA after 30 d. Bars: A–B, E = 1 cm; F–G = 2 mm; H = 200 μ m; I, K = 100 μ m; J, L–M = 10 μ m; N–O = 2 cm.

Taxonomy

Tolypocladium bacillisporum Koh. Yamam., Sugawa & K. Takeda, sp. nov.

[Mycobank ID: MB 843120]

Diagnosis: This species is most similar to *T. jezoense*. The stroma is macromorphologically similar, and the hosts, *Elaphomyces*

anthracinus and its relatives, are common between the species. But the part-spores are much smaller than the latter.

Etymology: From the Latin *bacilli* = bacillus and *sporum* = spore, referring to the bacilliform part-spore of this species.

Type: JAPAN, Hokkaido Pref., Tohma-cho, Kaimei-ni-ku, ca. 220 m above sea level, on ascomata of *E. cf. anthracinus* hypogeous under a secondary forest dominated by *Quercus dentata* Thunb., 20 Sep.

Fig. 1.

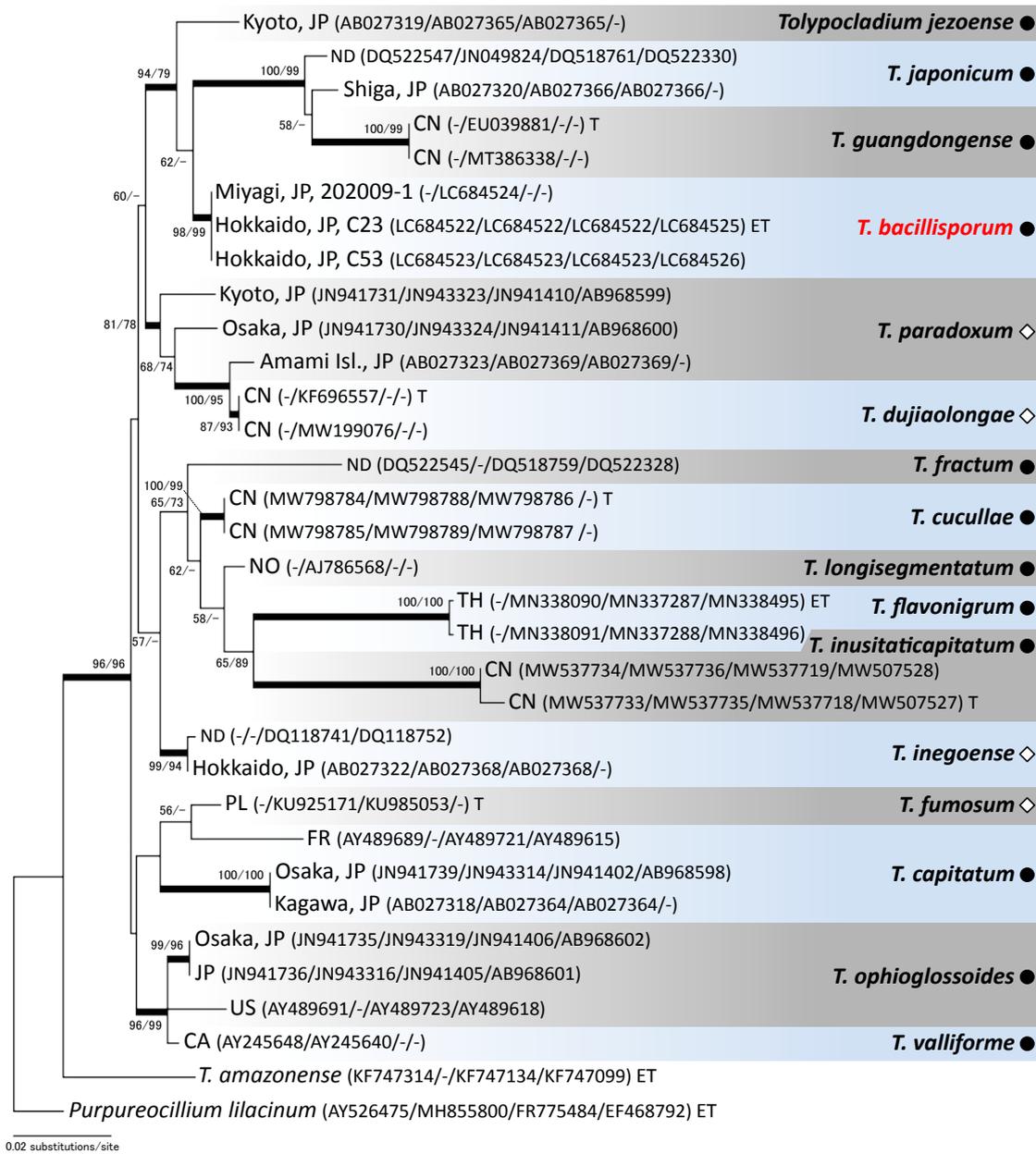


Fig. 2. Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of the combined dataset of 18S, ITS, 28S, and *tef1* sequences of *Tolypocladium* spp. parasitic on *Elaphomyces* (black circle) and their relatives on insects (open rhombus). *Purpureocillium lilacinum* was used as an outgroup. GenBank accession numbers for 18S, ITS, 28S, and *tef1* are shown in parentheses from left to right. Bootstrap (BS) values (1,000 replicates) $\geq 50\%$ from ML (left) and maximum parsimony (MP) (right) analyses are shown near the nodes. Branches supported by BS values $\geq 70\%$ from both ML and MP analyses are depicted as thick lines. CA = Canada; CN = China; FR = France; JP = Japan; ND = no data; NO = Norway; PL = Poland; TH = Thailand; US = USA. T = type specimen; ET = ex-type culture.

2010, K. Yamamoto (holotype, TPM-M-9859; isotype, TNS-F-82223; ex-type culture C23 [IFM 67757]).

Gene sequences from ex-type culture: LC684522 (18S), LC684522 (ITS), LC684522 (28S), LC684525 (*tef1*).

Description: Stromata arise from 1–3 hosts, often solitary, sometimes caespitose; epigeous part clavate, not branched, 30–65 mm long; underground part rhizomorphic, 8–75 mm long. Fertile head yellowish-green when young, turning olive-green as it matures, ellipsoidal to oblong, 5–16 mm long, 3–4.5 mm wide; inside yellow,

solid; ostioles up to 15 per 1 mm². Stipe grayish-white with greenish or yellowish tinge, cylindrical, surface smooth, narrower than fertile head, 1.8–2.7 mm wide; striae sometimes present at the border of the head. Rhizomorphic part white, partially yellowish, frequently branched, fragile, up to 1 mm wide. Perithecia ovoid, vertically immersed, ostiole protuberant, 480–590 × 195–235 μm (mean 528.1 × 218.1 μm, n = 6); wall 12–17 μm thick, composed of 6–7 layers of *textura angularis*, cells up to 18 μm wide. Asci hyaline, cylindrical, 8-spored, 220–370 × 8–12 μm (mean 326.4 × 9.16 μm, n = 21); apical

cap prominent, 2.5–4 µm high, 5–6 µm wide (mean 3.28×5.1 µm, $n = 18$). Ascospores hyaline, filiform, slightly acute at both ends, 270–355 µm long (mean 313.7 µm, $n = 20$); septa often 63, rarely 31, fragmenting into part-spores; part-spores cylindrical, bacilliform, $3.5\text{--}12.3 \times 1.5\text{--}2.5$ µm (mean \pm SD: $5.6 \pm 1.63 \times 1.93 \pm 0.16$ µm, $n = 50$). Colonies on PDA growing 11–13 mm within 30 d at 25°C in the dark; white, surface floccose with aerial hyphae; reverse white to pale yellow.

Distribution, habitat, and fruiting season: On hypogeous ascoma of *Elaphomyces* sect. *Ceratogaster* in broadleaved tree-dominated forests in the temperate zone of Honshu or subarctic zone of Hokkaido Pref., Japan. Found in autumn.

Other specimens examined: JAPAN, Hokkaido Pref., Tohama-cho, same locality as holotype specimen, on hypogeous ascomata of *E. cf. anthracinus*, 11 Sep. 2011, K. Yamamoto (TPM-M-9860; living culture, C53 [IFM 67758]). Miyagi Pref., Sendai-shi, Taihaku-ku, Kagitori, ca. 136 m above sea level, on hypogeous ascomata of *E. cf. anthracinus* under a *Carpinus* standing by a stream in mixed forest dominated by *Abies firma* Siebold & Zucc., 27 Sep. 2020, G. Sugawa (TPM-M-9861; living culture, 202009-1 [IFM 67759]).

Note: Ascoma of TPM-M-9860 and microstructures of TPM-M-9859 are illustrated as “*Shiroashi-hime-hanayasuri-take*” in the page 259 of Japanese Society of Cordyceps Research (2014).

Acknowledgements

We are grateful to Mr. Yoshitaka Kaitsu (Japanese Society of Cordyceps Research) for obtaining permission for field sampling from Tohma Town Office and supporting the field survey conducted by the first author. We also thank Dr. Kentaro Hosaka for depositing specimens in TNS.

References

- Eidler D., Klein J., Antonelli A., Silvestro D. (2020) raxmlGUI 2.0: A graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Methods in Ecology and Evolution* 12: 373–377.
- Gazis R., Skaltsas D., Chaverri P. (2014) Novel endophytic lineages of *Tolypocladium* provide new insights into the ecology and evolution of *Cordyceps*-like fungi. *Mycologia* 106: 1090–1105.
- Ishida K., Green B.R., Cavalier-Smith T. (1999) Diversification of a chimaeric algal group, the Chlorarachniophytes: Phylogeny of nuclear and nucleomorph small-subunit rRNA genes. *Molecular Biology and Evolution* 16: 321–331.
- 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.
- Japanese Society of Cordyceps Research (2014) An illustrated guide to ecology of Japanese *Cordyceps*. Seibundo Shinkosha, Tokyo. (in Japanese)
- Kobayasi Y., Shimizu D. (1960) Monographic studies of *Cordyceps*. 1. Group parasitic on *Elaphomyces*. *Bulletin of the National Science Museum, Tokyo* 5: 69–85.
- Lin Q.Y., Li T.H., Song B. (2008) *Cordyceps guangdongensis* sp. nov. from China. *Mycosax* 103: 371–376.
- Mains E.B. (1957) Species of *Cordyceps* parasitic on *Elaphomyces*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 84: 243–251.
- Nikoh N., Fukatsu T. (2000) Interkingdom host jumping underground: phylogenetic analysis of entomoparasitic fungi of the genus *Cordyceps*. *Molecular Biology and Evolution* 17: 629–638.
- Paz A., Bellanger J.-M., Lavoise C., Molia A., Lawrynowicz M., Larsson E., Ibarra I.O., Jeppson M., Læssøe T., Sauve M., Richard F., Moreau P.-A. (2017) The genus *Elaphomyces* (Ascomycota, Eurotiales): a ribosomal DNA-based phylogeny and revised systematics of European ‘deer truffles’. *Persoonia* 38: 197–239.
- Quandt C.A., Di Y., Elser J., Jaiswal P., Spatafora J.W. (2016) Differential expression of genes involved in host recognition, attachment, and degradation in the mycoparasite *Tolypocladium ophioglossoides*. *G3 Genes Genomes Genetics* 6: 731–741.
- Quandt C.A., Kepler R.M., Gams W., Araújo J.P.M., Ban S., Evans H.C., Hughes D., Humber R., Hywel-Jones N., Li Z., Luangsa-ard J.J., Rehner S.A., Sanjuan T., Sato H., Shrestha B., Sung G.-H., Yao Y.-J., Zare R., Spatafora J.W. (2014) Phylogenetic-based nomenclatural proposals for Ophiocordycipitaceae (Hypocreales) with new combinations in *Tolypocladium*. *IMA Fungus* 5: 121–134.
- Quandt C.A., Patterson W., Spatafora J.W. (2018) Harnessing the power of phylogenomics to disentangle the directionality and signatures of interkingdom host jumping in the parasitic fungal genus *Tolypocladium*. *Mycologia* 110: 104–117.
- Rehner S.A., Buckley E. (2005) A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97: 84–98.
- Shimizu D. (1997) Illustrated vegetable wasps and plant worms in colour. IE-NO-HIKARI Association, Tokyo. (in Japanese)
- Sung G.-H., Hywel-Jones N.L., Sung J.-M., Luangsa-ard J.J., Shrestha B., Spatafora J.W. (2007) Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57: 5–59.
- Tamura K., Stecher G., Kumar S. (2021) MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38: 3022–3027.
- Uchiyama S. (1999) Methods for collection, detection and isolation: *Cordyceps*. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 40: 173–179. (in Japanese)
- 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.

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.

Yamamoto K., Ohmae M., Orihara T. (2020) *Metarhizium brachyspermum* sp. nov. (Clavicipitaceae), a new species parasitic on Elateridae from Japan. *Mycoscience* 61: 37–42.

Yamamoto K., Endo N., Ohmae M., Orihara T. (2021) *Balsamia oblonga* (Helvellaceae), a new species from a subalpine forest in Japan. *Truffology* 4: 1–7.

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

Scleroderma capeverdeanum, a subhypogeous fungus new to Japan, collected from the *Eucalyptus* plantation in Ibaraki Prefecture

茨城県のユーカリ植栽地において採集された日本新産の 半地下生菌, *Scleroderma capeverdeanum*

Taiga Kasuya^{1*}, Mihoko Uzawa², Kentaro Hosaka³糟谷 大河^{1*}, 鶴沢 美穂子², 保坂 健太郎³

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

² Ibaraki Nature Museum, 700 Osaki, Bando-shi, Ibaraki 306-0622, Japan
ミュージアムパーク茨城県自然博物館, 〒 306-0622 茨城県坂東市大崎 700

³ 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

* Corresponding author (主著者)

E-mail: tkasuya@keio.jp

Abstract

A subhypogeous sclerodermataceous fungus was collected in the *Eucalyptus* plantation of Ibaraki Prefecture, central Japan. Based on morphological observations and phylogenetic analyses using nuclear ribosomal DNA sequences, the present fungus was identified as *Scleroderma capeverdeanum*, belonging to Sclerodermataceae (Boletales). *Scleroderma capeverdeanum* is new to Japan and characterized by small-sized (4–10 mm in diam.), sessile basidiomata, yellowish to yellowish brown exoperidium with brownish, areolate to verrucose scales, and echinulate basidiospores. Japanese specimens of *S. capeverdeanum* are probably associated with introduced *E. globulus*, and therefore they are most likely exotic species introduced from Australia.

要旨

茨城県のユーカリ植栽地において、ニセシヨウロ型の半地下生菌の一種が採集された。本菌について、形態的特徴の観察および子実体より得られた核リボソーム DNA の塩基配列を用いた系統解析を行った。その結果、本菌はイグチ目ニセシヨウロ科に属する *Scleroderma capeverdeanum* と同定された。本種は日本新産であり、子実体が小型（直径 4–10 mm）で無柄である点、外皮が黄色から黄褐色で、網目状からいぼ状にひび割れ、褐色を帯びた鱗片を有する点、そして担子胞子が針状突起に覆われる点により特徴づけられる。日本産標本は *Eucalyptus globulus* と共生し、オーストラリアからの外来種であると推察される。本菌の和名をユーカリキヒメニセシヨウロとする。

Article Info: Submitted: 14 December 2021 Accepted: 19 March 2022 Published: 31 March 2022

Introduction

The genus *Scleroderma* Pers. is currently classified in the order Boletales based on molecular phylogenetic analyses (Binder & Bresinsky, 2002; Binder & Hibbett, 2006; Watling, 2006). Previously, ca. 40 species of the genus were recognized from tropical, subtropical to temperate regions of the world (Baseia et al., 2016; Guzmán, 1970; Guzmán et al., 2013; Nouhra et al., 2012; Ortiz-Rivero et al., 2021; Zhang et al., 2013, 2020). In Japan, fifteen species of *Scleroderma* were hitherto recorded (Kasuya et al., 2002; Kasuya & Guzmán, 2007; Yoshimi, 2002). The genus forms epigeous, subhypogeous or hypogeous basidiomata (Beaton & Weste, 1982; Giachini et al., 2000; Guzmán, 1970; Guzmán et al., 2013; Nouhra et al., 2012), and many species have been confirmed as ectomycorrhizal with a wide range of host plants such as Pinaceae, Fagaceae, Salicaceae and Myrtaceae (Mrak et al., 2017; Nouhra et al., 2012). Japanese species of *Scleroderma* were usually observed under betulaceous, fagaceous or pinaceous trees (Kasuya et al., 2002; Kasuya & Guzmán, 2007; Yoshimi, 2002).

Some species of *Eucalyptus* (Myrtaceae) were introduced from Australia to Japan early in the 20th century to meet the country's demand for pulpwood (Shibata & Yoshikawa, 1956). Recently, to supply the demand for gardening, greening, and feeds of Koala which are kept at zoos, several plantations of *Eucalyptus* spp. are maintained in Japan (Inuma et al., 2015; Komaki et al., 2000). *Eucalyptus* is an ectomycorrhizal tree genus and several species of *Scleroderma* have been known as its ectomycorrhizal symbionts (Bashir & Khalid, 2015; Beaton & Weste, 1982; Giachini et al., 2000; Rose et al., 1981). However, only two species, i.e., *S. cepa* Pers. and *S. flavidum* Ellis & Everh. have previously been recorded in exotic *Eucalyptus* plantations in Japan (Yoshimi, 2002). During the course of our recent

studies of macrofungal diversity at the *Eucalyptus* plantation in Ishioka of Ibaraki Prefecture, central Honshu, Japan, three specimens of a subhypogeous sclerodermataceous fungus were collected. Based on morphological observations and phylogenetic analyses using nuclear ribosomal DNA sequences, the present fungus was identified as *Scleroderma capeverdeanum* M.P. Martín, M. Dueñas & Telleria. This species was originally described from Cape Verde, Macaronesia, off the coast of northwestern Africa (Crous et al., 2016) and it is known only from the type locality. Our morphological observations and phylogenetic analyses of the Japanese specimens revealed that it is the second distributional record of *S. capeverdeanum* in the world. Moreover, our study demonstrates that *S. capeverdeanum* is presumably associated with *Eucalyptus* spp. In this paper, morphological, phylogenetic and ecological characteristics of Japanese specimens of *S. capeverdeanum* are discussed.

Materials and methods

Sample collecting and morphological observations

Fresh subhypogeous basidiomata were collected among plant debris and rich soil in the exotic *Eucalyptus* plantation dominated by *E. globulus* Labill. at Otsuka, Ishioka, Ibaraki Prefecture (Fig. 1) during October to December, 2020. Specimens were photographed and observed macroscopically. Fresh basidiomata of specimens were dried using a food dehydrator (Snackmaster Express FD-60; Nesco/American Harvest, Milwaukee, WI, USA) under 46 °C for 46 hours. For light microscopy, hand-cut sections of both fresh and dried specimens were mounted in water, 3% KOH or 70% ethanol reagent. Dimensions of basidiospores were measured from water-mounted sections. More than 50 randomly selected basidiospores were measured under a light microscope at 1000× magnification. All



Fig. 1. Habitat in the locality of *Scleroderma capeverdeanum*. A: *Eucalyptus globulus* trees. B: Numerous fallen leaves and old bark of *E. globulus* are densely deposited on the ground.

measurements were performed with Photoruler 1.1.3 (http://inocybe.info/_userdata/ruler/PhotoRuler.html). In addition, the surface features of basidiospores were observed by scanning electron microscopy (SEM). For SEM, a small portion from glebal tissue was put onto double-sided adhesive tape on a specimen holder and coated with platinum-palladium using a JFC-1600 Ion Sputter Coater (JEOL, Tokyo, Japan). Specimen was examined with a JSM-6480LV SEM (JEOL, Tokyo, Japan) operating at 5 kV. Three specimens examined in this study were deposited at mycological herbaria of Ibaraki Nature Museum (INM) and National Museum of Nature and Science (TNS) in Japan.

DNA preparation, PCR and sequencing

DNA extraction, PCR and DNA sequencing were carried out according to the methods introduced by Kasuya et al. (2012). First, small fragments of glebal tissue from freshly collected samples were soaked in DMSO buffer (Seutin et al., 1991) with the addition of 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 0.1 M sodium sulfite (Na_2SO_3) at 4 °C, following the procedures of Hosaka (2009), Hosaka & Castellano (2008), and Hosaka et al. (2010). DNA of the above specimens was extracted from the tissue fragments stored in DMSO buffer. DNA extractions used the modified CTAB extraction followed by glass milk purification methods as summarized by Hosaka (2009) and Hosaka & Castellano (2008). DNA sequence data were obtained from the nuclear ribosomal ITS region and a part of LSU. For amplifying the ITS region, the primer combination of ITS5 and ITS4 (White et al., 1990) was used. For amplifying the LSU, the combination of LR0R and LR5 (Vilgalys & Hester, 1990) was used. PCR were carried out using 20 µl reaction volume, each containing 1 µl genomic DNA, 1 µl dNTP (4 mM), 1 µl each primer (8 µM), 0.5 units Taq polymerase (Takara Bio Inc., Tokyo, Japan), 2 µl MgCl_2 (25 mM), and 2 µl bovine serum albumin (BSA). Cycling parameters for ITS region and LSU followed Kasuya et al. (2012). PCR products were electrophoresed in 1% agarose gels stained with ethidium bromide and visualized under UV light. When amplification bands were confirmed, PCR products were then purified using the ExoSap-IT (Millipore, Molsheim, France) and directly sequenced using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Norwalk, CT, USA), following the manufacturer's instructions. A total of two newly generated sequences from this study were deposited in GenBank (Table 1).

Phylogenetic analyses

Newly generated ITS and LSU sequences from the Japanese

specimen were used for the phylogenetic analyses. Additionally, 42 ITS and 26 LSU sequences of sclerodermataceous fungi were retrieved from the NCBI GenBank databases (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and included in the analyses (Table 1). DNA sequences were initially aligned using MUSCLE v.3.6 (Edgar, 2004a, b), followed by manual alignment in the data editor of BioEdit ver. 7.0.1 (Hall, 1999). A total of 36 ITS and 89 LSU nucleotide positions were respectively excluded from the analyses because of the presence of ambiguously aligned regions. Phylogenetic analyses were performed independently for ITS and LSU sequences under maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML) criteria. MP analyses were conducted under the equally weighted parsimony criterion using PAUP version 4.0b10 (Swofford, 2002). The analyses were performed using the heuristic search option with tree-bisection-reconnection (TBR) and MULTREES option, and 1000 replicates of random addition sequence were conducted. Support for the individual nodes was tested by means of bootstrap analysis (Felsenstein, 1985) under the equally weighted parsimony criterion. A bootstrap analysis was based on 10,000 bootstrap replicates using the heuristic search option with TBR and MULTREES options with ten random additional sequences. ML analyses were performed using MEGA X (Kumar et al., 2018) after testing the best models. According to the lowest BIC (Bayesian Information Criterion) scores, Kimura 2-parameter (Kimura, 1980) with gamma distributed rate heterogenetic and a proportion of invariant sites (K2+G+I) and Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993) with gamma distributed rate heterogenetic and a proportion of invariant sites (TN93+G+I) were chosen as the optimal substitution models for the analyses of the ITS and LSU datasets, respectively. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. For the ML analyses, clade robustness was assessed using a bootstrap analysis with 1000 replicates. Sequences of *Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert were selected for outgroups, which were strongly supported as the sister of the major clade containing the genus *Scleroderma* (Baseia et al., 2016; Binder & Hibbett, 2006; Hosaka, 2009; Phosri et al., 2009).

Results

Morphological observations

Japanese specimens were morphologically identical to *S. capeverdeanum* in their sessile, small-sized basidiomata (Fig. 2A–B), yellowish to yellowish brown exoperidium covered by brownish, areolate to verrucose scales (Fig. 2B–C), and globose, densely

Table 1. Specimen identification, voucher specimen and/or isolate numbers, origin and GenBank accession numbers for ITS and LSU sequences used for the present phylogenetic analyses

Species names	Herbarium voucher; isolate	Origin	GenBank accession no.		References
			ITS	LSU	
<i>Pisolithus arhizus</i>	Wat.139161; 92fbisPISOLI	Italy	FR748132	n/a	Phosri et al. (2012)
<i>P. arhizus</i>	588; n/a	n/a	n/a	AF336262	Binder & Bresinsky (2002)
<i>Scleroderma areolatum</i>	n/a; O3C_4	USA: New York	JX030282	n/a	n/a
<i>S. areolatum</i>	n/a; Scl_1-1-Qm1H	USA: New York	JX030288	n/a	n/a
<i>S. areolatum</i>	AWW211; n/a	USA	n/a	EU718149	Wilson et al. (2011)
<i>S. aurantium</i>	n/a; 8_5	China: Sichuan	HM237174	n/a	n/a
<i>S. aurantium</i>	HB#E02; HBS2	Pakistan	KF802172	n/a	Bashir & Khalid (2015)
<i>S. bermudense</i>	BZ3961; n/a	Belize	n/a	DQ644137	Louzan et al. (2007)
<i>S. bermudense</i>	n/a; BA 06.04.22	Guadeloupe	FR682092	n/a	Sene et al. (2015)
<i>S. bovista</i>	MG061001_01; n/a	Germany: Thuringia	JQ669943	n/a	Gube & Dörfelt (2012)
<i>S. bovista</i>	n/a	Japan	AB099901	n/a	Kanchanaprayudh et al. (2003)
<i>S. bovista</i>	Nara_ScB84e3; n/a	Japan: Shizuoka, Gotenba	AB211267	n/a	Nara (2006)
<i>S. bovista</i>	TNS-F-82197 (= Kasuya B251); n/a	Japan: Yamanashi, Narusawa	OL764485	OL752409	Present study
<i>S. bovista</i>	TNS-F-82195 (= Kasuya B236); n/a	Japan: Nagano, Nagano	OL764484	OL752408	Present study
<i>S. bovista</i>	TNS-F-82200 (= Kasuya B804); n/a	Japan: Toyama, Toyama	OL764487	OL752412	Present study
<i>S. bovista</i>	K80S09; n/a	New Zealand	GQ267487	n/a	Walbert et al. (2010)
<i>S. bovista</i>	Trappe26575; n/a	USA	EU819517	EU718178	Wilson et al. (2011)
<i>S. bovista</i>	n/a; O1Q_1	USA: New York	JX030277	n/a	n/a
<i>S. bovista</i>	W#1149; n/a	n/a	n/a	AF336264	Binder & Bresinsky (2002)
<i>S. capeverdeanum</i>	TNS-F-82205 (= Kasuya B4288); n/a	Japan: Ibaraki, Ishioka	OL764491	OL752414	Present study
<i>S. capeverdeanum</i>	MA-Fungi 87406*; n/a	Cape Verde: Santiago Island	KU747111	KU747110	Crous et al. (2016)
<i>S. cepa</i>	JMP0081; n/a	USA	EU819439	n/a	Hosaka (2009)
<i>S. cepa</i>	184; n/a	n/a	n/a	AF336265	Binder & Bresinsky (2002)
<i>S. citrinum</i>	n/a; ecmSC2	Czech	JX679368	n/a	n/a
<i>S. citrinum</i>	AWW212; n/a	USA	n/a	EU718151	Wilson et al. (2011)
<i>S. columnare</i>	CUB Microbiology KHS3; n/a	Thailand: Chachoengsao	AB459512	n/a	Disyatat et al. (2016)
<i>S. columnare</i>	MS43; n/a	n/a	n/a	AF336273	Binder & Bresinsky (2002)
<i>S. dictyospora</i>	MS55; n/a	n/a	n/a	AF336267	Binder & Bresinsky (2002)
<i>S. dunensis</i>	UFRN-Fungus 2551; n/a	Brazil	KU747116	n/a	Crous et al. (2016)
<i>S. dunensis</i>	UFRN-Fungus 2553; n/a	Brazil	KU747118	n/a	Crous et al. (2016)
<i>S. dunensis</i>	UFRN-Fungus 2206; n/a	Brazil	KU747121	n/a	Crous et al. (2016)
<i>S. echinatum</i>	MS34; n/a	n/a	n/a	AF336268	Binder & Bresinsky (2002)
<i>S. laeve</i>	ZLR46; n/a	China	MW553325	MW553729	Huang et al. (2021)
<i>S. laeve</i>	TNS-F-82199 (= Kasuya B803); n/a	Japan: Ishikawa, Komatsu	n/a	OL752411	Present study
<i>S. laeve</i>	MCA242; n/a	USA	EU718117	n/a	Wilson et al. (2011)
<i>S. laeve</i>	OSC27936; n/a	USA	EU718120	n/a	Wilson et al. (2011)
<i>S. laeve</i>	27936; n/a	n/a	n/a	DQ683003	Louzan et al. (2007)
<i>S. meridionale</i>	AWW218; n/a	USA	EU718121	EU718152	Wilson et al. (2011)
<i>S. michiganense</i>	E00278311; MICSC2	USA: Wisconsin, Sheboygan	FM213347	n/a	Phosri et al. (2009)
<i>S. michiganense</i>	n/a; Scl_3-1-2L	USA: New York	JX030206	n/a	n/a
<i>S. polyrhizum</i>	n/a; 11_3	China: Sichuan	HM237173	n/a	n/a
<i>S. polyrhizum</i>	n/a; Scl_1-1-4Nc	USA: North Carolina	JX030195	n/a	n/a
<i>S. polyrhizum</i>	594; n/a	USA	n/a	DQ683000	Louzan et al. (2007)
<i>S. radicans</i>	PDD103563; n/a	New Zealand	n/a	KP191692	n/a
<i>S. radicans</i>	PDD103558; n/a	New Zealand	n/a	KP191693	n/a
<i>S. septentrionale</i>	J. Nitare (12.9.1986); SEPSCL2	Sweden: Norrbotten	FM213336	n/a	Phosri et al. (2009)
<i>S. septentrionale</i>	A.D. Parker (2.10.1997); SEPSCL3	USA: Wisconsin, Lone Rock	FM213338	n/a	Phosri et al. (2009)
<i>S. sinnamariense</i>	SINSCL_8; n/a	Thailand: Pranomprai, Roi Et	FM213363	n/a	Phosri et al. (2009)
<i>S. sinnamariense</i>	NAST-FB11; CMU53-210-2	Thailand	HQ687222	n/a	Siri-in et al. (2014)
<i>S. sinnamariense</i>	MS46; n/a	n/a	n/a	AF336270	Binder & Bresinsky (2002)
<i>S. verrucosum</i>	SV-5602; n/a	Burkina Faso	FJ840461	n/a	Sanon et al. (2009)
<i>S. verrucosum</i>	BCC-MPM2605; n/a	Spain: Catalonia	AJ629886	n/a	Phosri et al. (2007)
<i>S. verrucosum</i>	5; n/a	n/a	n/a	AF336271	Binder & Bresinsky (2002)
<i>S. xanthochroum</i>	AWW311; n/a	Malaysia	EU718126	EU718154	Wilson et al. (2011)
<i>S. yunnanense</i>	KUN-HKAS 79633A; Ji001A	China: Yunnan	JQ639040	n/a	Zhang et al. (2013)
<i>S. yunnanense</i>	KUN-HKAS 79633B; Ji001B	China: Yunnan	JQ639041	n/a	Zhang et al. (2013)
<i>S. yunnanense</i>	KUN-HKAS 79633C; Ji001C	China: Yunnan	JQ639042	n/a	Zhang et al. (2013)
<i>Scleroderma</i> sp.	TNS-F-82198 (= Kasuya B714); n/a	Japan: Ishikawa, Komatsu	OL764486	OL752410	Present study
<i>Scleroderma</i> sp.	MEL2295738A; n/a	Australia	n/a	EU718181	Wilson et al. (2011)
Uncultured ectomycorrhizal fungus	n/a; L5001 Sclerod Cam Euc02	Cameroon	FR731681	n/a	Tedersoo et al. (2011)

*Holotype of *Scleroderma capeverdeanum*.

"n/a" means information not available. Sequences newly generated in the present study were shown in bold.

echinulate basidiospores (Fig. 2D–E). However, subhypogeous habit of Japanese specimens is different from the type specimen of *S. capeverdeanum*, which was described as epigeous (Crous et al., 2016). A detailed description and illustrations of the salient features of Japanese specimens are given below.

Phylogenetic analyses

The ITS dataset was consisted by 42 ingroup and 1 outgroup taxa.

It had an aligned length of 865 characters including gaps, of which 36 characters were constant, 509 variable and phylogenetically uninformative, and 320 phylogenetically informative. The MP analysis of the ITS dataset yielded 10,000 most parsimonious trees, of which 149 trees were found in the first step of the heuristic search. Consistency index (CI), retention index (RI) and rescaled consistency index (RC) of the most parsimonious trees are 0.4487, 0.7205, 0.3233, respectively. The highest log likelihood of the

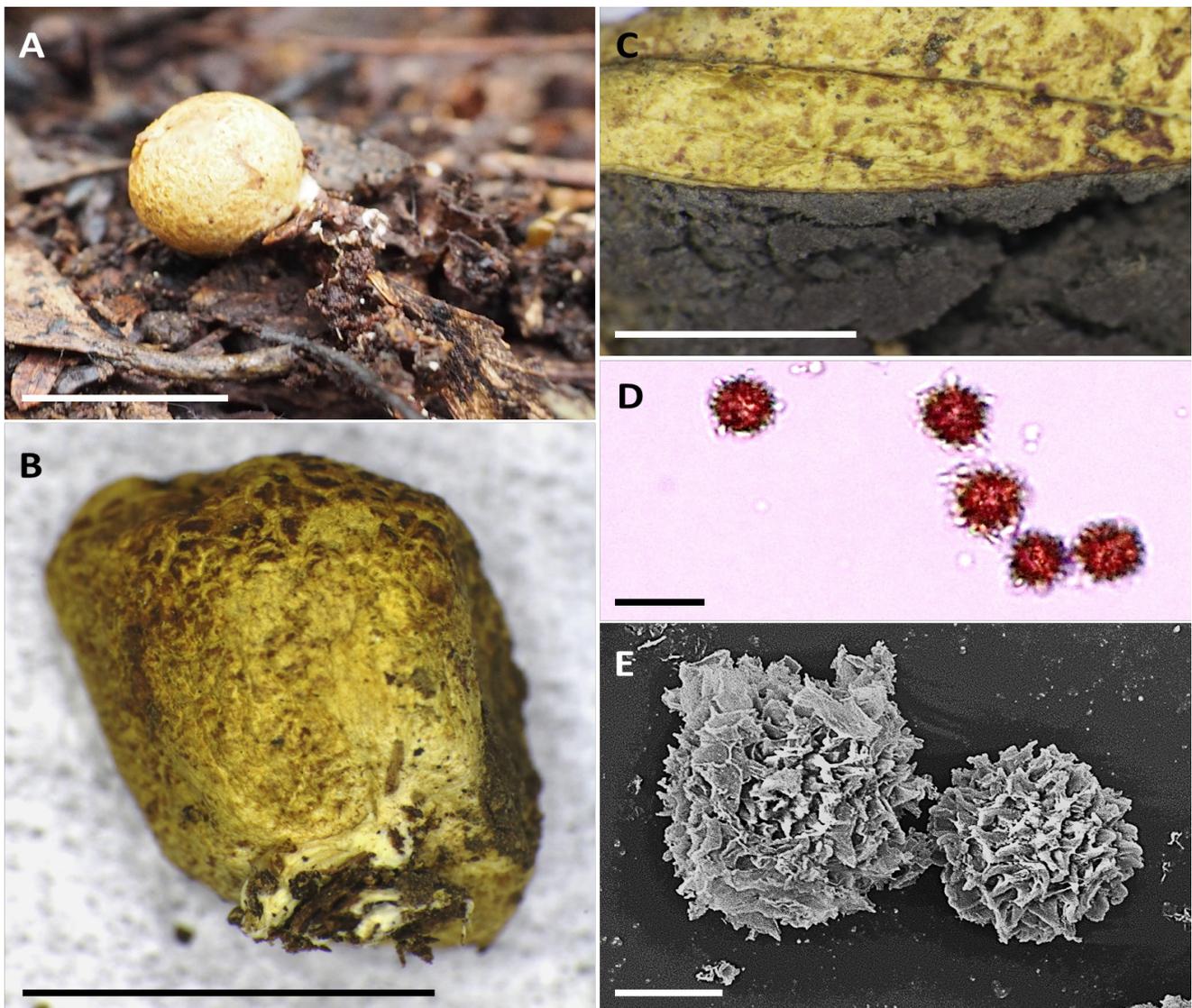


Fig. 2. Morphological features of *Scleroderma capeverdeanum*. A: Basidiomata in the natural habitat (INM-2-217835). B: Surface of mature basidiomata (INM-2-217835). C: Vertical sections of mature basidiomata showing exoperidium and gleba (TNS-F-82205). D: Basidiospores (TNS-F-82205). E: Scanning electron microscopy image of basidiospores (TNS-F-82205). Bars: A–B = 1 cm; C = 5 mm; D = 10 μ m; E = 5 μ m.

resulting ML tree of the ITS dataset is -2446.64. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites [5 categories (+G, parameter = 0.5939)]. The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable [(+I), 41.58% sites]. The MP and ML analyses resulted in trees that were identical in topology. Hence, only the MP tree of the ITS dataset is shown in Fig. 3. By MP and ML, ITS sequences generated from Japanese and Cape Verdean samples of *S. capeverdeanum* were placed within a strongly supported clade (MP BS = 100%, ML BS = 99%; Fig. 3) and were distinct from those of the other members of *Scleroderma*.

The LSU dataset was consisted by 26 ingroup and 1 outgroup taxa. It had an aligned length of 1006 characters including gaps, of which 89 characters were constant, 836 variable and phylogenetically uninformative, and 81 phylogenetically

informative. The MP analysis of the LSU dataset yielded 10,000 most parsimonious trees, of which 36 trees were found in the first step of the heuristic search. CI, RI and RC of the most parsimonious trees are 0.3631, 0.5807, 0.2108, respectively. The highest log likelihood of the resulting ML tree of the LSU dataset is -2656.84. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites [5 categories (+G, parameter = 0.4036)]. The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable [(+I), 63.46% sites]. The MP and ML analyses resulted in trees that were identical in topology. Hence, only the MP tree of the LSU dataset is shown in Fig. 4. By MP and ML, LSU sequences generated from Japanese and Cape Verdean samples of *S. capeverdeanum* were placed within a strongly supported clade (MP BS = 96%, ML BS = 100%; Fig. 4) and were distinct from those of the other members of *Scleroderma*.

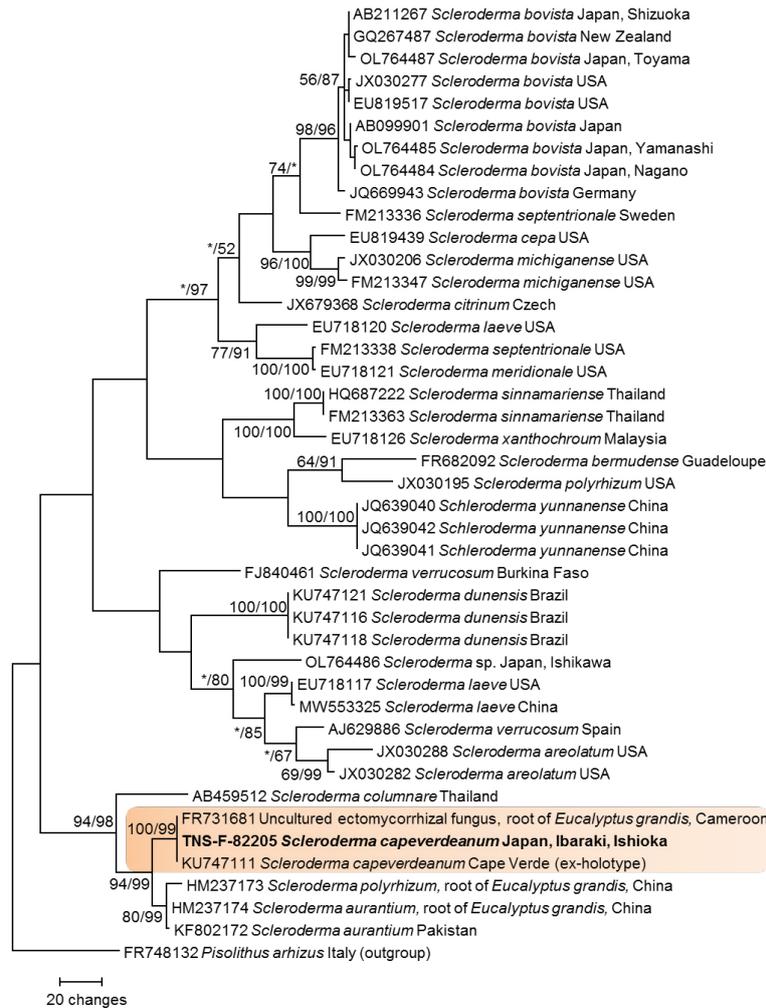


Fig. 3. Phylogenetic tree generated from maximum parsimony (MP) analysis based on the nuclear ribosomal ITS region of selected sclerodermataceous species. Bootstrap support values (BS) of MP and maximum likelihood (ML) greater than 50% are shown for each node (MP/ML), and BS less than 50% are indicated by an asterisk (*).

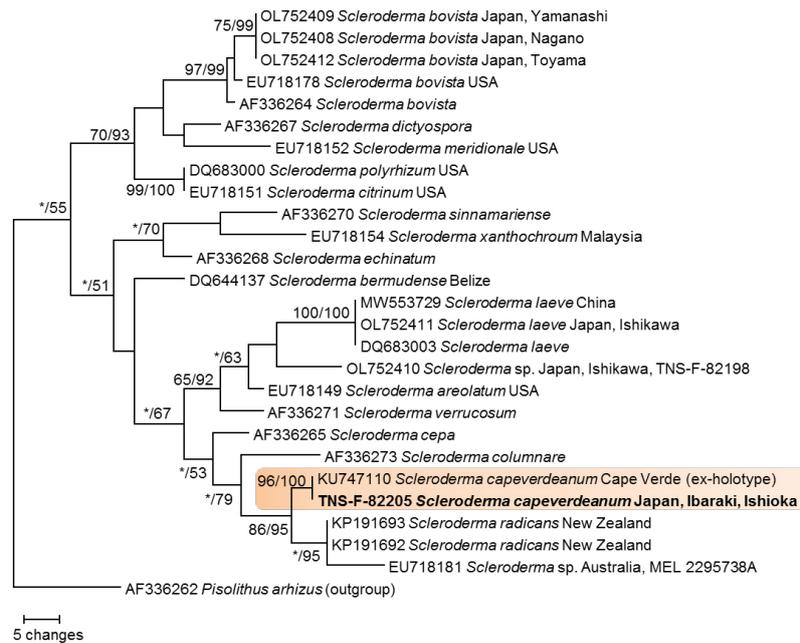


Fig. 4. Phylogenetic tree generated from maximum parsimony (MP) analysis based on the nuclear ribosomal LSU of selected sclerodermataceous species. Bootstrap support values (BS) of MP and maximum likelihood (ML) greater than 50% are shown for each node (MP/ML), and BS less than 50% are indicated by an asterisk (*).

Taxonomy

Scleroderma capeverdeanum M.P. Martín, M. Dueñas & Telleria, in Crous et al., *Persoonia* 36: 413 (2016)

Fig. 2.

Description: Basidiomata (Fig. 2A–B) subhypogeous, globose, depressed globose to subglobose, small-sized, 4–10 mm broad, sessile, arising from whitish mycelial strands attached to plant debris and soil. Peridium ca. 0.5–1 mm thick, two-layered. Exoperidium (Fig. 2B–C) very thin, yellow to yellowish brown, covered by brown to dark brown, areolate to verrucose scales. Endoperidium papery, firm but brittle when dry, whitish. Apical part of peridium irregularly dehiscent and opening lacerate pore when mature. Gleba (Fig. 2C) compact when young, becoming powdery when mature, grayish. Basidiospores (Fig. 2D–E) globose, 8.5–11 µm in diam. including surface ornamentation, dark brown in 3% KOH, dark reddish brown in 70% ethanol reagent; surface densely echinulate composed of hyaline spines up to 1.5 µm long. Under SEM, spines of basidiospore surface irregularly covered with scaly to tabular materials (Fig. 2E). Basidia not observed. Rudimentary hyphae interwoven, septate, thin-walled, 4–8 µm broad, hyaline in 3% KOH and 70% ethanol reagent; surface sparsely covered with amorphous, hyaline gelatinous materials.

Habitat: Subhypogeous, usually solitary or small groups among plant debris and rich soil under *Eucalyptus globulus* trees (Fig. 1). Fruiting in the Japanese localities occurs in autumn to winter (October to December).

Specimens examined: JAPAN, Ibaraki Prefecture, Ishioka, Otsuka (alt. approx. 140 m asl.), October 12, 2020, coll. T. Kasuya, INM-2-217835; same place, October 12, 2020, coll. T. Kasuya, TNS-F-82205, GenBank accession no.: OL764491 (ITS), OL752414 (LSU); same place, December 21, 2020, coll. T. Kasuya, INM-2-217836.

Known distribution: Cape Verde (Crous et al., 2016) and Japan (new record).

Japanese name: *Yūkari-ki-hime-nise-shoro* (“yūkari” = *Eucalyptus*; “ki-hime” = yellowish, small-sized; “nise-shoro” = the Japanese name of *Scleroderma*).

Discussion

As outlined above, studied Japanese specimens were morphologically almost identical to the original description of *S. capeverdeanum* (Crous et al., 2016). However, basidiomata of Japanese materials were subhypogeous while the type specimen of the present species was described as epigeous (Crous et al., 2016). Numerous fallen leaves and old bark of *E. globulus* are densely deposited on the ground in the locality of Japanese specimens (Fig. 1B) and basidiomata

of *S. capeverdeanum* were observed among these litter and rich soil, as subhypogeous nature. Although the detailed environmental information on the type locality of *S. capeverdeanum* was not shown by Crous et al. (2016), subhypogeous or epigeous nature of its basidiomata presumably depend on their habitat. The present species is morphologically similar to *S. flavidum* in its subhypogeous, sessile basidiomata with yellowish surface of peridium and echinulate basidiospores (Yoshimi, 2002). However, *S. flavidum* is clearly distinguishable from *S. capeverdeanum* by its larger basidiomata (3–5 cm in diam.; Yoshimi, 2002) and larger basidiospores (12–16 µm broad including surface ornamentation; Coccia et al., 1990). Another species having yellowish basidiomata, *S. sinnamariense* Mont. is also distinguished from *S. capeverdeanum* by its substipitate basidiomata and subreticulate basidiospores (Guzmán, 1970; Guzmán & Ovrebo, 2000). Although basidiospores of *S. cepa* are echinulate and it forms sometimes yellowish basidiomata, it is distinct from *S. capeverdeanum* because it has larger basidiomata (up to 4 cm broad; Guzmán, 1970), and thicker peridium (up to 3 mm; Coccia et al., 1990). Brownish scales on peridium appear in mature basidiomata of *S. capeverdeanum*. Although *S. verrucosum* (Bull.) Pers. also has similar verrucose scales on the peridium (Sims et al., 1995), it has larger basidiomata (up to 4 cm broad; Coccia et al., 1990; Guzmán, 1970) and larger basidiospores (11–15 µm in diam. including surface ornamentation; Yoshimi, 2002) than *S. capeverdeanum*.

Results of our phylogenetic analyses (Figs. 3, 4) show the monophyly of the present species, as indicated by Crous et al. (2016). Crous et al. (2016) reported that the holotype of *S. capeverdeanum* was collected under *Furcraea foetida* (L.) Haw. (Asparagaceae) and *Lantana camara* L. (Verbenaceae), and no relationships with *Eucalyptus* were shown in their original description. However, the ITS sequence of *S. capeverdeanum* from the root sample of *E. grandis* W. Hill in Cameroon (GenBank FR731681; Tedersoo et al., 2011) was identical with that of fruit body data (Fig. 3). In Cape Verde, there are exotic *Eucalyptus* plantations in wide range of islands in addition to introduced *F. foetida* and *L. camara* communities (Frahm et al., 1996). While it is unclear whether the mycorrhizal host of the present species is restricted to *Eucalyptus*, *S. capeverdeanum* presumably prefers the habitat dominated by eucalypt trees. Their potential association with *F. foetida* and *L. camara*, however, warrants further studies.

Based on the present ITS phylogeny (Fig. 3), *S. capeverdeanum* clusters with two sequences of root sample collected from *E. grandis* in China (GenBank HM237173 and HM237174), as *S. polyrhizum* (J.F. Gmel.) Pers. and *S. aurantium* (L.) Pers., and one sequence from Pakistan as *S. aurantium* (GenBank KF802172;

Bashir & Khalid, 2015), as a sister group. Moreover, phylogenetic tree of the LSU dataset (Fig. 4) shows that three sequences from Australia (GenBank EU718181; Wilson et al., 2011) as *Scleroderma* sp., and New Zealand (GenBank KP191692 and KP191693) as *S. radicans* Lloyd, are sister to *S. capeverdeanum*. Australian specimen housed at MEL (2295738A) is the voucher of EU718181, and it was collected on soil (grass nearby) under a rosaceous plant, *Prunus cerasifera* Ehrh. var. *atropurpurea* H. Jaeger. Although relationships between the above Australian specimen and any myrtaceous plants is not shown, KP191692 and KP191693 were obtained from two specimens (103558 and 103563 housed at PDD, respectively) identified as *S. radicans*, and both were collected from under *Leptospermum* (Myrtaceae) trees. These facts suggest that the *S. capeverdeanum* and its phylogenetically related taxa presumably have some type of preference to myrtaceous plants for their habitat. Although further studies on the ecological nature of *S. capeverdeanum* and its relatives are needed to clarify the relationship between them and their associated plants, we treat *S. capeverdeanum* as an introduced fungal species to Japan from outside because any native species of *Eucalyptus*, *Leptospermum*, *Furcraea* and *Lantana* are not known in the country. While it is unknown whether the origin of *S. capeverdeanum* is Cape Verde or not, this species was probably introduced to Japan from Australia with *E. globulus*. Further investigations of *Scleroderma* in worldwide eucalypt forests will demonstrate the origin and geographic distribution of *S. capeverdeanum*.

Acknowledgements

We are very much obliged to Ms. Kyung-Ok Nam and Ms. Megumi Otsuka of the National Museum of Nature and Science for help with assisting molecular experiments. We also thank Mr. Minoru Nakajima, Mr. Wajiro Yoshitake and Mr. Yoshinori Inaba for facilitating the fieldwork. We are grateful to Dr. Tamao Hatta of Chiba Institute of Science for his skillful technical assistance and for helpful suggestions to SEM observation. This work was supported by research grants from the committee of the introduced species management of Ibaraki Prefectural Government and the comprehensive surveys of plants, animals and geology in Ibaraki Prefecture of Ibaraki Nature Museum.

References

Baseia I.G., Silva B.D.B., Ishikawa N.K., Soares J.V.C., França I.F., Ushijima S., Maekawa N., Martín M.P. (2016) Discovery or extinction of new *Scleroderma* species in Amazonia? PLoS ONE 11: e0167879.
 Bashir H., Khalid A.N. (2015) Morpho-anatomical and molecular characterisation of ectomycorrhizae associated with *Eucalyptus* species

growing in different areas of the Punjab Province, Pakistan. Australian Journal of Botany 62: 689–697.
 Beaton G., Weste G. (1982) A new species of *Scleroderma* from Victoria, Australia. Transactions of the British Mycological Society 79: 41–43.
 Binder M., Bresinsky A. (2002) Derivation of a polymorphic lineage of Gasteromycetes from boletoid ancestors. Mycologia 94: 85–98.
 Binder M., Hibbett D.S. (2006) Molecular systematics and biological diversification of Boletales. Mycologia 98: 971–981.
 Coccia M., Migliozi V., Lavorato C. (1990) Studio sul genere *Scleroderma* Persoon. Bollettino dell'Associazione Micologia ed Ecologica Romana 20–21: 3–59.
 Crous P.W., Wingfield M.J., Richardson D.M., Le Roux J.J., Strasberg D., Edwards J., Roets F., Hubka V., Taylor P.W.J., Heykoop M., Martín M.P., Moreno G., Sutton D.A., Wiederhold N.P., Barnes C.W., Carlavilla J.R., Gené J., Giraldo A., Guarnaccia V., Guarro J., Hernández-Restrepo M., Kolařík M., Manjón J.L., Pascoe I.G., Popov E.S., Sandoval-Denis M., Woudenberg J.H.C., Acharya K., Alexandrova A.V., Alvarado P., Barbosa R.N., Baseia I.G., Blanchette R.A., Boekhout T., Burgess T.I., Cano-Lira J.F., Čmoková A., Dimitrov R.A., Dyakov M.Y., Dueñas M., Dutta A.K., Esteve-Raventós F., Fedosova A.G., Fournier J., Gamboa P., Gouliamova D.E., Grebenc T., Groenewald M., Hanse B., Hardy G.E.St.J., Held B.W., Jurjević Ž., Kaewgrajang T., Latha K.P.D., Lombard L., Luangsa-Ard J.J., Lysková P., Mallátová N., Manimohan P., Miller A.N., Mirabolfathy M., Morozova O.V., Obodai M., Oliveira N.T., Ordóñez M.E., Otto E.C., Paloi S., Peterson S.W., Phosri C., Roux J., Salazar W.A., Sánchez A., Sarria G.A., Shin H.-D., Silva B.D.B., Silva G.A., Smith M.Th., Souza-Motta C.M., Stchigel A.M., Stoilova-Disheva M.M., Sulzbacher M.A., Telleria M.T., Toapanta C., Traba J.M., Valenzuela-Lopez N., Watling R., Groenewald J.Z. (2016) Fungal Planet description sheets: 400–468. Persoonia 36: 316–458.
 Disyatat N.R., Yomyart S., Sihanonth P., Piapukiew J. (2016) Community structure and dynamics of ectomycorrhizal fungi in a dipterocarp forest fragment and plantation in Thailand. Plant Ecology & Diversity 9: 577–588.
 Edgar R.C. (2004a) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research 32: 1792–1797.
 Edgar R.C. (2004b) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC Bioinformatics 5: 113.
 Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783–791.
 Frahm J.P., Lindlar A., Sollman P., Fischer E. (1996) Bryophytes from the Cape Verde Islands. Tropical Bryology 12: 123–153.
 Giachini A.J., Oliveira V.L., Castellano M.A., Trappe J.M. (2000) Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brazil. Mycologia 92: 1166–1177.
 Gube M., Dörfelt H. (2012) Gasteromycetation in Agaricaceae s. l. (Basidiomycota): morphological and ecological implementations. Feddes Repertorium 122: 367–390.

- Guzmán G. (1970) Monografía del género *Scleroderma* Pers. emend. Fr. (Fungi-Basidiomycetes). Darwiniana 16: 233–407.
- Guzmán G., Ovrebo C.L. (2000) New observations on sclerodermataceous fungi. Mycologia 92: 174–179.
- Guzmán G., Cortés-Pérez A., Guzmán-Dávalos L., Ramírez-Guillén F., Sánchez-Jácome, M.R. (2013) An emendation of *Scleroderma*, new records, and review of the known species in Mexico. Revista Mexicana de Biodiversidad 84: 173–191.
- Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95–98.
- Hosaka K. (2009) Phylogeography of the genus *Pisolithus* revisited with some additional taxa from New Caledonia and Japan. Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B 35: 151–167.
- Hosaka K., Castellano M.A. (2008) Molecular phylogenetics of Geastrales with special emphasis on the position of *Sclerogaster*. Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B 34: 161–173.
- Hosaka K., Kasuya T., Reynolds H.T., Sung G.H. (2010) A new record of *Elaphomyces guangdongensis* (Elaphomycetaceae, Eurotiales, Fungi) from Taiwan. Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B 36: 107–115.
- Huang C., Zhang M., Wu X.-L., Wu G., Xu J.-P., Yang Z.L., Li Y.-C. (2021) Cyanescent *Gyroporus* (Gyroporaceae, Boletales) from China. MycoKeys 81: 165–183.
- Inuma T., Kansako M., Nakashima C. (2015) Leaf and shoot blight of *Eucalypts* caused by *Pseudoplagiostoma eucalypti* (in Japanese with English summary). Tree and Forest Health 19: 133–138.
- Kanchanaprayudh J., Zhou Z., Yomyart S., Sihanonth P., Hogetsu T. (2003) Molecular phylogeny of ectomycorrhizal *Pisolithus* fungi associated with pine, dipterocarp, and eucalyptus trees in Thailand. Mycoscience 44: 287–294.
- Kasuya T., Guzmán G. (2007) *Veligaster nitidum*, a pantropical sclerodermataceous fungus new to Japan and Thailand. Mycoscience 48: 259–262.
- Kasuya T., Guzmán G., Ramírez-Guillén F., Kato T. (2002) *Scleroderma laeve* (Gasteromycetes, Sclerodermatales), new to Japan. Mycoscience 43: 475–476.
- Kasuya T., Hosaka K., Uno K., Kakishima M. (2012) Phylogenetic placement of *Geastrum melanocephalum* and polyphyly of *Geastrum triplex*. Mycoscience 53: 411–426.
- Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16: 111–120.
- Komaki H., Okamura A., Sayeki M., Niwa Y., Sonoda Y. (2000) The chemical composition of *Eucalyptus* leaves and palatability of Koala (*Phascolarctos cinereus*). Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine 5: 127–132. (in Japanese with English summary)
- 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.
- Louzan R., Wilson A.W., Binder M., Hibbett D.S. (2007) Phylogenetic placement of *Diplocystis wrightii* in the Sclerodermatales (Boletales) based on nuclear ribosomal large subunit DNA sequences. Mycoscience 48: 66–69.
- Mrak T., Kühdorf K., Grebenc T., Štraus I., Münzenberger B., Kraigher H. (2017) *Scleroderma areolatum* ectomycorrhiza on *Fagus sylvatica* L. Mycorrhiza 27: 283–293.
- Nara K. (2006) Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. New Phytologist 169: 169–178.
- Nouhra E.R., Caffot M.L.H., Pastor N., Crespo E.M. (2012) The species of *Scleroderma* from Argentina, including a new species from the *Nothofagus* forest. Mycologia 104: 488–495.
- Ortiz-Rivero J., Watling R., Guzmán-Dávalos L., Martín M.P. (2021) The many-rooted earthball—*Scleroderma geaster* and *S. polyrhizum* revisited, with the description of a new species. Phytotaxa 510: 1–17.
- Phosri C., Martín M.P., Sihanonth P., Whalley A.J.S., Watling R. (2007) Molecular study of the genus *Astraeus*. Mycological Research 111: 275–286.
- Phosri C., Martín M.P., Watling R., Jeppson M., Sihanonth P. (2009) Molecular phylogeny and re-assessment of some *Scleroderma* spp. (Gasteromycetes). Anales del Jardín Botánico de Madrid 66(S1): 83–91.
- Phosri C., Martín M.P., Suwannasai N., Sihanonth P., Watling R. (2012) *Pisolithus*: a new species from southeast Asia and a new combination. Mycotaxon 120: 195–208.
- Rose R.W.Jr., Dyke C.G.V., Davey C.B. (1981) Scanning electron microscopy of three types of ectomycorrhizae formed on *Eucalyptus nova-anglica* in the southeastern United States. Canadian Journal of Botany 59: 683–688.
- Sanon K.B., Bâ A.M., Delaruelle C., Duponnois R., Martin F. (2009) Morphological and molecular analyses in *Scleroderma* species associated with some Caesalpinoid legumes, Dipterocarpaceae and Phyllanthaceae trees in southern Burkina Faso. Mycorrhiza 19: 571–584.
- Sene S., Avril R., Chaintreuil C., Geoffroy A., Ndiaye C., Diedhiou A.G., Sadio O., Courtecuisse R., Sylla S.N., Selosse M.A., Bâ A.M. (2015) Ectomycorrhizal fungal communities of *Coccoloba uvifera* (L.) L. mature trees and seedlings in the neotropical coastal forests of Guadeloupe (Lesser Antilles). Mycorrhiza 25: 547–559.
- Seutin G., White B.N., Boag P.T. (1991) Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. Canadian Journal of Zoology 69: 82–90.
- Shibata N., Yoshikawa K. (1956) Some experimental considerations of silviculture of *Eucalyptus* (1). On the effect of the soil types and manure upon the growth of *Eucalyptus rostrata* seedlings. Bulletin of the Kyoto University Forests 26: 1–9. (in Japanese with English summary)
- Siri-in J., Kumla J., Suwannarach N., Lumyong S. (2014) Culture conditions and some properties of pure culture of ectomycorrhizal

- fungus, *Scleroderma sinnamariense*. Chiang Mai Journal of Science 41: 275–285.
- Sims K.P., Watling R., Jeffries P. (1995) A revised key to the genus *Scleroderma*. Mycotaxon 56: 403–420.
- Swofford, D.L. (2002) PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). MA Sinauer Associates, Sunderland.
- 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.
- Tedersoo L., Bahram M., Jairus T., Bechem E., Chinoya S., Mpumba R., Leal M., Randrianjohany E., Razafimandimbison S., Sadam A., Naadel T., Kõljalg, U. (2011) Spatial structure and the effects of host and soil environments on communities of ectomycorrhizal fungi in wooded savannas and rain forests of Continental Africa and Madagascar. Molecular Ecology 20: 3071–3080.
- Vilgalys R., Hester M. (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified DNA from several *Cryptococcus* species. Journal of Bacteriology 172: 4238–4246.
- Walbert K., Ramsfield T.D., Ridgway H.J., Jones E.E. (2010) Ectomycorrhizal species associated with *Pinus radiata* in New Zealand including novel associations determined by molecular analysis. Mycorrhiza 20: 209–215.
- Watling R. (2006) The sclerodermatoid fungi. Mycoscience 47: 18–24.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. (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, New York, pp. 315–322.
- Wilson A.W., Binder M., Hibbett D.S. (2011) Effects of gasteroid fruiting body morphology on diversification rates in three independent clades of fungi estimated using binary state speciation and extinction analysis. Evolution 65: 1305–1322.
- Yoshimi S. (2002) Taxonomic study of the Japanese taxa of *Scleroderma* Pers. Nippon Kingakukai Kaiho 43: 3–18. (in Japanese with English summary)
- Zhang C., Xu X.-E., Liu J., He M., Wang W., Wang Y., Ji K. (2013) *Scleroderma yunnanense*, a new species from South China. Mycotaxon 125: 193–200.
- Zhang Y.-Z., Sun C.-Y., Sun J., Zhang K.-P., Zhang H.-S., Guo X., Zhou Y.-J., Zheng D.-S., Li H.-J. (2020) *Scleroderma venenatum* sp. nov., *S. venenatum* var. *macrosporum* var. nov. and *S. suthepense* new to China. Phytotaxa 438: 107–118.

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

地下生担子菌 *Hymenogaster citrinus*（ハラタケ目ヒメノガステル科）の 日本初記録

First report of a hypogeous basidiomycete, *Hymenogaster citrinus* (Agaricales, Hymenogastraceae) from Japan

大前 宗之^{1*}, 山本 航平², 橋本 陽³, 大熊 盛也³

Muneyuki Ohmae^{1*}, Kohei Yamamoto², Akira Hashimoto³, Moriya Ohkuma³

¹ 株式会社北研, 〒321-0222 栃木県下都賀郡壬生町駅東町 7-3

Hokken Co. Ltd., 7-3 Ekihigashimachi, Mibu-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 321-0222, Japan

² 栃木県立博物館, 〒320-0865 栃木県宇都宮市睦町 2-2

Tochigi Prefectural Museum, 2-2 Mutsumi-cho, Utsunomiya-shi, Tochigi, 320-0865, Japan

³ 国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室, 〒305-0074 茨城県つくば市
高野台 3-1-1

Microbe Division / Japan Collection of Microorganisms RIKEN BioResource Research Center, 3-1-1 Koyadai, Tsukuba-shi, Ibaraki, 305-0074, Japan

* 主著者 (Corresponding author)

E-mail: trick.dontokoi.fungi@gmail.com

要旨

栃木県の石灰岩の分布域における地下生菌調査において、石灰岩の露出する斜面に生育したコナラ、シデ属の樹下より外皮が黄色を帯びるヒメノガステル属の子実体を採集した。形態観察および核リボソーム DNA の internal transcribed spacer 領域を用いた分子系統解析の結果、本菌を *Hymenogaster citrinus*（和名：レモンツブタケ [新称]）と同定した。本種の国内における報告は初である。

Abstract

During our field survey of hypogeous fungi, we found yellowish basidiomata of *Hymenogaster* species in Tochigi Prefecture, central Honshu, Japan. They occurred on calcareous soil under *Quercus serrata* and *Carpinus* sp. in a limestone area. Based on the morphological observation and molecular phylogenetic analysis using internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA, we identified the basidiomata as *Hymenogaster citrinus*. This is the first record of the species from Japan.

Article Info: Submitted: 10 February 2022 Accepted: 19 March 2022 Published: 31 March 2022

序論

ヒメノガステル属 *Hymenogaster* Vittad. は地下生菌よりなる分類群であり、地上生のワカフサタケ属 *Hebeloma* (Fr.) P. Kumm.、ヒメムサシタケ属 *Alicicola* Kühner, *Psathyroma* Soop, J.A. Cooper & Dima および地下生の *Wakefieldia macrospora* (Hawker) Hawker とともにハラタケ目ヒメノガステル科（担子菌門）に属する

(Kaounas et al., 2011; Soop et al., 2016)。本属は北半球（ヨーロッパ [Montecchi & Sarasini, 2000; Soehner, 1962]、北米 [Dodge & Zeller, 1934; Smith, 1966; Trappe et al., 2009]、アジア [Liu, 1998; 吉見・本郷, 1986]）を中心に分布し、ブナ科、マツ科、カバノキ科、シナノキ科、ヤナギ科などの樹木と外生菌根共生を営む (Csizmár et al., 2021; Stielow et al., 2011; Tedersoo et al., 2010;

Trappe et al., 2009)。本属は多数の種を含み、Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/>、2021年12月4日閲覧)において186分類群(種、変種および品種)が記録されている。しかし、本属は多数の後行シノニムを含むことに加え (Stielow et al., 2011)、これらの分類群の中には、現在ではハラタケ目、イグチ目、ラッパタケ目、ヒステランギウム目、ベニタケ目にまたがるさまざまな属に編入された種も多く含まれる (Smith et al., 2018)。

日本においてヒメノガステル属は、マメツブタケ *H. arenarius* Tul. & C. Tul. (Dodge & Zeller, 1937; Hennings, 1903 [*H. suzukianus* Henn. として]; 小林, 1938; 吉見・本郷, 1986)、シロツブタケ *H. tener* Berk. (吉見, 2008; 吉見・高山, 1986)、サザレイシタケ *H. pacificus* Kobayasi (Kobayasi, 1937; 小林, 1938; 吉見, 1971, 2008)、オオミノシヨウロタケモドキ *H. fusisporus* (Masse & Rodway) G. Cunn. (吉見, 1973, 1993, 2008) および *H. ozeensis* Kobayasi (小林, 1979) の5種が記録されている (勝本, 2010)。このうち日本産 *H. fusisporus* は、吉見氏により最初 *Hysterangium stoloniferum* Tul. & C. Tul. として報告後 (吉見, 1973)、*H. fusisporus* と再同定され (吉見, 1993)、さらに *Hys. affine* Masse & Rodway と再々同定されており (吉見ほか, 2002)、学名が定まっていない。しかし、本種はグレバに寒天質の組織が存在し、子実体基部から根状菌糸束が生じるなどの特徴から (吉見, 1973)、ヒメノガステル属ではなく、ヒステランギウム目の一種と推定される。また、*H. ozeensis* の担子胞子は小型 (8–11 × 3–4 μm)、平滑で、稀に分岐するとして記載されていることから (小林, 1979)、メラノガステル属 *Melanogaster* 等のヒダハタケ科の地下生菌が疑われる。よって現在、狭義のヒメノガステル属として認められる日本産本属菌は、*H. arenarius*、*H. pacificus*、*H. tener* の3種と推定される。これらに加え、佐々木ほか (2016) は本属未同定種3種を報告し (*Hymenogaster* spp. 1–3)、このうち、*Hymenogaster* sp. 1 については *H. niveus* Vittad. と同種の可能性を示唆している。学名が付与された3種および佐々木ほか (2016) の本属未同定種は、いずれもおおよそ長径 20 μm 以下の担子胞子を有する。

筆者ら (大前・山本) は栃木県内の石灰岩分布地域における地下生菌調査を実施中、外皮が黄色を帯びるヒメノガステル属菌を採集した。予備的な顕微鏡観察において、本菌は担子胞子の大部分が長径 20 μm を超えていたことから、本邦未報告種であることは明白であった。そこで詳細な形態的観察および分子系統解析を実施した結果、本菌を日本新産種 *H. citrinus* Vittad. と同定したので、ここに報告する。

材料および手法

新鮮な子実体およびその乾燥標本を顕微鏡観察に供試した。剃刀を使用して作成した徒手切片は、水 (水道水)、5% 水酸

化カリウム水溶液 (5% KOH) あるいはラクトグリセロール (水 : グリセロール : 乳酸 = 1:1:1 (v/v/v)) で封入し、プランアクロマート対物レンズを装着した光学顕微鏡 (BX50、オリンパス、東京) で観察した。なお、乾燥標本より観察する際は、70% エタノールで脱気後、5% KOH に5分間以上浸漬し、組織を膨潤させた後に観察した。組織は顕微鏡のカメラ用鏡筒に取り付けた一眼レフカメラ (D5100、ニコン、東京) で撮影し、PhotoRuler ver. 1.1 (<http://www.inocybe.info/>) を用いてサイズを計測した。担子胞子の長径と短径の比率は Q 値で示した。生標本は食品乾燥機で温風乾燥、または凍結乾燥機で凍結乾燥を行い、栃木県立博物館 (TPM) および神奈川県立生命の星・地球博物館 (KPM) の菌類標本庫に収蔵した。

DNA はグレバ組織より、Izumitsu et al. (2012) の方法に従い抽出した。本菌の核リボソーム DNA の internal transcribed spacer (ITS) 領域 (ITS1-5.8S-ITS2) は、V9G (de Hoog & Gerrits van den Ende, 1998) /LR5 (Vilgalys & Hester 1990) のプライマーペアを用い、PCR により増幅した。PCR には、2 × Buffer for KOD FX Neo 12.5 μL (東洋紡、東京)、2 mM dNTPs 5 μL、各プライマー (20 pM) 1 μL、超純水 3 μL、0.5 μL KOD FX Neo (東洋紡)、鋳型 DNA 2 μL の計 25 μL を混合し、反応液とした。反応液はサーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700、Applied Biosystems、マサチューセッツ、アメリカ) を用い、次のサイクル条件で PCR を実行した—94°C 2分 変性 (1 サイクル); 98°C 10秒 変性、55°C 30秒 アニーリング、68°C 1分 伸長 (35 サイクル); 68°C 7分 伸長 (1 サイクル)。得られた PCR 産物は FastGene Gel/PCR Extraction kit (日本ジェネティクス、東京) を用い、説明書に従い精製した。精製した DNA は BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher、ウォリントン、イギリス) を用い、PCR と同じプライマーおよび内部プライマーの ITS2、ITS3 (White et al., 1990) を用いてサイクルシーケンスを実施後、SeqStudio (ThermoFisher) によりサンガーシーケンスを行った。得られた塩基配列は NCBI (National Center for Biotechnology Information) に登録した (アクセッション番号 OM438164)。

日本産標本の塩基配列は NCBI BLAST 検索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) に供試し (Altschul et al., 1990)、INSD (International Nucleotide Sequence Databases) に登録された本菌に近縁な塩基配列 (相同性 ≥ 95%) を多数取得した。これらに加え、Stielow et al. (2011) によるヨーロッパ産 *Hymenogaster* 属菌の分類学的改訂において使用された塩基配列を多数追加し、分子系統解析用のデータセットとした (表 1)。データセットは MAFFT ver. 7.490 (Katoh & Standley, 2013; <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) の L-INS-i アルゴリズムによるマルチプルアライメントを実行後、SeaView ver. 4 (Galtier et al., 1996) を用いて手動で修正した。最終的なデータセット (669 bp)

表 1. 分子系統解析に用いた塩基配列（本研究で取得した配列は太字で示した）

Table 1. Sequences used for phylogenetic analysis (sequence obtained in this study is indicated in bold)

Species	Country	Putative host listed in the original literature	GenBank Accession number	Reference
<i>Hymenogaster bulliardii</i>	Germany	<i>Quercus</i> sp.	GU479273	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster bulliardii</i>	Hungary	<i>Quercus cerris</i>	GU479361	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Hungary	<i>Tilia tomentosa</i>	MW354971	Csizmár et al. 2021
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Hungary	<i>Quercus robur</i>	GU479313	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Hungary	<i>Tilia tomentosa</i>	MW354969	Csizmár et al. 2021
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Hungary	<i>Quercus robur</i> , <i>Populus alba</i>	GU479296	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Hungary	<i>Corylus avellana</i>	GU479329	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Hungary	<i>Quercus robur</i>	GU479347	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Hungary	<i>Quercus robur</i>	GU479337	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Hungary	<i>Carpinus betulus</i>	GU479317	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Germany	<i>Tilia</i> sp.	GU479270	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Germany	<i>Quercus</i> sp.	GU479284	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Germany	<i>Fagus sylvatica</i>	GU479280	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Germany	<i>Carpinus betulus</i>	GU479285	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Germany	<i>Carpinus betulus</i>	GU479248	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Germany	<i>Carpinus betulus</i>	GU479279	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Germany	<i>Carpinus betulus</i>	GU479247	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster citrinus</i>	United Kingdom	-	EU784360	Brock et al. 2009
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Germany	<i>Quercus</i> sp.	GU479283	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Hungary	-	GU479360	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster citrinus</i>	Japan	<i>Quercus serrata</i> , <i>Carpinus</i> sp.	OM438164	This study
<i>Hymenogaster griseus</i>	Hungary	<i>Carpinus betulus</i> , <i>Quercus robur</i> , <i>Quercus cerris</i>	GU479358	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster griseus</i>	Hungary	<i>Carpinus betulus</i> , <i>Quercus cerris</i>	GU479336	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster intermedius</i>	Hungary	<i>Tilia platyphyllos</i> , <i>Carpinus betulus</i> , <i>Quercus petraea</i> , <i>Corylus avellana</i>	GU479300	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster luteus</i> var. <i>luteus</i>	Hungary	<i>Carpinus betulus</i>	GU479302	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster luteus</i> var. <i>subfuscus</i>	Hungary	<i>Carpinus betulus</i> , <i>Fagus sylvatica</i> , <i>Quercus petraea</i> , <i>Tilia platyphyllos</i>	GU479334	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster megasporus</i>	Hungary	<i>Pinus sylvestris</i>	GU479352	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster olivaceus</i>	Spain	-	AF325642	Peinter et al. 2001
<i>Hymenogaster pruinatus</i>	Hungary	<i>Quercus pubescens</i>	GU479308	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster raphanodorus</i>	USA	<i>Quercus douglasi</i> , <i>Pinus sabiniana</i> , <i>Arctostaphylos</i> spp.	AY945302	Smith et al. 2005
<i>Hymenogaster rehsteineri</i>	Hungary	<i>Carpinus betulus</i> , <i>Ulmus glabra</i>	GU479305	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster rehsteineri</i>	Hungary	<i>Picea abies</i>	GU479363	Stielow et al. 2011
<i>Hymenogaster</i> sp.	Poland	-	JX559775	unpublished
<i>Hymenogaster</i> sp.	USA	-	MZ919198	unpublished
<i>Hymenogaster</i> sp.	USA	-	FJ789604	Gladish et al. 2010
<i>Hymenogaster subalpinus</i>	USA	-	AF325640	Peinter et al. 2001
<i>Hymenogaster thwaitesii</i>	Germany	<i>Sambucus nigra</i>	GU479265	Stielow et al. 2011
"Environmental sample as mycosymbiont of <i>Epipactis helleborine</i> "	Czech Republic	<i>Epipactis helleborine</i>	GU327479	Těšitelová et al. 2012
"Environmental sample as mycosymbiont of <i>Cephalanthera damasonium</i> "	Germany	<i>Cephalanthera damasonium</i>	AY634136	Bidartondo et al. 2004
"Environmental sample from soil"	Italy	<i>Quercus pubescens</i>	JF926963	Belfiori et al. 2011
"Environmental sample from soil"	Italy	<i>Quercus pubescens</i>	JF926964	Belfiori et al. 2011
"Environmental sample from soil"	France	-	FN397318	Napoli et al. 2010

は raxmlGUI 1.5 (Silvestro & Michalak, 2012) を用いた最尤法による分子系統解析に供試した。データセットは ITS1、5.8S、ITS2 の 3 領域に分割し、塩基置換モデルには GTR+GAMMA モデルを用いた。外群には *H. intermedius* Stielow, Bratek & Hensel および *H. rehsteineri* Bucholtz を用い、1,000 回のブートストラップ解析 (ML rapid bootstrap) により各枝の信頼性 (MLBS) を算出した。得られた系統樹は FigTree v.1.4.3 (Rambaut, 2016)

で表示し、Affinity Designer (Serif Europe、ノッティンガム、イギリス) で編集した。

結果および考察

日本産標本 (図 1) は黄色を帯びる外皮、果実様の甘い芳香を放つグレバ、大型 (長径 20 μm 以上) で、褐色、しわ状、いぼ状またはうね状のオーナメントを持つ担子胞子をそれぞれ有

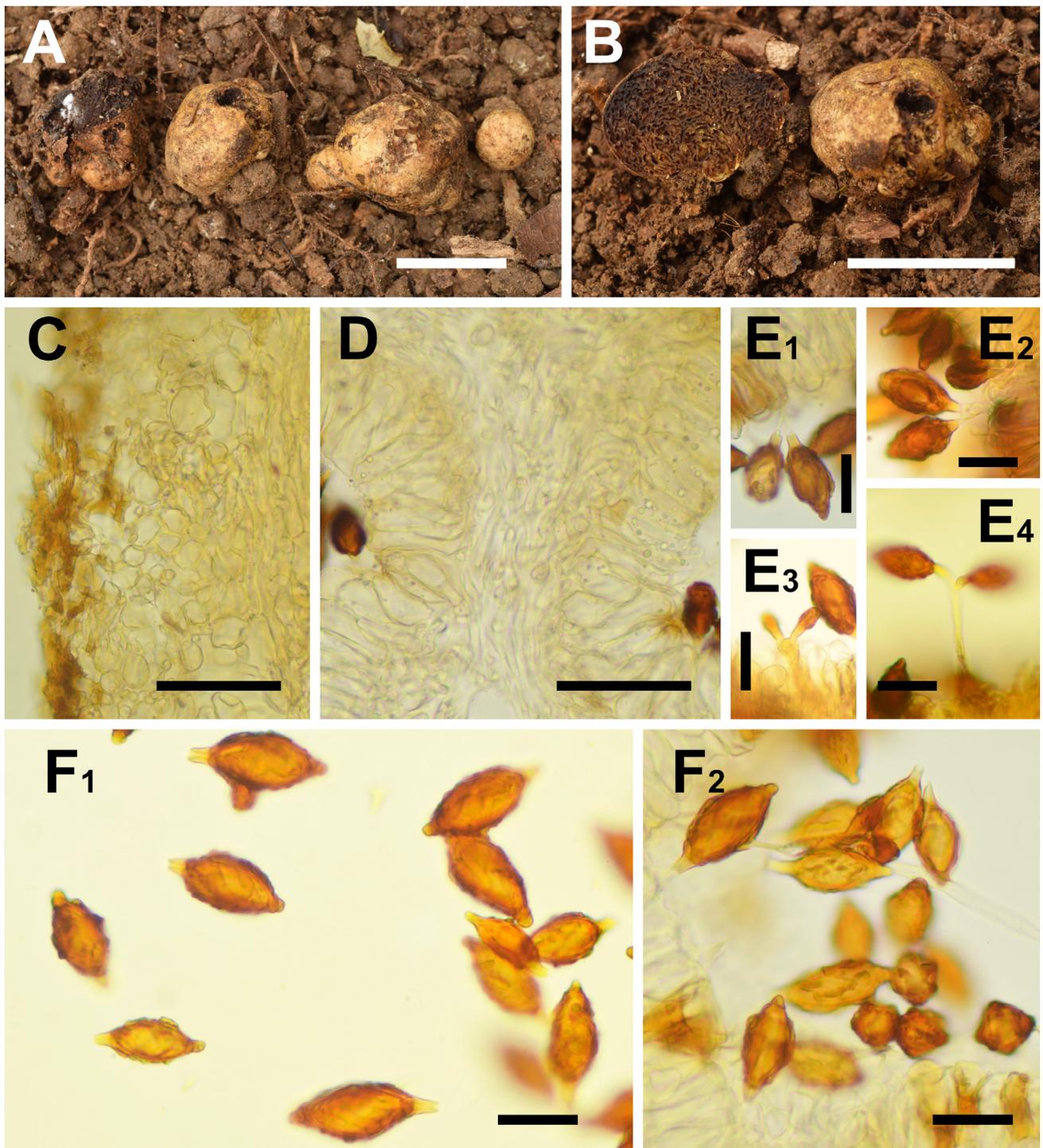


図 1. 日本産 *Hymenogaster citrinus* (MO1219). C-E および F₁ は 5% KOH, F₂ はラクトグリセロールで封入. A-B : 子実体. C : 外皮. D : 子実層および基層板. E : 担子器. F. 担子孢子. スケールバー : A-B = 5 mm; C-D = 50 μm; E-F = 20 μm.

Fig. 1. Japanese *Hymenogaster citrinus* (MO1219). C-E and F₁ were mounted with 5% KOH. F₂ was mounted with lacto-glycerol. A-B. Basidiomata; C. Peridium; D. Hymenophore and tramal plate; E. Basidia with two sterigmata. Basidia were mostly collapsed possibly due to autolysis; F. Basidiospores. Scale bars: A-B = 5 mm; C-D = 50 μm; E-F = 20 μm.

していた。本特徴は Stielow et al. (2011) が分子情報に基づいた解析とともに改訂した *H. citrinus* の特徴とよく一致した。ヒメノガステル属菌は成熟が進むにつれて担子器が崩壊することが知られ (Hawker, 1954)、日本産標本においても自己融解が原因と推定される細胞の崩壊がほぼ全ての担子器で認められた。そのため、担子器の形状や大きさの観察は困難であったが、2 胞

子性であることは確認された (図 1E)。本種が主に 2 胞子性であることは、Dodge & Zeller (1934)、Hawker (1954)、Soehner (1962)、Pegler et al. (1993) などにより述べられている。

分子系統解析の結果、日本産標本は Stielow et al. (2011) により *H. citrinus* として同定された標本を多数含む、統計的に高く支持されたクレードに内包された (図 2 ; MLBS = 86%)。

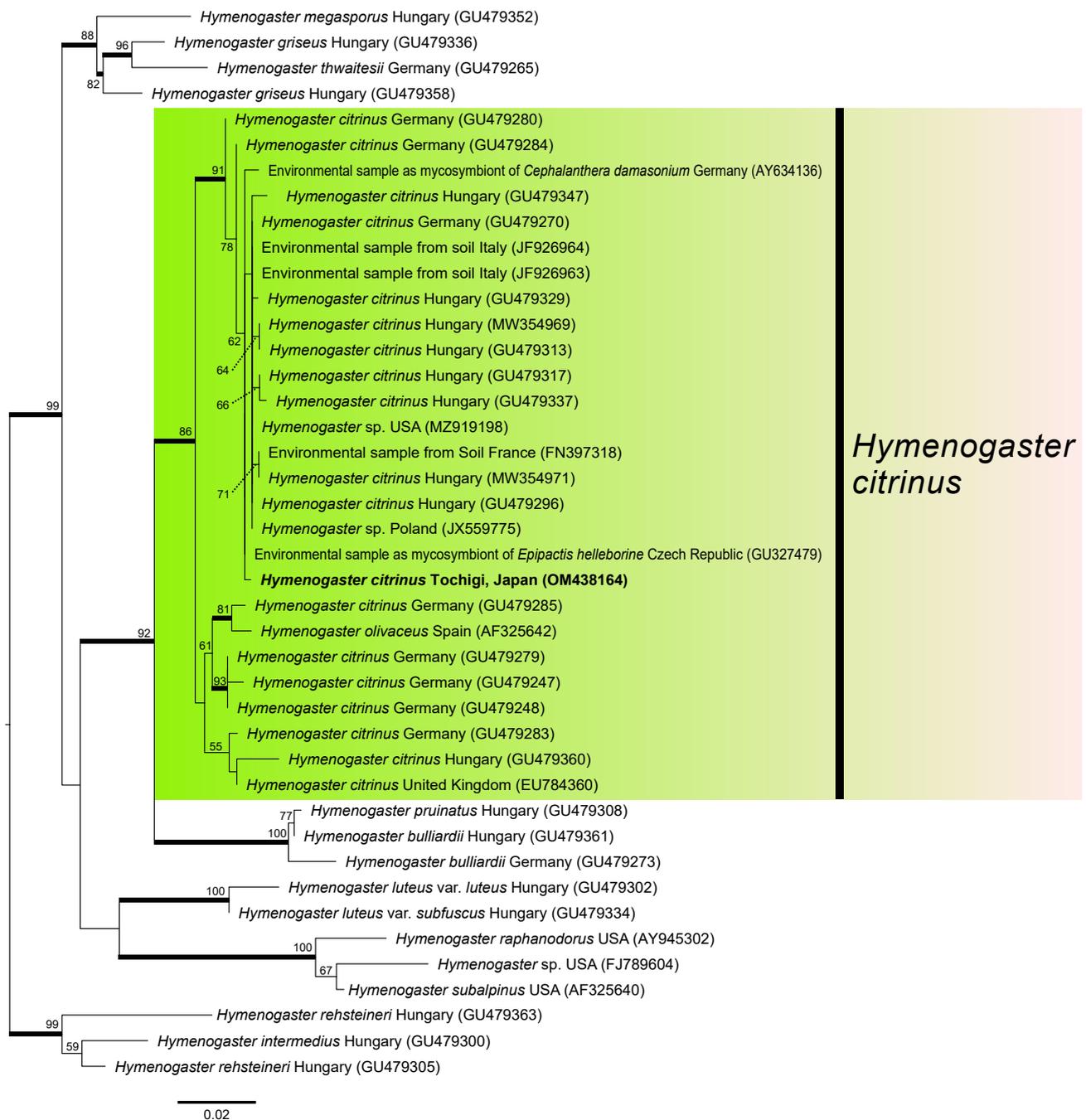


図 2. *Hymenogaster citrinus* および近縁種の ITS 領域を用いた最尤法系統樹 (最大対数尤度 -2241.924131)。ノードに最尤法によるブートストラップ値 (≥ 50%) を示した。信頼性の高い枝 (≥ 80%) は太線で示した。

Fig. 2. Maximum likelihood (ML) phylogeny of *Hymenogaster citrinus* and its allied taxa based on internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA. The tree with highest log likelihood (-2241.924131) is shown. ML Bootstrap values ≥ 50% are shown in nodes. Thickened branches indicate strong ML bootstrap support (≥ 80%).

また、日本産標本はハンガリー産 *H. citrinus* (GU479296、MW354971) などと非常に高い相同性 (≥ 99.4%) を示した。本クレードは主にヨーロッパ産子実体標本により構成され、一部にはアメリカ産標本 (MZ919198)、土壌由来の環境配列 (JF926963、JF926964、FN397318) および、ラン科植物の菌根菌として検出された配列 (AY634136、GU327479) も含まれていた。

以上の形態的な類似性および分子系統解析に基づき、日本産標本を *H. citrinus* と同定した。本報告は、*H. citrinus* の日本

初記録である。

ヒメノガステル属は同一種内における標本間の形態的な変異が大きく、これが従来、形態的な分類において多くの議論を生むと同時に、多くのシノニムを生む要因となっている (Montecchi & Sarasini, 2000 ; Soehner, 1962 ; Stielow et al., 2011)。*Hymenogaster citrinus* も例外ではなく、Stielow et al. (2011) は本種のシノニム、あるいはシノニムと疑われる種として *H. bucholtzii* Soehner、*H. olivaceus* Vittad.、*H. tomentellus*

R. Hesse, *H. sulcatus* R. Hesse を挙げている。従来、*H. citrinus* の肉眼的な大きな特徴として、外皮が黄色を帯びることが挙げられ、白色の種は *H. olivaceus* として、しばしば区別されてきた (Montecchi & Sarasini, 2000 ; Pegler et al., 1993)。しかし、Stielow et al. (2011) は分子情報に基づいた解析により、*H. olivaceus* を *H. citrinus* に含め、外皮の色が変化に富む理由について、発生環境の土壌の種類および子実体の発生時期の違いの影響を挙げている。Stielow et al. (2011) は本種が石灰粘土質土壌で発生した場合において外皮が黄色を帯びるとしており、日本産標本も同様に石灰粘土質土壌より採集されたため、この推定を支持する結果となった。さらに、Stielow et al. (2011) は大きな変異幅がみられる本種の特徴として、匂いと胞子のオーナメントを挙げている。匂いは果実臭から不快な匂いをするものまで幅があり、彼らは子実体内の季節的な細菌叢の違いが影響を与えているのではないかと推定している。担子胞子のオーナメントについては、オーナメントを含む外壁 (perisporium) を欠く担子胞子を有する本種標本が確認されており、典型的ないぼおよびしわ状のオーナメントから連続的な変異が見られるとしている。なお、日本産標本は黄色を帯びる外皮に加え、果実臭があり、担子胞子はしわ状、いぼ状のオーナメントを有しており、典型的な特徴の *H. citrinus* であった。

Hymenogaster citrinus (基準産地 イタリア; Vittadini, 1831) はヨーロッパ (Montecchi & Sarasini, 2000; Soehner, 1962)、北米 (Dodge & Zeller, 1934)、アジア (Liu, 1998 ; Liu & Tao, 1988 ; 本研究) に分布するが、ヨーロッパ以外からの情報、分布は限定的である。ヒメノガステル属菌は日本で最も頻繁に見つかる地下生菌の一つである。しかし、*H. citrinus* は特徴的な外観および担子胞子を有するにも関わらず、これまで報告がなかったことから、本種は日本においては稀産種と推定される。日本産標本は石灰岩の分布地に生育したコナラ、シデ属樹下より採集されており、本菌は石灰質土壌を好む可能性がある。ヨーロッパにおいて本種はさまざまな種類の土壌から発生するが、前述の通り外皮が黄色を帯びる典型的な *H. citrinus* は石灰質土壌で主に採集されている (Hawker, 1954 ; Montecchi & Sarasini, 2000 ; Pegler et al., 1993 ; Stielow et al. 2011)。石灰岩を基岩とする地域は採石場として開発されやすく、外生菌根性の樹木が生育する石灰岩地域の保全は、これらと共生する外生菌根菌を保全する上で重要である。

分類

Hymenogaster citrinus Vittad., Monogr. Tuberac. (Milano): 21 (1831) [Mycobank ID: MB217699]

図 1.

肉眼的特徴：子実体 (図 1A–B) は 5–15 × 5–11 mm、類球形から扁球形、ときに部分的に窪むことにより、やや不規則な形状となり、肉質で無性基部を欠く。外皮は淡黄色から黄褐色、赤褐色から暗褐色の繊維状の圧着した菌糸が覆う。グレバ (図

1B) は暗褐色からほぼ黒色、部分的に鮮黄色に着色し、基層板が密に折りたたまれ、多数の迷路状の小室を形成する。果実臭の匂いをもつ。

顕微鏡的特徴：外皮 (図 1C) は外層および内層の 2 層、あるいは、内層を欠き 1 層により構成される。外層は厚さ 19.1–41.2 μm、褐色から暗褐色の菌糸が錯綜する。内層は厚さ 38.9–65.7 μm、類球形からやや角ばった細胞により構成され、細胞は 3.9–30.9 × 4.5–16.8 μm、壁は無色から淡黄褐色でやや厚壁 (約 1 μm)。基層板 (図 1D) は幅 32.1–60.3 μm、ゆるく錯綜した菌糸によって構成され、菌糸は幅 2.9–5.4 μm、無色、薄壁。偽担子器は 24.9–40.5 × 10.5–14.1 μm、こん棒型、フラスコ型または円筒形、通常無色、稀に淡褐色から褐色に着色する。担子器 (図 1E) は 2 孢子性、大半は自己融解 (autolysis) が原因と推定される消失または著しい変形が認められたためサイズは未計測。担子胞子 (図 1F) は (18.7–) 26.3–35 (–39.3) × (8.1–) 10.2–14.9 μm (平均値±標準偏差 : 30.7 ± 4.0 × 12.1 ± 1.5 μm ; オーナメントおよびくちばし状突起を含む)、Q = 2.0–3.1 (平均値 2.6)、紡錘形から長紡錘形、ときにレモン型、先端はしばしば乳頭状に突出し、基部は顕著なくちばし状突起 (長さ 3–7 μm) が付属する。担子壁は琥珀色で平滑、表面を褐色で不規則なしわ状、いぼ状、うね状のオーナメントを有する担子外壁に覆われる。全ての組織においてかすがい連結を欠く。

和名：レモンツブタケ (新称)。種小名 *citrinus* はレモン色を意味し、日本産標本も外皮が黄色を帯びることに由来する。

分布：ヨーロッパ (例 : Stielow et al., 2011 ; Vittadini, 1831)、北米 (Zeller & Dodge, 1938)、中国 (Liu, 1998 ; Liu & Tao, 1988)、日本 (本研究)。

供試標本：栃木県鹿沼市、石灰岩地域に生育したコナラおよびシデ属樹下の石灰質土壌上のリター下、2021 年 11 月 20 日、大前宗之・山本航平採集、MO1219、TPM-M-9844 (重複標本 KPM-NC 29306)。

謝辞

本研究を行うにあたり、貴重な文献をご提供いただいた国立科学博物館の保坂健太郎博士、ならびに標本収蔵を快くお引き受け頂いた、神奈川県立生命の星・地球博物館の折原貴道博士に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.
- Belfiori B., Riccioni C., Tempesta S., Pasqualetti M., Paolucci F., Rubini A. (2012) Comparison of ectomycorrhizal communities in natural and cultivated *Tuber melanosporum* truffle grounds. *FEMS Microbiology Ecology* 81: 547–561.

- Bidartondo M.I., Burghardt B., Gebauer G., Bruns T.D., Read D.J. (2004) Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271: 1799–1806.
- Brock P. M., Döring H., Bidartondo M.I. (2009) How to know unknown fungi: the role of a herbarium. *New Phytologist* 181: 719–724.
- Csizmár M., Péter C., Dima B., Orlóci L., Bratek Z. (2021) Macrofungi of urban *Tilia avenues* and gardens in Hungary. *Global Ecology and Conservation* 28: e01672.
- de Hoog G.S., Gerrits van den Ende A.H.G. (1998) Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. *Mycoses* 41: 183–189.
- Dodge C.V., Zeller S.M. (1934) *Hymenogaster* and related genera. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 23: 565–598.
- Galtier N., Gouy M., Gautier C. (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 543–548.
- Gladish S., Frank J., Southworth D. (2010) The serpentine syndrome below ground: ectomycorrhizas and hypogeous fungi associated with conifers. *Canadian Journal of Forest Research* 40: 1671–1679.
- Hawker L.E. (1954) British hypogeous fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Ser. B, Biological Sciences* 237: 429–546.
- Hennings P. (1903) *Fungi Japonici III*. *Botanische Jahrbücher für Systematik Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* herausgegeben von A. Engler 32: 34–46.
- Izumitsu K., Hatoh K., Sumita T., Kitade Y., Morita A., Tanaka C., Gafur A., Ohta A., Kawai M., Yamanaka T., Neda H., Ota Y. (2012) Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience* 53: 396–401.
- Kaounas V., Assyov B., Alvarado P. (2011) New data on hypogeous fungi from Greece with special reference to *Wakefieldia macrospora* (Hymenogastraceae, Agaricales) and *Geopora clausa* (Pyronemataceae, Pezizales). *Mycologia Balcanica* 8: 105–113.
- Katoh K., Standley D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- Kobayasi Y. (1937) *Fungi Austro-Japoniae et Micronesiae*. I. *The Botanical Magazine* 51: 749–758.
- 小林義雄 (1938) 大日本植物誌 2 ヒメノガスター亜目及スツボンタケ亜目. 三省堂, 東京.
- 小林義雄 (1979) 尾瀬産地下生菌. *植物研究雑誌* 54: 371–373.
- 勝本 謙 (2010) 日本産菌類集覧. 日本菌学会関東支部, 千葉.
- Liu B. (1998) *Flora fungorum Sinicorum*. Vol. 7. Hymenogastres, Melanogastres et Gautieriales. Science Press, Beijing. (in Chinese)
- Liu B., Tao K. (1988) New species and new records of hypogeous fungi from China (II). *Acta Mycologica Sinica* 7: 72–76. (in Chinese with English abstract)
- Montecchi A., Sarasini M. (2000) *Funghi ipogei d'Europa*. Associazione Micologica Bresadola, Fondazione Centro Studi Micologici, Trento.
- Napoli C., Mello A., Borra A., Vizzini A., Sourzat P., Bonfante P. (2010) *Tuber melanosporum*, when dominant, affects fungal dynamics in truffle grounds. *New Phytologist* 185: 237–247.
- Peintner U., Bougher N.L., Castellano M.A., Moncalvo J.M., Moser M.M., Trappe J.M., Vilgalys R. (2001) Multiple origins of sequestrate fungi related to *Cortinarius* (Cortinariaceae). *American Journal of Botany* 88: 2168–2179.
- Pegler D.N., Spooner B.M., Young T.W.K. (1993) *British truffles: A revision of British hypogeous fungi*. Royal Botanical Garden, Kew, UK.
- Rambaut A. (2016) FigTree version 1.4.3. Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- 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.
- Silvestro D., Michalak I. (2012) raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution* 12: 335–337.
- Smith A.H. (1966) Notes on *Dendrogaster*, *Gymnoglossum*, *Protoglossum* and species of *Hymenogaster*. *Mycologia* 58: 100–124.
- Smith M.E., Castellano M.A., Frank J.L. (2018) *Hymenogaster macmurphyi* and *Splanchnomyces behrii* are sequestrate species of *Xerocomellus* from the western United States. *Mycologia* 110: 605–617.
- Smith M.E., Trappe J.M., Rizzo D.M. (2005) NATS truffle and truffle-like fungi 11: *Hymenogaster raphanodorus* sp. nov. (Cortinariaceae). *Mycotaxon* 93: 241–246.
- Soehner E. (1962) Die Gattung *Hymenogaster* Vitt. Eine monographische Studie mit besonderer Berücksichtigung der bayerischen Arten. *Beihefte zur Nova Hedwigia* 2: 1–113.
- Soop K., Dima B., Szarkándi J.G., Cooper J., Papp T., Vágvolgyi C., Nagy L.G. (2016) *Psathyroma*, a new genus in Hymenogastraceae described from New Zealand. *Mycologia* 108: 397–404.
- Stielow B., Bratek Z., Orczán A.K.I., Rudnoy S., Hensel G., Hoffmann P., Klenk H.P., Göker M. (2011) Species delimitation in taxonomically difficult fungi: the case of *Hymenogaster*. *PLoS ONE* 6: e15614.
- Tedersoo L., May T.W., Smith M.E. (2010) Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20: 217–263.
- Těšitelová T., Těšitel J., Jersáková J., Říhová G., Selosse M.-A. (2012) Symbiotic germination capability of four *Epipactis* species (Orchidaceae) is broader than expected from adult ecology. *American Journal of Botany* 99: 1020–1032.
- Trappe J.M., Molina R., Luoma D.L., Cázares E., Pilz D., Smith J.E., Castellano M.A., Miller S.L., Trappe M.J. (2009) Diversity, ecology, and conservation of truffle fungi in forests of the Pacific Northwest. *Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-772*. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station, Portland.
- 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 Tubercularum*. Mediolani, Milano.

- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, J.W. Thomas (eds.) PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, San Diego, CA, pp. 315–322.
- 吉見昭一 (1971) 分類・腹菌類 (四). 菌蕈 17(5): 25–27.
- 吉見昭一 (1973) 日本きのこ図版 No. 728 オオミノシヨウロタケモドキ *Hysterangium stoloniferum*. 青木 実・日本きのこ同好会 編. 日本きのこ図版, 個人出版.
- 吉見昭一 (1993) 地下生菌・数種について. 日本菌学会第 37 回大会講演要旨集, p. 70.
- 吉見昭一 (親族一同 編) (2008) 地下生菌図版集 ミクロの世界へ第一歩. 個人出版, 京都.
- 吉見昭一・本郷次雄 (1989) ヒメノガステル科. 今関六也・本郷次雄 編. 原色日本新菌類図鑑 (II), pp. 224–225, 保育社, 大阪.
- 吉見昭一・高山 栄 (1986) 京都のキノコ図鑑, 京都新聞社, 京都.
- 吉見昭一・上田俊穂・小西思演・久田晴生 (2002) 菌類. 京都府編. 京都府自然環境目録 2002, pp. 256–278, 京都府企画環境部環境企画課, 京都.

標本リスト (Specimen list)

2020 年および 2021 年に香川県内で採集された地下生菌

Truffles and truffle-like fungi collected in 2020 and 2021 in Kagawa Prefecture

櫻庭 春彦*, 櫻庭 三恵

Haruhiko Sakuraba*, Mie Sakuraba

香川県高松市

Takamatsu-shi, Kagawa, Japan

E-mail: stnpaby8533@mc.pikara.ne.jp

Article Info: Submitted: 6 January 2022 Published: 31 March 2022

2020 年および 2021 年に香川県内で採集された地下生菌のうち、著者らが採集または同定した標本を報告する (図 1–10、表 1)。標本のうち、*Redeckera* sp. は千葉大学教育学部の大和政秀氏に、スクレログステル属の一種は国立科学博物館植物研究部の保坂健太郎氏に、スイチチショウロとコガネショウロタケは、神奈川県立生命の星・地球博物館の折原貴道氏に送付した。その他の標本はいずれも栃木県立博物館 (TPM) 菌類収蔵庫に収蔵されている。

謝辞

本報告を作製するにあたり、大前宗之様、折原貴道様、木下晃彦様、佐々木廣海様、保坂健太郎様、山本航平様には、標本の同定や最新情報など多くのご教示をいただき厚く御礼申し上げます。採集および観察については、青木修一氏、菊間泰汎氏、嶋田友久氏、中村香代子氏、林 鈴以氏、三谷 進氏に大変お世話になりました。ここに深謝いたします。

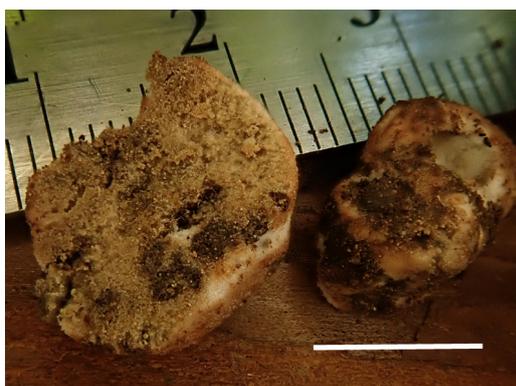
図 1. *Tubers* sp. スケール : 1 cm.図 3. *Sclerogaster* sp. スケール : 5 mm.図 2. *Redeckera* sp. スケール : 1 cm.図 4. *Gautieria* sp. スケール : 1 cm.

表 1. 2020 年および 2021 年に香川県で採集された地下生菌

学名	和名	採集地	発生環境 (植生)	採集日	採集者	同定者	オリジナル 標本番号	バウチャー 標本番号	標本の 状態	備考
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒノガステル属の一種	仲多度郡栗平町	シイ、カンシ林、地表に露出	2020 年 1 月 13 日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2020-01	TPM-M-9889	乾燥	
<i>Tuber</i> sp.	セイヨウシヨウロ属の一種	高松市栗林町	ウバメガシ樹下、地表に露出	2020 年 7 月 19 日	櫻庭春彦	木下晃彦	KG2020-02	TPM-M-9890	乾燥	図 1. 夏期に成熟するタイプ
<i>Rhizopogon</i> sp.	シヨウロ属の一種	高松市栗林町	ウバメガシ樹下 (アカマツ混在)、地表に露出	2020 年 7 月 20 日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2020-03	TPM-M-9891	乾燥	
<i>Redteckera</i> sp.	(和名なし)	木田郡三木町	スギ林 (広葉樹混在)、地表に露出	2020 年 8 月 16 日	櫻庭春彦	大前宗之	KG2020-04		乾燥	図 2. 大和政秀氏に送付
<i>Hysterangium</i> sp.	ヒステランギウム属の一種	木田郡三木町	広葉樹林、地表に露出	2020 年 10 月 2 日	三谷 進	折原貴道	KG2020-05	TPM-M-9892	乾燥	
<i>Tuber japonicum</i>	ホンセイヨウシヨウロ	仲多度郡まんのう町	広葉樹林、地表に露出	2020 年 10 月 9 日	櫻庭春彦	木下晃彦	KG2020-07	TPM-M-9894	乾燥	
<i>Zelleromyces</i> (= <i>Lactarius</i>) sp.	チチシヨウロ	仲多度郡まんのう町	広葉樹下、地表に露出	2020 年 10 月 24 日	菊間泰弘	櫻庭春彦	KG2020-08	TPM-M-9895	乾燥	
<i>Melanogaster</i> sp.	アナアキアカダマタケ	仲多度郡まんのう町	広葉樹林、地表に露出	2020 年 10 月 25 日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2020-09	TPM-M-9896	乾燥	
<i>Heliotaster columellifer</i>	ジャガイモタケ	高松市塩江町	広葉樹下、地表に露出	2020 年 10 月 31 日	櫻庭三恵	佐々木廣海・ 折原貴道	KG2020-10	TPM-M-9897	乾燥	
<i>Gymnomyces</i> (= <i>Russula</i>) sp.	旧トゲミノシヨウロ属 (シクエストラート 型ベニタケ属) の一種	仲多度郡まんのう町	広葉樹林、地表に露出	2020 年 11 月 8 日	櫻庭三恵	折原貴道	KG2020-11	TPM-M-9898	乾燥	
<i>Hydnoctysis japonica</i>	ウツロイモタケ	仲多度郡まんのう町	広葉樹林、地表に露出	2020 年 11 月 14 日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2020-12	TPM-M-9899	乾燥	
<i>Melanogaster utriculatus</i>	アカダマタケ	仲多度郡まんのう町	コナラ樹下、地表に露出	2020 年 11 月 15 日	青木修一	櫻庭春彦	KG2020-13	TPM-M-9900	乾燥	
<i>Gautieria</i> sp.	ガウチエリア属の一種	仲多度郡まんのう町	コナラ林近傍、マダケ根元、地中	2020 年 11 月 15 日	櫻庭三恵	山本航平	KG2020-14	TPM-M-9901	乾燥	
<i>Zelleromyces</i> (= <i>Lactarius</i>) sp.	チチシヨウロ	三豊市財田町	広葉樹林、地表に露出	2020 年 11 月 22 日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2020-15	TPM-M-9902	乾燥	
<i>Octaviania</i> subg. <i>Parcaea</i> sp.	ホシミノタマタケ属ハルカイ亜属の一種	高松市栗林町	シイ、カンシ林 (アカマツ混在)、地表に露出	2020 年 11 月 23 日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2020-16	TPM-M-9903	乾燥	
<i>Zelleromyces</i> sp.	チチシヨウロ	高松市栗林町	シイ、カンシ林 (アカマツ混在)、地表に露出	2020 年 11 月 23 日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2020-17	TPM-M-9904	乾燥	
<i>Rhizopogon succosus</i>	アカシヨウロ	高松市栗林町	シイ、カンシ林 (アカマツ混在)、地表に露出	2020 年 11 月 23 日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2020-18	TPM-M-9905	乾燥	
<i>Heliotaster columellifer</i>	ジャガイモタケ	綾歌郡綾川町	アラカシ樹下、地表に露出	2020 年 11 月 27 日	嶋田友久	櫻庭春彦	KG2020-19	TPM-M-9906	乾燥	
<i>Elaphomyces</i> sp. (sect. <i>Malacodermei</i>)	ツチダンゴ属の一種	坂出市王越町	コナラの樹下、地中	2020 年 11 月 29 日	櫻庭三恵	山本航平	KG2020-20	TPM-M-9907	乾燥	
<i>Sclerogaster</i> sp.	スクレロガステル属の一種	仲多度郡まんのう町	コナラの樹下、地中	2020 年 12 月 5 日	三谷 進	折原貴道・ 保坂健太郎	KG2020-21		乾燥	図 3. 保坂健太郎氏に送付
<i>Octaviania</i> subg. <i>Parcaea</i> sp.	ホシミノタマタケ属ハルカイ亜属の一種	綾歌郡綾川町	アラカシ樹下、地中	2020 年 12 月 5 日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2020-22	TPM-M-9908	乾燥	
<i>Turmalinea persicina</i>	ウスベニタマタケ	綾歌郡綾川町	アラカシ樹下、地中	2020 年 12 月 5 日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2020-23	TPM-M-9909	乾燥	
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒノガステル属の一種	仲多度郡まんのう町	広葉樹林、地表に露出	2020 年 12 月 13 日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2020-24	TPM-M-9910	乾燥	
<i>Zelleromyces</i> (= <i>Lactarius</i>) sp.	チチシヨウロ	仲多度郡まんのう町	広葉樹林、地表に露出	2020 年 12 月 19 日	三谷 進	櫻庭春彦	KG2020-25	TPM-M-9911	乾燥	
<i>Octaviania</i> subg. <i>Parcaea</i> sp.	ホシミノタマタケ属ハルカイ亜属の一種	仲多度郡まんのう町	広葉樹林、地表に露出	2020 年 12 月 19 日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2020-26	TPM-M-9912	乾燥	
<i>Octaviania</i> subg. <i>Parcaea</i> sp.	ホシミノタマタケ属ハルカイ亜属の一種	仲多度郡まんのう町	広葉樹林、ヒサカキ樹下、地中	2020 年 12 月 19 日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2020-27	TPM-M-9913	乾燥	
<i>Octaviania</i> subg. <i>Parcaea</i> sp.	ホシミノタマタケ属ハルカイ亜属の一種	木田郡三木町	広葉樹林、地中	2020 年 12 月 19 日	三谷 進	櫻庭春彦	KG2020-28	TPM-M-9914	乾燥	
<i>Octaviania</i> subg. <i>Parcaea</i> sp.	ホシミノタマタケ属ハルカイ亜属の一種	木田郡三木町	広葉樹林、地中	2020 年 12 月 19 日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2020-29	TPM-M-9915	乾燥	
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒノガステル属の一種	仲多度郡まんのう町	コナラ林近傍、マダケ根元、地中	2020 年 12 月 20 日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2020-30	TPM-M-9916	乾燥	

表 1. (続き)

学名	和名	採集地	発生環境 (植生)	採集日	採集者	同定者	オリジナル 標本番号	バウチャー 標本番号	標本の 状態	備考
<i>Gautieria</i> sp.	ガウチエリア属の一種	仲多度郡まんのう町	コナラ林近傍、マダケ根元、地中	2020年12月20日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2020-31	TPM-M-9917	乾燥	図4. 外皮消失せず
<i>Tuber japonicum</i>	ホンセイヨウシヨウロ	仲多度郡まんのう町	広葉樹林、地表に露出	2020年10月9日	櫻庭春彦	木下晃彦	KG2020-32	TPM-M-9918	乾燥	
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種	仲多度郡まんのう町	コナラ樹下、腐植中	2021年1月30日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2021-01	TPM-M-9919	乾燥	
<i>Octaviania</i> subg. <i>Parcaea</i> sp.	ホシミノタマケ属ハルカイ亜属の一種	綾歌郡綾川町	ヒサカキ樹下、腐植中	2021年1月31日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2021-02	TPM-M-9920	乾燥	
<i>Octaviania</i> subg. <i>Parcaea</i> sp.	ホシミノタマケ属ハルカイ亜属の一種	仲多度郡まんのう町	広葉樹下、腐植中	2021年2月14日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-03	TPM-M-9921	乾燥	
<i>Elaphomyces</i> sp. (sect. <i>Malacodermi</i>)	ツチダンゴ属の一種	仲多度郡まんのう町	ツブラジイ樹下、腐植中	2021年6月5日	嶋田友久	嶋田友久 山本航平	KG2021-04	TPM-M-9922	乾燥	ミヤマタンポタケ類似種寄生
<i>Elaphomyces muricatus</i>	アミツチダンゴ	綾歌郡綾川町	アラカン樹下、腐植中	2021年6月6日	林 鈴以	嶋田友久	KG2021-05	TPM-M-9923	乾燥	
<i>Rosbeevera eucyanea</i>	アオノメクロツブタケ	綾歌郡綾川町	アラカン樹下、腐植中	2021年6月6日	中村香代子	櫻庭春彦	KG2021-06	TPM-M-9924	乾燥	
<i>Melanogaster</i> sp.	アオノメアカダマタケ	仲多度郡まんのう町	アラカン樹下、地表に露出	2021年7月11日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-07	TPM-M-9925	乾燥	
<i>Rosbeevera eucyanea</i>	アオノメクロツブタケ	綾歌郡綾川町	アラカン樹下、腐植中	2021年7月17日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-08	TPM-M-9926	乾燥	
<i>Stephanospora</i> sp.	ステファノスポラ属の一種	木田郡三木町	スキ樹下、法面に露出	2021年8月22日	櫻庭三恵	佐々木廣海	KG2021-09	TPM-M-9927	乾燥	
<i>Rosbeevera eucyanea</i>	アオノメクロツブタケ	綾歌郡綾川町	アラカン樹下、地表に露出	2021年8月28日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-10	TPM-M-9928	乾燥	
<i>Rhizopogon succosus</i>	アカシヨウロ	高松市栗林町	ウバメガシ、アカマツ樹下、法面に露出	2021年9月11日	嶋田友久	折原貴道	KG2021-11	TPM-M-9929	乾燥	
<i>Rhizopogon boninensis</i>	オオシヨウロ	高松市栗林町	ウバメガシ、アカマツ樹下、法面に露出	2021年9月11日	櫻庭春彦	折原貴道	KG2021-12	TPM-M-9930	乾燥	
<i>Rhizopogon</i> sp.	シヨウロ属の一種	高松市栗林町	ウバメガシ、アカマツ樹下、法面に露出	2021年9月11日	櫻庭春彦	折原貴道	KG2021-13	TPM-M-9931	乾燥	
<i>Rosbeevera eucyanea</i>	アオノメクロツブタケ	仲多度郡まんのう町	アラカン樹下、地表に露出	2021年9月11日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-14	TPM-M-9932	乾燥	
<i>Melanogaster</i> sp.	アオノメアカダマタケ (和名なし)	仲多度郡まんのう町	コナラ樹下、腐植中	2021年9月12日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-15	TPM-M-9933	乾燥	
<i>Rhizopogon</i> sp.	シヨウロ属の一種	仲多度郡まんのう町	アラカン樹下、地表に露出	2021年9月13日	櫻庭三恵	折原貴道	KG2021-16	TPM-M-9934	乾燥	
<i>Tuber japonicum</i>	ホンセイヨウシヨウロ	仲多度郡まんのう町	アベマキ樹下、法面に露出	2021年9月18日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-17	TPM-M-9935	乾燥	
<i>Lactarius spinosporus</i>	スイチチシヨウロ	木田郡三木町	アラカン樹下、腐植中	2021年9月19日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-18	TPM-M-9936	乾燥	図5. 折原貴道氏に送付
<i>Zelleromyces</i> (= <i>Lactarius</i>) sp.	チチシヨウロ	仲多度郡まんのう町	コナラ樹下、地表に露出	2021年9月26日	菊間泰汎	山本航平	KG2021-19	TPM-M-9937	乾燥	
所属未確定 (<i>incertae sedis</i>)	コガネシヨウロタケ	さぬき市	アベマキ、ヤブツバキ樹下、腐植中	2021年10月3日	櫻庭三恵	大前宗之	KG2021-21	TPM-M-9938	乾燥	図6. 折原貴道氏に送付
<i>Zelleromyces</i> (= <i>Lactarius</i>) sp.	チチシヨウロ	仲多度郡まんのう町	アベマキ樹下、法面に露出	2021年10月9日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2021-22	TPM-M-9938	乾燥	
<i>Rhizopogon</i> sp.	シヨウロ属の一種	仲多度郡まんのう町	アラカン樹下、地表に露出	2021年10月24日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-23	TPM-M-9939	乾燥	
<i>Tuber japonicum</i>	ホンセイヨウシヨウロ	仲多度郡まんのう町	アベマキ樹下、地表に露出	2021年10月24日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-24	TPM-M-9940	乾燥	
<i>Rhizopogon succosus</i>	アカシヨウロ	仲多度郡まんのう町	コナラ樹下、腐植中	2021年10月30日	櫻庭春彦	折原貴道	KG2021-25	TPM-M-9941	乾燥	
<i>Octaviania</i> subg. <i>Parcaea</i> sp.	ホシミノタマケ属ハルカイ亜属の一種	仲多度郡まんのう町	コナラ樹下、腐植中	2021年10月30日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2021-26	TPM-M-9942	乾燥	
<i>Gautieria</i> sp.	ガウチエリア属の一種	仲多度郡まんのう町	コナラ樹下、腐植中	2021年10月30日	櫻庭三恵	山本航平	KG2021-27	TPM-M-9943	乾燥	
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種	仲多度郡まんのう町	コナラ樹下、腐植中	2021年10月30日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2021-28	TPM-M-9944	乾燥	

表 1. (続き)

学名	和名	採集地	発生環境 (植生)	採集日	採集者	同定者	オリジナル 標本番号	バウチャー 標本番号	標本の 状態	備考
<i>Aroramycetes</i> sp.	(和名なし)	仲多度郡まんのう町	コナラ樹下, 腐植中	2021年10月30日	櫻庭春彦	折原貴道	KG2021-29	TPM-M-9945	乾燥	図 7
<i>Rhizopogon succosus</i>	アカシヨウロ	仲多度郡まんのう町	広葉樹下, 地表に露出	2021年11月2日	嶋田友久	折原貴道	KG2021-30	TPM-M-9946	乾燥	
<i>Rosbeeveria eucyanea</i>	アオゾメロコツブダケ	仲多度郡琴平町	アベマキ樹下, 腐植中	2021年11月3日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-31	TPM-M-9947	乾燥	
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種	仲多度郡琴平町	アラカシ樹下, 腐植中	2021年11月3日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2021-32	TPM-M-9948	乾燥	
<i>Entoloma asterosporum</i>	ホンシガタベニダング	さぬき市	ヤブツバキ樹下, 腐植中	2021年11月6日	櫻庭三恵	佐々木廣海	KG2021-33	TPM-M-9949	乾燥	図 8
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種	仲多度郡まんのう町	コナラ樹下, 腐植中	2021年11月14日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2021-34	TPM-M-9950	乾燥	
<i>Turmalinea persicina</i>	ウスベニタマタケ	綾歌郡綾川町	アラカシ樹下, 腐植中	2021年11月20日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-35	TPM-M-9951	乾燥	
<i>Aroramycetes</i> sp.	(和名なし)	綾歌郡綾川町	コナラ樹下, 腐植中	2021年11月20日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-36	TPM-M-9952	乾燥	
<i>Elaphomyces</i> sp. (sect. <i>Malacoderma</i>)	ツチダング属の一種	綾歌郡綾川町	コナラ樹下, 腐植中	2021年11月20日	櫻庭三恵	櫻庭春彦・山本航平	KG2021-37	TPM-M-9953	乾燥	ミヤマタンポタケ類似種 寄生
<i>Octaviania</i> subg. <i>Parcaea</i> sp.	ホシミノタマタケ属ハルカイ亜属の一種	綾歌郡綾川町	コナラ樹下, 腐植中	2021年11月20日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-38	TPM-M-9954	乾燥	
<i>Octaviania</i> subg. <i>Parcaea</i> sp.	ホシミノタマタケ属ハルカイ亜属の一種	綾歌郡綾川町	コナラ樹下, 腐植中	2021年11月20日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2021-39	TPM-M-9955	乾燥	ヒボミケス属 寄生
<i>Hydnocystis japonica</i>	ウツロイモタケ	三豊市財田町	ヒサカキ, ネズミモチ樹下, 地表に露出	2021年11月21日	青木修一	櫻庭春彦	KG2021-40	TPM-M-9956	乾燥	
<i>Gautieria</i> sp.	ガウチエリア属の一種	三豊市財田町	アセビ, サカキ樹下, 腐植中	2021年11月21日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-41	TPM-M-9957	乾燥	図 9, 外皮消失
<i>Elaphomyces</i> aff. <i>mutabilis</i>	ツブレンソツチダング類似種	三豊市財田町	アラカシ, ヒサカキ樹下, 腐植中	2021年11月21日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-42	TPM-M-9958	乾燥	
<i>Hysterangium</i> sp.	ヒステランギウム属の一種	三豊市財田町	ヤブムラサキ, ネズミモチ樹下, 腐植中	2021年11月21日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-43	TPM-M-9959	乾燥	図 10
<i>Rhizopogon succosus</i>	アカシヨウロ	高松市栗林町	ネズミモチ, アカマツ樹下, 法面に露出	2021年11月23日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-44	TPM-M-9960	乾燥	
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種	高松市栗林町	ネズミモチ樹下, 腐植中	2021年11月23日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2021-45	TPM-M-9961	乾燥	
<i>Rhizopogon</i> sp.	シヨウロ属の一種	高松市栗林町	アカマツ樹下, 法面に露出	2021年11月23日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-46	TPM-M-9962	乾燥	
<i>Rhizopogon</i> sp.	シヨウロ属の一種	高松市栗林町	アカマツ樹下, 法面に露出	2021年11月23日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-47	TPM-M-9963	乾燥	
<i>Helitogaster columellifer</i>	ジャガイモタケ	高松市塩江町	モミ (植栽) 樹下, 地表に露出	2021年11月28日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2021-48	TPM-M-9964	乾燥	
<i>Octaviania</i> subg. <i>Parcaea</i> sp.	ホシミノタマタケ属ハルカイ亜属の一種	綾歌郡綾川町	ヒサカキ, ヤブツバキ樹下, 腐植中	2021年12月4日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2021-49	TPM-M-9965	乾燥	
<i>Rhizopogon roseolus</i>	シヨウロ	観音寺市有明町	クロマツ樹下, 砂地, 地表に露出	2021年12月12日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2021-50	TPM-M-9966	乾燥	
<i>Elaphomyces muricatus</i>	アミツチダング	仲多度郡まんのう町	アラカシ樹下, 腐植中	2021年12月25日	嶋田友久	櫻庭春彦	KG2021-51	TPM-M-9967	乾燥	



図 5. *Lactarius spinosporus*. スケール : 1 cm.



図 8. *Entoloma asterosporum*. スケール : 1 cm.



図 6. コガネショウロタケ (a: 子実体基部; b: 子実体断面).
スケール : 1 cm.



図 9. *Gautieria* sp. スケール : 1 cm.



図 10. *Hysterangium* sp. スケール : 1 cm.



図 7. *Aroramycetes* sp. スケール : 1 cm.

標本リスト (Specimen list)

2020 年および 2021 年に大阪府およびその近隣県で採集された地下生菌
Truffles and truffle-like fungi collected in 2020 and 2021 in Osaka Prefecture
and the adjacent areas

森 紀翔

Norito Mori

近畿大学農学部環境管理学科, 〒 631-8505 奈良県奈良市中町 3327-204
Department of Environmental Management, Faculty of Agriculture, Kindai University, 3327-204 Nakamachi,
Nara-shi, Nara 631-8505, Japan

E-mail: barobaroba2012@gmail.com

Article Info: Submitted: 21 January 2022 Published: 31 March 2022

2020 年および 2021 年に著者が大阪府・奈良県・兵庫県で採集した地下生菌について報告する (表 1)。採集した標本はすべて 50–60°C で熱乾燥を行った。一部の標本は神奈川県立生命の星・地球博物館収蔵庫 (KPM-NC) および大阪市立自然史博物館収蔵庫 (OSA-MY) に収蔵されている。発生環境の保全のため、一部の種は採集場所を府レベルに留める。著者はリストに掲載した種の他にも大阪府内のユーカリ植栽地で

地下生菌数種を採集しているが、これらは別途報告予定である。

謝辞

吉成経氏と前田創氏には、アミメツチダンゴと春型タンポタケ (MSF8) の発生地をご案内いただいた。近畿大学生態系管理学研究室の葛西弘氏には、ウスベニタマタケ (MSF34) の発生地情報をご提供いただいた。深く感謝申し上げます。



図 1. アミメツチダンゴ *Elaphomyces muricatus* (春型タンポタケ *Tolyptocladium* sp. が寄生)。



図 3. ショウロ *Rhizopogon roseolus*.



図 2. *Hymenogaster* sp.



図 4. *Rossbeevera* sp. スケール: 1 cm.

表 1. 2020 年および 2021 年に大阪府およびその近隣県で採集された地下生菌

学名	和名	採集地 都道府県 市区町村	発生環境 (宿主)	採集日	採集・ 同定者	オリジナル 標本番号	バウチャー 標本番号	標本の 状態	備考
<i>Melanogaster utriculatus</i>	アカダマタケ	兵庫県 神戸市	アカマツ・モミ・シイ等の林内、地上に転がった状態で見え	2020 年 10 月 11 日	森紀翔	MSF1		乾燥	
<i>Rhizopogon succosus</i>	アカシヨウロ	兵庫県 神戸市	アカマツ樹下、地表に露出	2020 年 10 月 11 日	森紀翔	MSF2		乾燥	
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種 (白色)	大阪府 枚方市	クスギ・カシ類樹下、地中	2020 年 10 月 13 日	森紀翔	MSF3		乾燥	
<i>Sclerogaster</i> sp.	スクレロガステル属の一種	奈良県 生駒市	腐朽した材上	2020 年 10 月 18 日	森紀翔	MSF4		乾燥	
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種 (白色)	奈良県 生駒市	シデ属・アラカシ等の樹下、リター下	2020 年 11 月 3 日	森紀翔	MSF5		乾燥	
<i>Zelleromyces (= Lactarius) sp.</i>	チチシヨウロ	兵庫県 三田市	アベマキ・アラカシ・アカマツ等の林内、地上に転がった状態で発見	2020 年 11 月 5 日	森紀翔	MSF6		乾燥	
<i>Tuber longispinosum</i>	イボセイヨウシヨウロ	大阪府 箕面市	クリ・カシ等の林内、地表に露出	2021 年 3 月 14 日	森紀翔	MSF7		乾燥	
<i>Elaphomyces muricatus</i>	アミツチダンゴ	大阪府 箕面市	アベマキ樹下、地中	2021 年 3 月 14 日	森紀翔	MSF8		乾燥	拳型タンポタケ (<i>Tohyopocladium</i> sp.) が寄生. 図 1
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種 (白色)	大阪府 箕面市	クスギ・アラカシ等の林内、リター下	2021 年 3 月 14 日	森紀翔	MSF9		乾燥	
<i>Rhizopogon roseolus</i>	シヨウロ	大阪府 大阪府	クロマツ林内、地表に露出	2021 年 3 月 17 日	森紀翔	MSF10		乾燥	
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種 (白色)	大阪府 大阪府	マテハシイ・ウバメガシ等の林内、リター下	2021 年 3 月 17 日	森紀翔	MSF11		乾燥	
<i>Hydangium</i> sp.	(和名なし)	大阪府 大阪府	ユウカリ樹下、リター下	2021 年 3 月 31 日	森紀翔	MSF12		乾燥	
<i>Hydangium</i> sp.	(和名なし)	大阪府 大阪府	ユウカリ樹下、リター下	2021 年 4 月 20 日	森紀翔	MSF13		乾燥	
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種 (白色)	大阪府 大阪府	アラカシ樹下、リター下	2021 年 5 月 14 日	森紀翔	MSF14		乾燥	内部にカビ発生
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種 (白色)	大阪府 大阪府	アラカシ樹下、リター下	2021 年 5 月 23 日	森紀翔	MSF15		乾燥	図 2
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種 (褐色)	大阪府 大阪府	クスギ・ナラガシワ・ウバメガシ樹下、リター下	2021 年 7 月 3 日	森紀翔	MSF16		乾燥	
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種 (白色)	大阪府 大阪府	アラカシ樹下、リター下	2021 年 7 月 3 日	森紀翔	MSF17		乾燥	
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種 (白色)	大阪府 大阪府	アラカシ樹下、リター下	2021 年 7 月 4 日	森紀翔	MSF18		乾燥	
<i>Rosbeevera</i> sp.	ツチダマタケ属の一種	大阪府 大阪府	アラカシ樹下、リター下	2021 年 7 月 10 日	森紀翔		KPM-NC 25098	乾燥	
<i>Rosbeevera</i> sp.	ツチダマタケ属の一種	大阪府 大阪府	アラカシ樹下、リター下	2021 年 7 月 11 日	森紀翔		KPM-NC 25099	乾燥	
<i>Protuberia nipponica</i>	シラタマタケ	奈良県 奈良市	コナラ樹下、法面に露出	2021 年 7 月 24 日	森紀翔	MSF21		乾燥	
<i>Rosbeevera</i> sp.	ツチダマタケ属の一種	大阪府 大阪府	アラカシ樹下、リター下	2021 年 9 月 20 日	森紀翔	MSF22		乾燥	
<i>Rosbeevera</i> sp.	ツチダマタケ属の一種	大阪府 大阪府	アラカシ樹下、リター下	2021 年 9 月 24 日	森紀翔	MSF23		乾燥	
<i>Rosbeevera</i> sp.	ツチダマタケ属の一種	大阪府 大阪府	アラカシ樹下、リター下	2021 年 9 月 27 日	森紀翔	MSF24		乾燥	
<i>Rosbeevera</i> sp.	ツチダマタケ属の一種	大阪府 大阪府	アラカシ樹下、リター下	2021 年 10 月 3 日	森紀翔	MSF25		乾燥	
<i>Octaviania cf. hesperi</i>	ヨイホシミノタマタケ?	奈良県 橿原市	シイ・カシ等の林内、リター下	2021 年 10 月 10 日	森紀翔	MSF26		乾燥	
<i>Octaviania kobayashii</i>	ホシミノタマタケ	奈良県 奈良市	シイ・カシ等の林内、リター下	2021 年 10 月 10 日	森紀翔	MSF27		乾燥	
<i>Rhizopogon roseolus</i>	シヨウロ	奈良県 奈良市	クロマツ樹下、地表に露出	2021 年 10 月 22 日	森紀翔	MSF28		乾燥	図 3

表 1. (続き)

学名	和名	採集地 都道府県 市区町村	発生環境 (宿主)	採集日	採集・ 同定者	オリジナル 標本番号	バウチャー 標本番号	標本の 状態	備考
<i>Sclerogaster</i> sp.	スクレロガステル属の一種	奈良県 生駒市	腐朽した材上	2021年10月24日	森紀翔	MSF29		乾燥	
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種 (白色)	大阪府 堺市	カシ類樹下, リター下	2021年11月3日	森紀翔	MSF30		乾燥	
<i>Rosbeevera griseovelutina</i>	ネズミツチダマタケ	兵庫県 神戸市	カシ類樹下, リター下	2021年11月5日	森紀翔	MSF31		乾燥	
<i>Rosbeevera</i> sp.	ツチダマタケ属の一種	大阪府 八尾市	アラカシ樹下, リター下	2021年11月14日	森紀翔	MSF32		乾燥	図 4
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種 (白色)	奈良県 奈良市	イチイガシ樹下, リター下	2021年11月19日	森紀翔	MSF33		乾燥	
<i>Turmalinea persicina</i>	ウスベニタマタケ	奈良県 奈良市	ツブラザジイ樹下, リター下	2021年11月26日	森紀翔	MSF34		乾燥	図 5
<i>Hydangium</i> sp.	(和名なし)	大阪府 八尾市	ユーカリ樹下, リター下	2021年12月4日	森紀翔	MSF35		乾燥	
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種 (白色)	大阪府 八尾市	アラカシ樹下, リター下	2021年12月10日	森紀翔	MSF37		乾燥	
<i>Hydangium</i> sp.	(和名なし)	大阪府 大阪府	ユーカリ樹下, リター下	2021年12月18日	森紀翔		OSA-MY-9541	乾燥	
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種 (白色)	大阪府 吹田市	シイ・カシ林内, リター下	2021年12月27日	森紀翔	MSF42		乾燥	
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種 (白色)	奈良県 奈良市	イチイガシ樹下, リター下	2021年12月31日	森紀翔	MSF43		乾燥	
<i>Octaviania</i> subg. <i>Parcaea</i> sp.	ホシノタマタケ属バルカイ亜属の一種	奈良県 奈良市	イチイガシ樹下, リター下	2021年12月31日	森紀翔	MSF44		乾燥	図 6
<i>Helicogaster columellifer</i>	ジャヤカイモタケ	奈良県 奈良市	イチイガシ・モミ樹下, リター下, 地表に露出	2021年12月31日	森紀翔	MSF45		乾燥	
<i>Russula</i> sp.	コイシタケ	奈良県 奈良市	シイ樹下, 地中	2021年12月31日	森紀翔	MSF46		乾燥	



図 5. ウスベニタマタケ *Turmalinea persicina*. スケール: 1 cm.



図 6. *Octaviania* subg. *Parcaea* sp.

エッセイ (Essay)

コロモチダンゴとの出会いと観察

Encounter with *Elaphomyces appalachiensis* and its observation

oso sugiru

三重県津市

Tsu-shi, Mie, Japan

E-mail: toolate@s7.coreserver.jp

Article Info: Submitted: 6 March 2022

Published: 31 March 2022

1. はじめに

本種に初めて出会ったのは2021年1月10日。この日は朝から地元のフィールドへ向かった。我が家から車で15分ほどの近所なのだが、周辺にガヤドリナガミノツブタケやシュイロクチキタンポタケ、アマミカイキタンポタケと言った比較的珍しい冬虫夏草が発生する魅力的な環境が広がっている。今回訪れた場所も複数種類の地下生菌とそれらを宿主とする冬虫夏草が安定して発生するので「行きさえすればとれあえず何かしらには出会える」という安心感がある。

このフィールドはシイやカシなどのブナ科広葉樹を主体とした雑木林で、まばらにヤブツバキやネジキなどの低木が混じる。すぐ近くに大きなレジャー施設と遊歩道が存在するため舗装道が整備されており、車を停めて徒歩数メートルで目的地に到着できる。ただ人通りがそれなりにあり、匍匐前進している私に気付いた車が一旦停止し、しばらく様子見して走り去ることがよくある。この前は徒歩で遊歩道へ向かうご家族の小さなお子さんが大きな声で「ねえーだれかいー」と言いながら通り過ぎた時は流石に恥ずかしかった。この場所は定期的に猟友会が山に入っており、たまにショットシェルや薬莖が落ちているので視認性を高めるために蛍光色のカッパを着ているのだが、確かに効果はあるようだ。

2. 発見の経緯

探し始めて早々に冬虫夏草のハナヤスリタケの幼菌が見つかる。この場所では広義のアミメツチダンゴを宿主とする冬虫夏草が数多く発生し、他にもハナヤスリタケと同時期に発生するヌメリタンポタケや、もう少し経つと以前は「春型タンポタケ」と呼ばれていたタンポタケ類が発生する。なお、アミメツチダンゴは

足の踏み場も無いほどゴロゴロ地面に露出している。次に見付かったのはまだ和名の無い *Elaphomyces citrinus* 近縁種 (図1)。ツブレシロツチダンゴに近縁で、真っ黄色の菌糸に覆われているためよく目立ち、また地表に黄色い菌糸が湧き出しているため、その下を掘ることで簡単に見つけることができる。

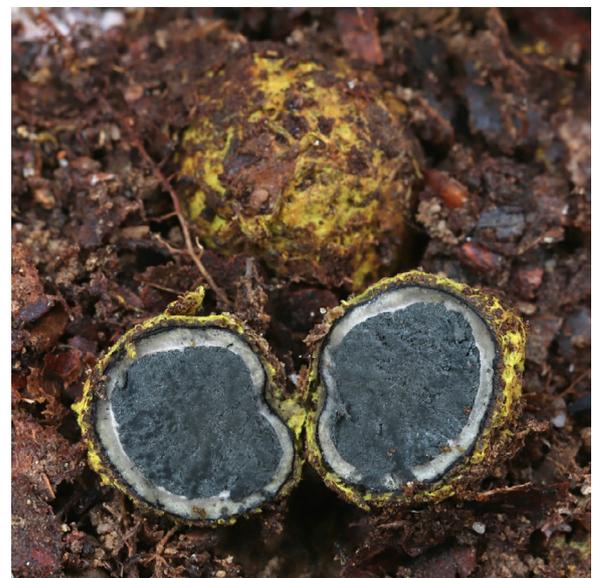


図1. *Elaphomyces citrinus* 近縁種の子実体と断面。黄色い菌糸と白い内皮の間に硬質の外皮がある。

ここまではこのフィールド既出の種ばかりで、いつも通りの探索だった。しかし、*E. citrinus* 近縁種を掘り出した周囲の地面にライラック色に見慣れない菌糸が広がっていることに気が付いた。最初はカビの仲間か何かだと思ったが、積もった腐植ではなく地面に広がっていることに違和感があり、また菌糸の質感も色も違えど *E. citrinus* 近縁種の黄色い菌糸にそっくりに見えたので

掘ってみることに。するとコロコロと紫色の塊が転がり出て来た。

それでも最初に見た時は地下生菌だと思えなかった。それは「薄い薄紫色の地下生菌」というものが自分の知識の中に無かったため。なのでカビに覆われたドングリの残骸か何かでは?とも考えたが、指で触った質感はしっとりとして弾力があり、中に硬質の植物体が入っている手触りではなかったので、試しに膝の上に乗せてカッターナイフで真っ二つに切断。するとスムーズに刃が入り、引き抜く時に切断面から灰青色の粉がこぼれた。ここでようやくこれが地下生菌だと確信できた。そして真っ二つにした塊をそっと開いてみると、薄紫色の菌糸の内側に白い層、その内側には灰青褐色の胞子……。明らかにツズレシロツチダンゴに近縁な地下生菌だった(図2)。



図2. 見慣れないライラック色の菌糸に包まれた地下生菌。胞子の色からもツズレシロツチダンゴに近縁なグループであることが推測される。

3. コロモツチダンゴ (*Elaphomyces appalachiensis* Linder)

ツチダンゴの仲間だと分かっても、本種が何という種なのかはこの段階では全く見当もつかなかった。なので私は山の中でスマートフォンを取り出し「えっと・・・ツズレシロツチダンゴ系の菌糸って白とか黄色だよな・・・?ライラック～紫色ってある? (2021年1月10日 13:30 原文ママ)」とTwitterに書き込んだ。すると数分で菌友のガガンボ氏から「コロモツチダンゴですかね?」とのリプライが届きハッとした。コロモツチダンゴが赤色系の地下生菌であることは知っていたが、詳しく特徴が述べられている文献はコロモツチダンゴを *E. appalachiensis* と同定した報告(室井・津田、2003)くらいで、その他は載っていても本種に特異的に感染する冬虫夏草のミヤマタンポタケの宿主としてオマケ程度に紹介されているくらい。とにかく情報が少なく、ただ漠然と和名の響きから「薄皮に包まれているのかな?」と思い込んでいたので頭に浮かばなかった。

数個体をタッパーに入れて持ち帰り、観察の時間を確保するために早めにフィールドを後にした。帰宅した後、室内で詳細に観察する。ホームページ掲載用に真っ二つに切った子実体をピンに刺して固定し、暗い部屋で各部位をマクロ撮影。これにより本種の特徴がハッキリ理解できた。

子実体は大きい物でも1.5 cmほどで、やや潰れた球形。子実体は全体がライラック色～淡赤紫色の菌糸に覆われており、この菌糸は子実体周囲に広がり、時に地表に露出して本種発見の目印になる。さらにこの菌糸は薄皮のようにペリペリと剥がすことができ、これが和名の由来なのではないかと思われる。ツズレシロツチダンゴのような硬質の外皮は存在せず、ライラック色の菌糸から直接内皮に移行する。内皮は厚さ1 mmほどで断面は灰白色だが、成熟したものは染みるように胞子と同じ灰青褐色を帯びていることが多い。胞子はこれもツズレシロツチダンゴの仲間らしい灰青褐色で、それだけに子実体を覆う菌糸の色の異質さが際立つ(図3)。ネット上に公開されている本種に関する2012年の論文(Castellano et al., 2012)の記載内容と比較し、本種をコロモツチダンゴとしてよいと判断した。

また、このフィールドだけの現象かも知れないが、不思議と *E. citrinus* 近縁種と隣接して発生することが多いように思われる(図4)。実際、黄色い菌糸とライラック色の菌糸がぶつかり合う



図3. コロモツチダンゴの表面と断面。硬質の外皮が存在しない。



図4. *Elaphomyces citrinus* 近縁種とコロモツチダンゴの菌糸が隣接する様子。

ように地面に湧いている様子を何度も目にしている。ただ、これは発生環境が共通しているので単に共存しているだけかも知れないが・・・。

4. 顕微鏡観察と考察

上記の論文に胞子の電子顕微鏡写真があったので自分でも確かめようとしたのだが、その後の観察結果に悩まされることとなる。胞子の顕微鏡観察自体は簡単で、油浸対物レンズを用いると表面構造がすぐに確認できた。しかし、撮影した写真を編集していて妙なことに気が付いた。表面に「網目」が見えるのだ(図5)。

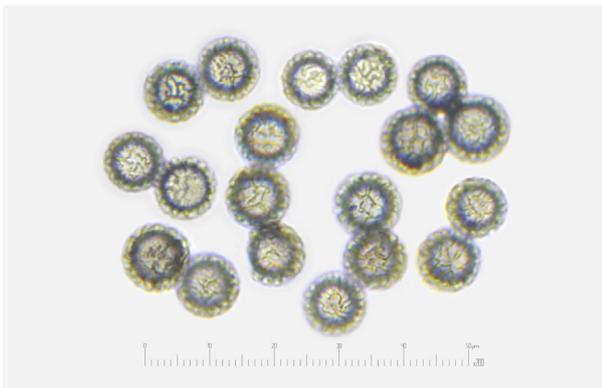


図5. コロモツチダンゴの胞子の顕微鏡写真。あるはずの無い網目模様が見える。

論文の記載では（自分の翻訳能力を信じるならば）、本種の成熟した胞子表面は「細かい棒状突起」に覆われるとあり、論文中の電子顕微鏡写真でもその様子が確認できる。明らかに目の前の結果と食い違う。別種なのか？それにはそれ以外の特徴が一致しすぎている・・・。

そこで過去に撮影した様々な子囊菌類の胞子写真を引っ張り出してみた。特に胞子表面に網目構造を持つ種を中心に写真を集め、見え方の違いを比較した。その最中にイグチ類のスペシャリストである牛研氏の「メルツァー試薬で染色してから観察すると表面構造が観察しやすい」との情報提供があったこと、そしてとある胞子の顕微鏡写真を見たことで自分なりに答えに辿り着くことができた。

結論から言うと「網目」ではなく「亀裂」だった。

まず、表面構造が見やすいようにコットンブルーで染色したロウツブタケ属菌 (*Hydnobolites* sp.) の胞子を見してみる(図6)。左が深度合成したもので、右がピントを胞子の中心に合わせたもの。この属の胞子は球形で表面に網目状の隆起を持つのが特徴で、分かりやすいように赤色で補助線を入れてみると、左は表面に網目構造が見え、右は胞子の輪郭がガタガタしているのが分かる。これは隆起した網目を横から見た「断面」的な見え方のため凸凹しており、中央のイラストのような形状だと分かる。

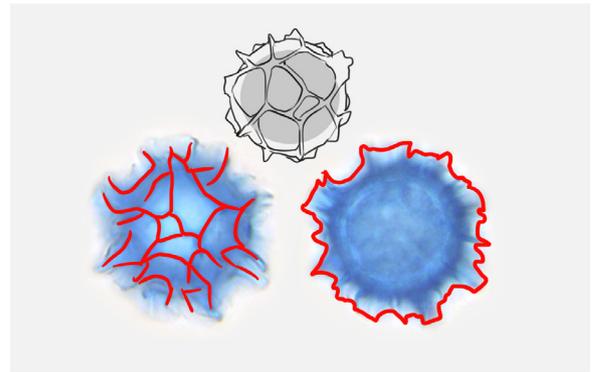


図6. ロウツブタケ属菌 (*Hydnobolites* sp.) の胞子とイラスト。

次に、同様に補助線を入れたコロモツチダンゴの胞子を見してみる(図7)。左右の撮影方法も先ほどと同じ。左を見ると網目状に見えているのは同じだが、右を見ると胞子の輪郭が整った円形に見えている。つまり「同じ高さの何かが表面を均一に覆っている」ということになる。そしてこの均一に覆っているものこそ、隙間無く並んだ細かい棒状突起だと思われる。それをイラストにしたものが図7中央である。

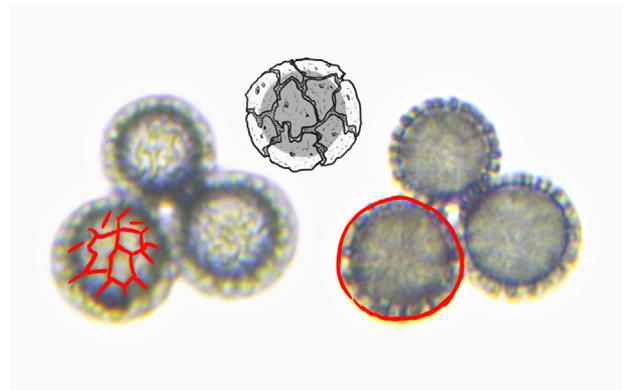


図7. コロモツチダンゴの胞子とイラスト。

さらに、牛研氏に教えていただいた通り、メルツァー試薬で染色したサンプル(図8)を見て、この網目が隆起ではなく亀裂であると思える見え方の特徴にも気付いた。隆起は山の裾野のように滑らかに消えて行くが、亀裂は地割れのように突然現れる。「Minecraft」というゲームをご存知の方であれば、地形の「山」と「渓谷」をイメージすると分かりやすいと思う。実際に網目が途切れる場所を見してみると、隆起した網目は少しずつ薄くなるが、コロモツチダンゴの網目は途切れる際にスパッと消えている。このことから本種の網目に見えていたものは亀裂だったのだと確信することができた。それを念頭に置いてからもう一度確認すると、細かな点に見ていたものも論文の電子顕微鏡写真のように、亀裂になる前にスポット状に穴が空いた状態だったのだと納得することができ、満足のいく顕微鏡観察となった。

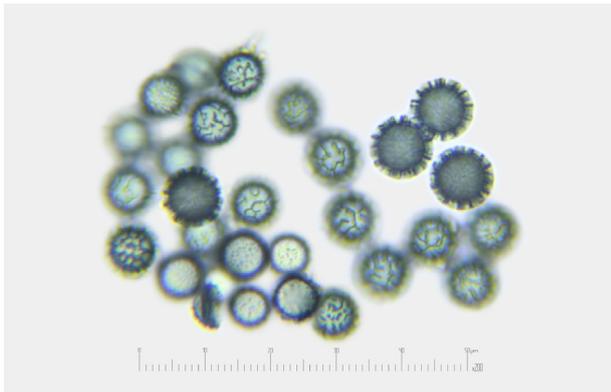


図 8. メルツァー試薬で染色したコロモチダングの胞子。表面の亀裂の出来方によって表面が網目状にも細点状にも見える。

5. おわりに

今回コロモチダングの表面構造が自分なりに納得できたことで新たな疑問が浮上した。それは「今までの胞子の表面構造の観察でも実は勘違いがあったのではないか」ということ。実は、すでに何種類か心当たりがある。光学顕微鏡ではどうしても電子顕微鏡ほど正確に表面構造を見るができない。なので自分の目にも機器の目にも限界があるのだと自覚し、とりあえず「疑ってかかる」ことの大切さを痛感した。

また、2021 年は定期的にこのフィールドを訪れ、コロモチダングからミヤマタンポタケが発生していないかを観察し続けた。残念ながら発見には至らなかったが、コロナ禍で十分な回数を稼げていないこともあるので、2022 年も観察を継続したいと思う。

余談だが、非常に好きなキノコとなったので擬人化してみた(図 9)。髪型は顕微鏡観察にて印象に残った胞子表面の



図 9. コロモチダング擬人化の「団衣 (ダンコロモ)」嬢。

構造がモチーフ。その他、無数のベルトはグレバ内にまばらに見られる糸状の菌糸、フードの紐はミヤマタンポタケの子実体、帽子やコートに通された赤い紐は菌糸に巻き込まれた木の根を模している。私の管理するホームページ (<http://toolate.s7.coreserver.jp/personification/>) に詳細な設定が書かれているので、お暇な時にでも覗きにきていただくと幸いです。

謝辞

今回のコロモチダングについては、その正体も、胞子観察のヒントも Twitter を通じて教えていただくことができました。似たようなことは今までも何度か経験しており、改めてインターネットとその集合知、そこに居る愛好家、専門家の方々の凄さを思い知らされた気がします。ガガンボ氏、牛研氏、本当にありがとうございました。

引用文献

Castellano M.A., Guerrero G.G., Jiménez J.G., Trappe J.M. (2012) *Elaphomyces appalachiensis* and *E. verruculosus* sp. nov. (Ascomycota Eurotiales, Elaphomycetaceae) from eastern North America. *Revista Mexicana de Micología* 35: 17–22.

室井哲夫・津田浩治 (2003) ミヤマタンポタケの宿主、コロモチダングの学名について。 *冬虫夏草* 23: 27–28.

その他普及記事 (Other articles)

事例紹介：ヤマトヒメナガヒラタハナアブ（双翅目ハナアブ科）による
外生菌根菌ショウロおよびホンショウロの摂食Introduction to "Consumption of the ectomycorrhizal fungi *Rhizopogon roseolus* and *R. luteolus* by *Chamaesyrrhus japonicus* (Diptera: Syrphidae)"

岡田 英士

Hidehito Okada

神戸大学理学部生物学科, 〒 657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1

Department of Biology, Faculty of Science, Kobe University, 1-1 Rokkodai, Nada-ku, Kobe, Hyogo 657-8501, Japan.

E-mail: hidefungi@gmail.com

Article Info: Submitted: 17 March 2022

Published: 31 March 2022

地下生菌は、一般に孢子の風散布機能を失っている。そのため、動物や昆虫による摂食が主な孢子散布様式であると考えられてきた。しかしながら、どのような動物や昆虫が地下生菌を摂食するかについては知見が少ない。本稿では、著者によるショウロ *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr., Svensk, 1909 とホンショウロ *R. luteolus* Fr. & Nordholm, 1817 の2種のショウロ属菌からヤマトヒメナガヒラタハナアブ *Chamaesyrrhus japonicus* Shiraki, 1956 の幼虫を発見した研究 (Okada et al., 2021) と発見に至った経緯を紹介する。

地下生菌について興味を持ち始めたのは学部1回生の頃だった。元々菌類と他生物との生物間相互作用に興味があり、ちょうど大学入学に伴い研究テーマを探していたところ、地下に子実体を形成し孢子散布を動物に依存するという地下生菌の特異な生態に魅力を感じたことがきっかけだった。身近な地下生菌類を用いて研究を行いたいと考えたところ、地元の海岸で安定して採取できるショウロ属が目にとまった。早速文献を調べてみると、日本産のショウロ属の孢子散布に関するまとまった研究はないものの、北アメリカのショウロ属は齧歯類 (*Clethrionomys californicus*, *Glaucomys sabrinus* など) に孢子散布を依存することが知られていた (Fogel & Trappe, 1978 ; Maser & Maser, 1988)。したがって、日本のショウロ属も同様の動物による孢子散布が予想された。加えて、子実体にはキノコバエ類などの幼虫も確認されるので、小型哺乳類などによる長距離散布以外にも節足動物などによる短距離の孢子散布もあるのでないかと考えた。よって、動物による散布も調べつつ、子実体を採取して、ショウロ属を摂食する昆虫の調査も始めた。具体的には、兵庫

県内の二箇所のフィールドからショウロ属 (ショウロとホンショウロの2種) を採取し、バーミキュライトを敷いたタッパーの中で数週間追培養し、羽化した昆虫を採取した。当初、節足動物 (特にキノコバエ類) が羽化してくるだろうと予想しており、実際、*Cordyla* 属のキノコバエ類が採取できた (図1)。



図1. ショウロ *Rhizopogon roseolus* の子実体から羽化した *Cordyla* 属のキノコバエ類。スケール: 1 mm.

この際、追培養していた子実体 (子実体の内部は既に液化していた) を実体顕微鏡で観察していたところ、子実体内部で何かが動いているように見えた。よく観察すると、子実体内部に何かいるようであった。子実体をカミソリで分解してみたところ、明らかにキノコバエ類の幼虫とは異なる大型の双翅目幼虫を発見した (図2A)。他の子実体も分解して内部を調べると同様の



図 2. A: ヤマトヒメナガヒラタハナアブ *Chamaesyphus japonicus* の幼虫。
B: ヤマトヒメナガヒラタハナアブの幼虫の消化管。摂食した孢子により褐色に見える。スケール: A=1 mm; B=2 mm.

双翅目幼虫が複数発見された。幼虫を解剖してみたところ消化管は大量の孢子により褐色になっており、孢子を摂食していることがわかった (図 2B)。ここで、幼虫の孢子散布者としての寄与を調べるために、幼虫の消化管内容物を調査したところ未消化の孢子が見つかった (著作権の関係上孢子の写真は掲載できなかったが、詳細は Okada et al. (2021) を参照されたい)。孢子が実際に発芽能力を持つかは不明であるが、外形がはっきり残っていることや油球をもった孢子も観察されたことを考慮すると、発芽能力を持っている可能性が高いと考えられる。ただし、孢子散布者としての能力を評価するためには、幼虫の移動距離や、土壌に潜って地下で蛹化するかどうか (菌根菌の場合は土壌中の宿主樹木に近い位置に孢子が運ばれることも重要であると考えられる) なども調べる必要がある。

この正体不明の幼虫を同定するために、残った幼虫と子実体を同じケースに入れて培養を続けた。6 週間ほどで成虫が羽化したので、標本を森林総合研究所の末吉昌宏氏に調べていただいたところ、ヤマトヒメナガヒラタハナアブと同定された (図 3)。興味深いことに、ヤマトヒメナガヒラタハナアブの成虫の報告は少なく、幼虫の食性に至っては一切不明であった。加えて、これまでに成虫が採取された場所はすべて海岸のクロマツ林であ



図 3. ショウロから羽化したヤマトヒメナガヒラタハナアブ *Chamaesyphus japonicus* の成虫。スケール: 2 mm.

ることがわかった (市毛、2014; 桂、2004)。さらに、成虫の出現時期もショウロ属の子実体の形成時期と重なっている (市毛、2014; 桂、2004)。これらのことは、ヤマトヒメナガヒラタハナアブがショウロ属を特異的に利用している可能性を示唆している。

今回の発見は、ヤマトヒメナガヒラタハナアブによるショウロ属の摂食を報告しただけでなく、地下生菌を利用するハナアブという特殊化した関係を明らかにした点で意義深いものであると考えている。近年、菌根菌の孢子散布者の重要性が広く議論されるようになってきた (Vašutová et al., 2019)。特に、地下生菌類の孢子散布に関しても興味深い研究が立て続けに発表されている。例えば、Stephens et al. (2020) は 4 種のツチダンゴ属菌に関して地下深くに子実体を形成する種ほど匂いが特徴的で齧歯類に選ばれやすいことを、Caiafa et al. (2021) は パタゴニアにおいて鳥類が地下生菌を含む菌根菌を広く摂食し孢子散布を担っていることを明らかにした。このような状況下で、地下生菌の多様性が高い本邦ではまだまだ面白い研究が展開できる可能性が高いのではないかと考えている。現在著者は菌根共生系の研究を主に行っているが、菌類を含む生物間相互作用について明らかにしたいという思いは変わっておらず、ショウロ属の孢子散布者など菌類と動物の相互作用に関する研究も続けていきたい。

謝辞

本研究を行うに当たって、Entomological Science 誌に掲載された論文の共著者である末次健司氏、末吉昌宏氏には多くの助言をいただきました。また、伊東正憲氏は快く文献を提供していただきました。この場をお借りし、厚くお礼申し上げます。

引用文献

- Caiafa M.V., Jusino M.A., Wilkie A.C., Díaz I.A., Sieving K.E., Smith M.E. (2021) Discovering the role of Patagonian birds in the dispersal of truffles and other mycorrhizal fungi. *Current Biology* 31: 5558–5570.
- Fogel R., Trappe J.M. (1978) Fungus consumption (mycophagy) by small mammals. *Northwest Science* 52: 1–30.
- 市毛 勝義 (2014) *Chamaesyrrhus japonicus* ヤマトヒメナガヒラタハナアブを愛媛県で採集. *はなあぶ* 38: 39–41.
- 桂 孝次郎 (2004) ヤマトヒメナガヒラタハナアブの雄の発見と生態的新知見. *はなあぶ* 17: 7–12.
- Maser C., Maser Z. (1988) Interactions among squirrels, mycorrhizal fungi, and coniferous forests in Oregon. *The Great Basin Naturalist* 48: 358–369.
- Okada H., Sueyoshi M., Suetsugu K. (2021) Consumption of the ectomycorrhizal fungi *Rhizopogon roseolus* and *R. luteolus* by *Chamaesyrrhus japonicus* (Diptera: Syrphidae). *Entomological Science* 24: 123–126.
- Stephens R.B., Trowbridge A.M., Ouimette A.P., Knighton W.B., Hobbie E.A., Stoy P.C., Rowe R.J. (2020) Signaling from below: rodents select for deeper fruiting truffles with stronger volatile emissions. *Ecology* 101: e02964.
- Vašutová M., Mleczko P., López-García A., Maček I., Boros G., Ševčík J., Fujii S., Hackenberger D., Tuf I.H., Hornung E., Páll-Gergely B., Kjølner R. (2019) Taxi drivers: the role of animals in transporting mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 29: 413–434.

その他普及記事 (Other articles)

映画『白いトリュフの宿る森』 試写会体験記

Movie preview: The Truffle Hunters

保坂 健太郎^{1*}, 佐々木 廣海²

Kentaro Hosaka^{1*}, Hiromi Sasaki²

¹ 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, 4-1-1 Amakubo, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0005, Japan

² 神奈川県藤沢市

Fujisawa-shi, Kanagawa Prefecture, Japan

* Corresponding author (主著者)

E-mail: khosaka@kahaku.go.jp

Article Info: Submitted: 18 January 2022 Published: 31 March 2021

去る2022年1月27日、東京にあるソニー・ピクチャーズ エンタテインメント虎ノ門オフィスにて開催された、映画『白いトリュフの宿る森』 マスコミ向け試写会に参加する機会に恵まれた。映画は2022年2月18日(金)から公開されるので、本記事が出版される頃には、すでに多くの会員が映画を楽しんでいるかもしれない。が、執筆時点では日本国内の「トリュフ関係者(広義)」でこの映画を見たのは保坂・佐々木の2名だけであると自負しているので、一足先に(そして内容を忘れてしまわないうちに)映画の感想を記しておきたい。

映画の舞台は北イタリアのピエモンテ州。だから登場人物はみんなイタリア語(Wikipediaによれば一部はピエモンテ語)で話す。てっきりイタリア映画かと思っていたが、監督はアメリカ人。映画が公開されたのは2021年3月ということだ。原題はズバリ“The Truffle Hunters”となっていて、これがなぜ邦題で「白いトリュフの〜」になったのかは聞きそびれたが、「トリュフ・ハンター」とするよりはずっと、この映画のもつどこかミステリアスな雰囲気うまく反映している気がする。

最初に断っておきたいのだが、この映画は決して地下生菌の探し方、見分け方を勉強するためのハウツーものではない。あまりいないと思うが、もし多種多様な地下生菌が掘り出される場面を期待しているとしたら、残念ながらその希望はかなわない。なにしろ登場するトリュフはただ一種。アルバ産の白トリュフ、すなわち *Tuber magnatum* だけなのだ。映画のチラシにも「夜な夜なおじいさん達が〜」とか「最高のドッグムービー」などの文字が並ぶ。つまり、白トリュフとそれを探す人々とトリュフ犬、

そしてトリュフの生み出す富に群がる人々などをめぐる群像劇ドキュメンタリー、というのがこの映画の本質なのだと思う。

しかしやはりトリュフ映画。トリュフを探す場面はたくさん登場する。日本地下生菌研究会の採集会などで見られる風景とはガラッと違う雰囲気を、存分に味わってほしい。この映画を見るまでに、ヨーロッパでのトリュフ狩りについて漠然と抱いていたイメージとは異なる、意外な場面がいくつかあった。例えば映画の冒頭では、初老の男性(トリュフハンターの一人)と愛犬がトリュフを探して山の中を進んでいくのだが、かなりの急斜面を登っている場面もあった。広大な平野部で探すものと思っていたが、必ずしもそうではないらしい。また、かなり雪が降り積もる時期にトリュフ狩りに出かけていく様子も描かれていた。会員のみなさんも雪の日に地下生菌探しはなかなかしないだろうし、実際にあまり採れないと思う。でも、真冬にもう少し頑張ってみても良いかもしれない。

もうひとつ意外だったのは、トリュフ犬がトリュフを見つける場面である。いまさら豚が主力であると思っている人はいないと思うが、豚はトリュフを見つけると興奮して齧ってしまい、人間と取り合いになるからダメ。よく躡けられた犬はトリュフをきれいなまま人間に渡してくれるから最高、というようなことを聞いたことがあるのではないだろうか?でも映画の中のトリュフ犬は、トリュフを発見するとまさに興奮状態で、トリュフから引きはがすのに一苦労(爪の跡もついてしまう)、といった感じだ。もちろん豚の興奮とは意味合いが異なると思うが、犬とボールで遊んだあとに、ボールの表面がツバでねっとり濡れている様子が、そのままトリュフ

に当てはまることがあるのかもしれない。

そのほかにも、トリュフ狩りの最高のポイントは自分の子供にも教えないとか、トリュフ狩り仲間も高齢化が進んでいるとか、ライバルを出し抜くために卑怯な手を使うとか（これはネタバレにもなるのであえて詳しくは紹介しないが、かなり残酷な手を使うこともあるらしい）、異国の雰囲気満載の映画なのだが、ヨーロッパのトリュフ狩りの本質はマツタケ狩りと共通する点がとても多そうだ。研究会の会員に関連していそうなこととしては、トリュフがひっそり埋もれていると思うと居ても立っても居られずに家を抜け出し森へ行く、そんなおじいさんが奥さんに叱られる場面も登場する。みなさんも自分の胸に手を当てて考えるべきかもしれない。

2020年以降は新型コロナウイルス騒ぎがあり、あまり外にも行けずストレスを感じている人も多いと思う。しかしきのこ映画の当

たり年でもあり、「素晴らしき、きのこの世界」に引き続き本作「白いトリュフの宿る森」が公開される。再びみんなで集まって存分に地下生菌探しができる日が来るときにそなえ、このトリュフ映画を見て気分を盛り上げておくことをおススメする。なお、予告映像を含めた映画の情報は、公式ホームページ (<https://www.truffle-movie.jp>) より確認できる（注：ただし、当初の上映予定は3月24日までとされている）。

謝辞

試写会の参加にあたり、株式会社アンブラグドの天野 あゆみさん、ソニー・ピクチャーズ エンタテインメントの森島奈津子さん、ハート & ハートの山中佐知子さんには大変お世話になりました。この場をお借りして御礼申し上げます。

Truffology (日本地下生菌研究会会報) 第5巻1号

編集長 山本 航平 (栃木県立博物館)
編集担当 折原 貴道 (神奈川県立生命の星・地球博物館)
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. 5 No. 1

Editor-in-Chief Kohei Yamamoto (Tochigi Prefectural Museum, Japan)
Editors Takamichi Orihara (Kanagawa Prefectural Museum of Natural History, Japan)
Akihiko Kinoshita (Forestry and Forest Products Research Institute, Japan)
Masahide Yamato (Faculty of Education, Chiba University, Japan)

発行日 : 2022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 : <https://jats-truffles.org/truffology/>