

©oso

Bulletin of the Japanese Association for Truffle Science

Volume 7, Issue 1, December 2024

Truffology

(日本地下生菌研究会会報)

第7卷1号(2024年12月)

Contents

(Volume 7, Issue 1, December 2024)

Original peer-reviewed articles

Taiga Kasuya, Ei Kawahara, Kentaro Hosaka: A new distributional record of *Elaphomyces fuscus* from Japan: as a new host of *Tolypocladium japonicum* (in English) 1

Observations

Takamichi Orihara, Mitsuru Hisataka: Second locality of a rare true truffle, *Tuber iryudaense* (in Japanese) 9

Specimen lists

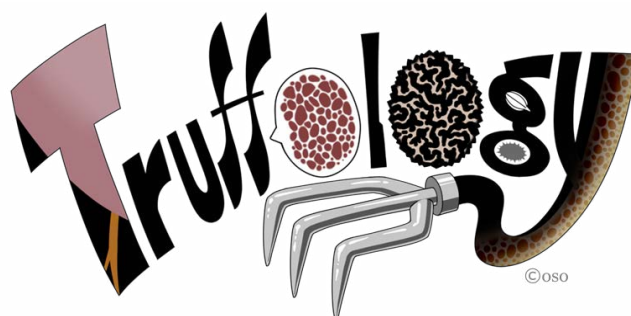
Haruhiko Sakuraba, Mie Sakuraba: Truffles and truffle-like fungi collected in 2023 in Kagawa Prefecture (in Japanese) 13

Takamichi Orihara, Hiromi Sasaki: Truffle-like fungi collected in the 5th and 6th JATS Foray (in Japanese) 17

Essays and other articles

Hiroshi Abe: Introduction to “Habitat fragmentation strongly restricts gene flow in endangered ectomycorrhizal fungal populations: Evidence from *Rhizopogon togasawarius*, specific to *Pseudotsuga japonica*, across the entire distribution range” (in Japanese) 21

The effective publication date of each article is shown in the first page of the article.



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

A new distributional record of *Elaphomyces fuscus* from Japan: as a new host of *Tolypocladium japonicum*

ゴマタマツチダンゴの日本における新たな分布記録：タンポタケモドキの新宿主として

Taiga Kasuya^{1*}, Ei Kawahara², Kentaro Hosaka³糟谷 大河^{1*}, 河原 栄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 Department of Pathology, Fukui General Hospital, 58-16-1 Egami-cho, Fukui, Fukui 910-8561, Japan
〒 910-8561 福井県福井市江上町 58-16-1

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

An *Elaphomyces* species parasitized by *Tolypocladium* sp. was observed in Itako, Ibaraki Prefecture, central Japan. Based on morphological observations and molecular identification using nuclear ribosomal DNA sequences of both *Elaphomyces* and *Tolypocladium* spp., the present fungus and its parasite were identified as *Elaphomyces fuscus* and *Tolypocladium japonicum*, respectively. We report *E. fuscus* as a first record outside the type locality and a new host of *T. japonicum*.

要旨

茨城県潮来市において、トリボクラジウム属菌が寄生したツチダンゴ属菌の一種が観察された。本菌ならびにトリボクラジウム属菌のそれぞれについて、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分子同定を行った。その結果、本菌はゴマタマツチダンゴ *Elaphomyces fuscus*、それに寄生していたトリボクラジウム属菌はタンポタケモドキ *Tolypocladium japonicum* とそれぞれ同定された。ゴマタマツチダンゴを基準標本産地以外から初めて記録するとともに、タンポタケモドキの新宿主として報告する。

Article Info: Submitted: 18 May 2023 Accepted: 10 January 2024 Published: 31 May 2024

Introduction

Among ca. 20 known species of the genus *Elaphomyces* T. Nees (Eurotiales, Elaphomycetaceae) in Japan, *E. fuscus* M. Shirakawa and *E. marmoratus* M. Shirakawa have been described recently as new taxa (Hatakeyama & Orihara, 2022; Shirakawa & Tanaka, 2020). These two species were described based on specimens collected in secondary mixed forests of Ome, Tokyo, and known only from the type locality (Shirakawa & Tanaka, 2020). In 2022,

a mushroom foray organized by Ibaraki Nature Museum was held in Suigo Prefectural Forest Park, Itako, Ibaraki Prefecture, central Japan. During the foray, several collections of *Tolypocladium* sp. (Hypocreales, Ophiocordycipitaceae) parasitized to fruiting bodies of *Elaphomyces* sp. were obtained by its participants (Fig. 1A, B). Simultaneously ascomata of *Elaphomyces* sp. without stromata of *Tolypocladium* sp. were also collected at the same locality (Fig. 1C). Based on morphological observations and molecular identification



Fig. 1. Fruiting bodies of *Tolypocladium japonicum* and *Elaphomyces fuscus*. A: Stromata of *T. japonicum* in the natural habitat (INM-2-229315). B: Stromata of *T. japonicum* arising from fruiting bodies of *E. fuscus*. (INM-2-229315). C: Immature ascomata of *E. fuscus* (INM-2-229316).

using nuclear ribosomal DNA sequences of both *Elaphomyces* and *Tolypocladium* spp. specimens, they were identified as *E. fuscus* and *Tolypocladium japonicum* (Lloyd) C.A. Quandt, Kepler & Spatafora, respectively. Our morphological observations and molecular identification of both specimens revealed that it is the first distributional record of *E. fuscus* outside the type locality and is a new host fungus of *T. japonicum*.

Materials and methods

Sample collecting and morphological observations

Fresh samples were collected in secondary mixed forests dominated by *Quercus serrata* Murray and *Pinus densiflora* Siebold & Zucc. of Suigo Prefectural Forest Park, Itako, Ibaraki Prefecture in July 2022. Fresh materials were photographed and observed macroscopically and then they were air-dried using a food dehydrator (Snackmaster Express FD-60; Nesco/American Harvest, Milwaukee, WI, USA) under 46 °C for 46 hours. Dried specimens examined in this study were deposited at the mycological herbaria of Ibaraki Nature Museum (INM) and National Museum of Nature and Science (TNS) in Japan.

For light microscopy, dried fungal tissues were revived with water and fixed with neutral buffered 10% formalin. The fixed tissues

were dehydrated, replaced with xylene, and then embedded with paraffin. Deparaffinized thin sections (6 µm thick) were stained with hematoxylin and eosin (Feldman & Wolfe, 2014), a routine staining method for formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections (Bass et al., 2014; Van den Tweel et al., 2010). Measurements of various lengths were done on photomicrographs of the FFPE fungal sections and analyzed with a free image analyzing application, Image J (Abramoff et al., 2004; Schneider et al., 2012). Measurements of sizes of ascospores of *Elaphomyces* specimens, which were much larger than the width of fungal tissue sections, were done on photomicrographs of ascospores smeared on a 3% KOH-mounted glass slide. In addition, the surface features of ascospores of the *Elaphomyces* specimen were observed by scanning electron microscopy (SEM). For SEM, a small portion from spore mass 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 10 kV.

DNA preparation, PCR and sequencing

DNA extraction, PCR and DNA sequencing of specimens examined in the present study were carried out according to the

methods introduced by Kasuya et al. (2012, 2022). DNA was extracted from inner peridium and/or gleba of *Elaphomyces* sp., and fertile parts of *Tolypocladium* specimens. DNA sequence data were obtained from the nuclear ribosomal internal spacer region (ITS) and a part of the large subunit gene (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 and sequencing were carried out following the same methods previously described in Kasuya et al. (2012, 2022).

Molecular identification

Newly generated ITS and LSU sequences from Japanese specimens were used for DNA barcoding to identify each species. The obtained raw sequences were assembled using ATGC version 6.0.1 (GENETYX Corporation, Tokyo, Japan). Assembled sequences were analyzed using the GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) search (blastn) to confirm their phylogenetic affinities. Default settings of blastn option were used for the analyses. A total of four newly

generated and assembled sequences from this study were deposited to the International Nucleotide Sequence Databases (INSD; accession nos.: OQ991235–OQ991238).

Results

Morphological observations

One to four stromata of *Tolypocladium* sp. emerged directly from underground ascomata of *Elaphomyces* sp. (Fig. 1A, B), they were clavate, unbranched, with a slightly compressed apex, 5–20 mm long, 5–7 mm broad at fertile parts which were tan-colored to blackish brown, on a cylindrical stipe, surface roughened by ostioles, solid in the center but holes possibly eaten by fly larvae were observed (Figs. 1A and 2A, B). Stipes were 25–65 mm long, 2–5 mm broad, cylindrical, sometimes bifurcate, white, cream or pale yellow to pale gray, lacking the rhizomorphous structure on the basal part (Figs. 1B and 2A). Perithecia were wholly or partially immersed, ovoid to ellipsoid, 400–450 × 130–180 μm, with papillate ostioles. Ascospores were hyaline, long cylindrical, disarticulated into part-spores within asci; part spores were cylindrical, 10–20 × 3.0–3.4 μm (Fig. 2C). In addition to the stipe of *Tolypocladium* sp.

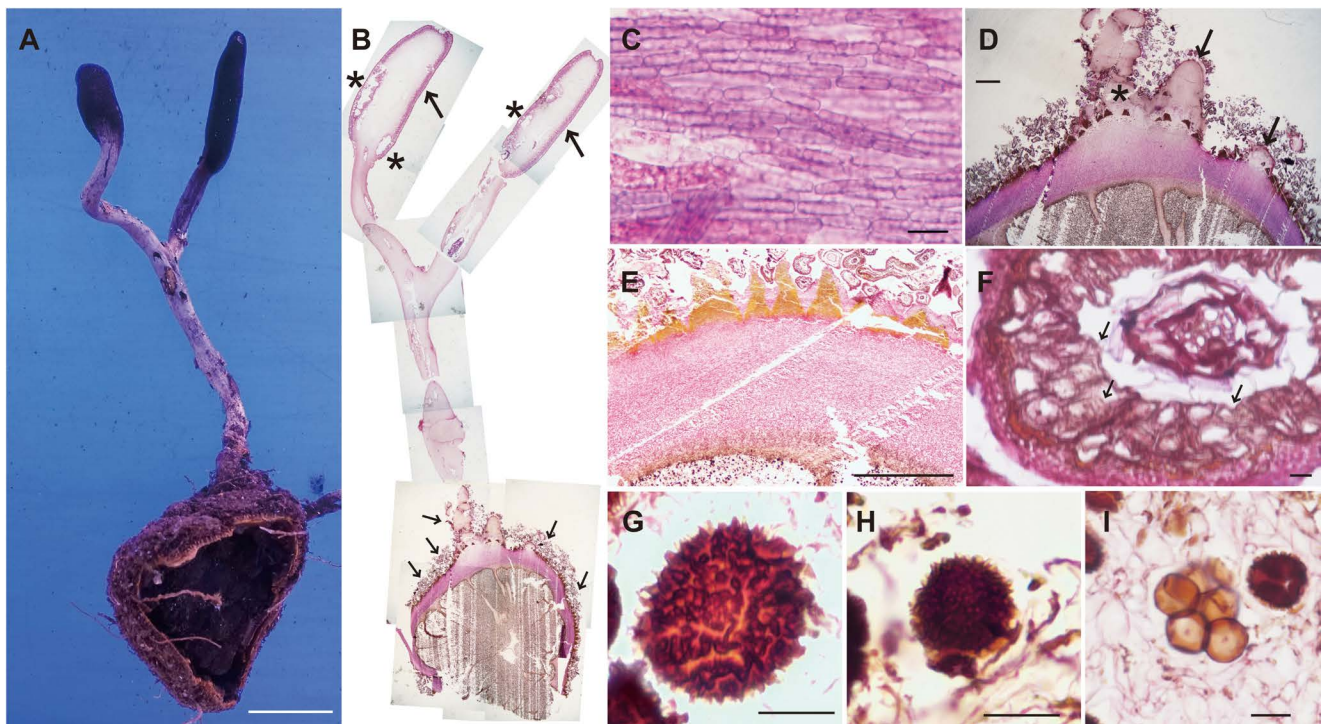


Fig. 2. Morphological features of *Elaphomyces fuscus* with mature stromata of *Tolypocladium japonicum* (INM-2-229315). A: The ascoma of *E. fuscus* with stromata of *T. japonicum* after formalin-fixation. B–I: Whole structures of ascomata of *E. fuscus* with stromata of *T. japonicum* showing by the formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) thin (6 μm thick) sections stained with hematoxylin and eosin. B: Layers of perithecia just beneath the surface of the fertile parts of *T. japonicum* (large arrows), ectomycorrhizal root tips (small arrows) and the inner structures of *E. fuscus* are clearly visible. Asterisks show holes possible eaten by fly larvae in the stroma of *T. japonicum*. C: Segmentalized and articulated ascospores of *T. japonicum*. D: A stipe of mature stroma of *T. japonicum* growing out of the surface of *E. fuscus* (asterisk), with another two buds (arrows) of possible *T. japonicum* in its vicinity. E: Peridium and surface warts of the ascoma of *E. fuscus*. F: The vertical section of ectomycorrhizal roots covering the ascoma of *E. fuscus*. Penetrations of the Hartig net beyond the epidermis to enclose several layers of cortical cells are frequently observed (arrows). G: A large-sized ascospore. H: A small-sized ascospore. I: An ascus containing five ascospores or more. Spores do not show ornamentation. Bars: A = 1 cm; C, F–I: 10 μm; D, E = 1 mm.

another two buds of possible this fungus were visible in the FFPE thin sections (Fig. 2D).

Underground ascomata of *Elaphomyces* sp. parasitized by *Tolypocladium* sp. were 20–25 × 22–25 mm, globose, subglobose to oval, rigid and covered with soil, earthy crust and ectomycorrhizal roots (Figs. 1B and 2A, B). Warts of ascomata surfaces were conical, dark yellow, partly with pale purplish tinge, the peridium was white in the outer layer and brown in the inner layer, not marbled, and the inside of the peridium was packed with powdery, dark brown to blackish gleba (Figs. 1B and 2A, B). Warts were microscopically dark yellow, $334 \pm 81.0 \mu\text{m}$ high, which were covered with thin (80–150 μm) layer of hyaline hyphae, were on the peridium (Fig. 2E). The peridium was composed of compactly woven hyalinous hyphae, outer layer was consisted by hyaline hyphae, and inner layer was made up of brown hyphae. The membranous septae radiated from the center and connected to the peridium (Fig. 2B, D). Inside of the peridium was packed with numerous dark brown to blackish ascospores and sparsely distributed hyalinous hyphae which presumably originated from parasitized *Tolypocladium* (Fig. 2B, D and E). Ascospores were globose to subglobose, and the mean of the quotient was $1.08 \pm 0.06 \mu\text{m}$. The dispersion of spore lengths (mean = 24 μm , median = 26 μm) was high, (15–) 20–28 (–33) μm (Fig. 3, box-whisker plots of INM-2-229315) with ornamentation, and the distribution pattern did not show Gaussian but they were biphasic (Fig. 3, scatter plots of INM-2-229315) with larger and smaller ones. Surfaces of large-sized ascospores were reticulate, 1.5–3.0 μm high, dark reddish brown under the microscope, and apices of each reticulation were conical, capitulate or obtuse head and irregularly shaped, broadly base to costate with labyrinthine pattern (Fig. 2G). Surfaces of small-sized ascospores were also dark reddish brown under the microscope, and reticulate with conical, capitulate or obtuse tips and with polygonal to labyrinthine bases, 1.5–2.5 μm high (Fig. 2H). A few, 12–15 μm in lengths of asci were observed with not reticulated ascospores (Fig. 2I).

There were numerous ectomycorrhizal roots (Figs. 1B and 2B, F) both around the *Elaphomyces* ascomata and the base of the stipe of *Tolypocladium* sp., even around the buds of possible this fungus (Fig. 2B, D). Ectomycorrhizal root tips were directly connected to the hyphae in the both *Elaphomyces* and *Tolypocladium* fruiting bodies. The vertical section of a mycorrhizal tip covering the ascoma of *E. fuscus* (Fig. 2F) clearly shows penetrations of the Hartig net beyond the epidermis to enclose several layers of cortical cells and it suggests the typical ectomycorrhizal structure of gymnosperm trees (Smith & Read, 2008).

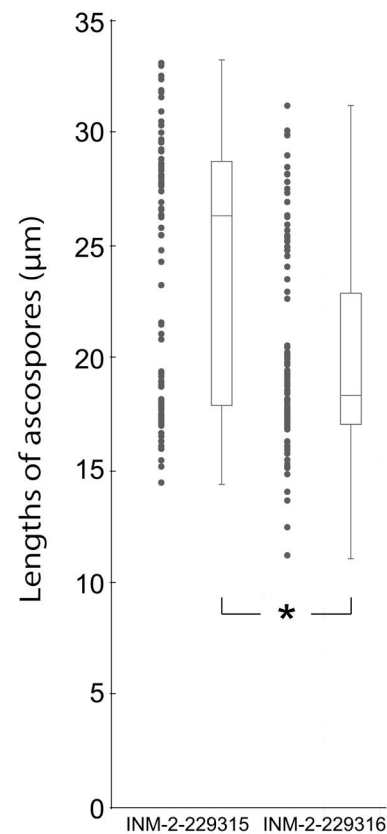


Fig. 3. Scattered plots and box-whisker plots showing the distribution or dispersion of spore lengths of *E. fuscus* with (INM-2-229315, $n = 87$) and without (INM-2-229316, $n = 107$) mature stromata of *T. japonicum*. Scatter plots show biphasic patterns of the distribution. Box and whisker plots show the high dispersion and the difference of medians. An asterisk (*) indicates the significant difference ($p = 0.0000039$) using Mann-Whitney U test.

Underground *Elaphomyces* ascomata without stromata of *Tolypocladium* sp. were 8–23 × 8–18 mm, globose, subglobose to oval, rigid and covered with soil, earthy crust and ectomycorrhizal roots (Figs. 1C and 4A). Warts of ascomata surfaces were conical, dark yellow, partly with pale purplish tinge, the peridium was white with partly purplish tinge in the outer layer, and brown, not marbled in the inner layer; the inside of the peridium was packed with gleba which are compact and white to brown when immature, but becoming powdery and black-brown at maturity (Figs. 1C and 4A). Ascomata have short protrusions on the top, which turned out to be the possible buds of *Tolypocladium* stromata by the thin FFPE sections, although not sequenced (Fig. 4B). Ascospores were globose to subglobose, and the mean of the quotient was $1.12 \pm 0.14 \mu\text{m}$. The dispersion of spore lengths (mean = 20 μm , median = 18 μm) was (11–) 17–23 (–31) μm (Fig. 3, box-whisker plots of INM-2-229316) with ornamentation, and the distribution pattern showed biphasic (Fig. 3, scatter plots of INM-2-229316 and Fig. 4C). Both the mean and the median of ascospores of *Elaphomyces* sp. without mature *Tolypocladium* stromata were significantly smaller than

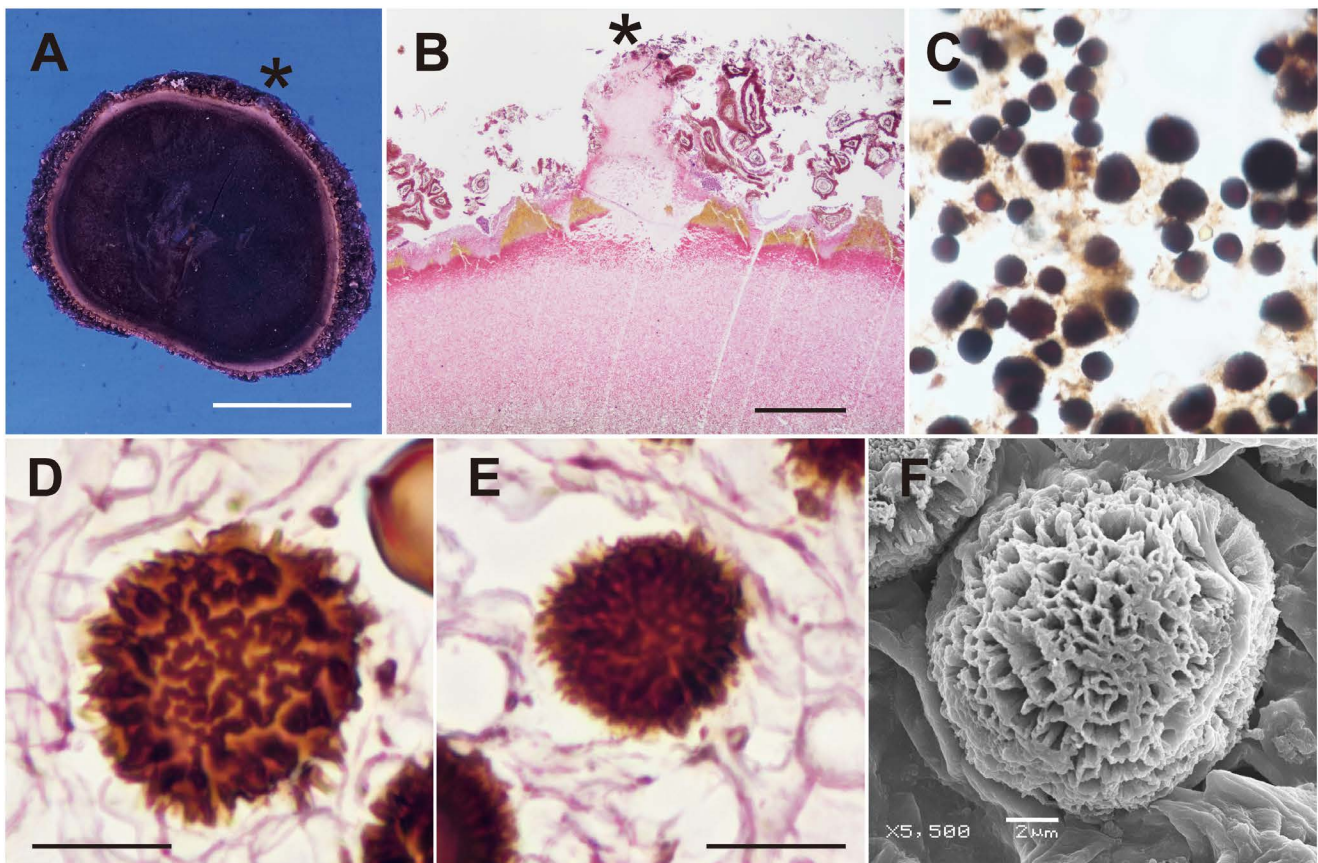


Fig. 4. Morphological features of *Elaphomyces fuscus* without mature stromata of *Tolypocladium japonicum* (INM-2-229316). A: The ascoma of *E. fuscus* after formalin fixation. B–D: Microscopic features of *E. fuscus* showing by the FFPE thin section stained with hematoxylin and eosin. B: The bud of possibly *T. japonicum* (asterisk) growing out of *E. fuscus* and breaking through the warts. The structure is also visible macroscopically as a short protrusion on the top of *E. fuscus* (asterisk in A). C: Unstained spores directly smeared on the glass slide showing the biphasic pattern of the spore sizes. D: A large-sized ascospore. E: A small-sized ascospore. F: Scanning electron microscopy image of a small-sized ascospore. Bars: A = 1 cm; B = 500 μ m; C–E = 10 μ m; F = 2 μ m).

those with mature stromata of *Tolypocladium* sp. Further, numbers of large-sized ascospores were much more and numbers of small-sized spores were much less than those in *Elaphomyces* sp. with mature *Tolypocladium* stromata. Surfaces of large-sized ascospores were reticulate, dark reddish brown under the microscope, and apices of each reticulation were conical, capitulate or obtuse head and irregularly shaped, broadly base to costate with labyrinthine pattern (Fig. 4D). Surfaces of small-sized ascospores were also dark reddish brown under the microscope, and reticulate with conical, capitulate or obtuse tips and with polygonal to labyrinthine bases (Fig. 4E, F). Only a few asci were observed with non-reticulate ascospores.

Molecular identification

The BLAST search indicated that sequences of the present *Tolypocladium* specimen (ITS: OQ991237, 565 bp; LSU: OQ991235, 895 bp) share highest similarities with *T. japonicum* (Tables 1 and 2). The top two hits of ITS BLAST search were all *T. japonicum* (98.56 to 99.29% similarities), and next hits were

T. guangdongense (T.H. Li, Q.Y. Lin & B. Song) V. Papp (INSD accession nos. MT386337–MT386340) from China at all of 93.18% similarity (Table 1). The top two hits of LSU BLAST search (99.77 to 100.00%) were also *T. japonicum* (INSD accession nos. AB027366 and DQ518761; Table 2).

The BLAST search indicated that the ITS sequence of the present *Elaphomyces* specimen (OQ991238, 680 bp) shares highest similarities with *E. fuscus* (Table 3). The top three hits of ITS BLAST search were all *E. fuscus* (99.63 to 99.84% similarities) including the sequence from the holotype (Table 3), and the next hit was “Uncultured *Elaphomyces* YM56” (INSD accession no. LC175083) from Iwate, Japan at 97.40% similarity. No LSU sequences from *E. fuscus* are currently available from INSD. The top six hits of BLAST search (all of 99.78%) of LSU sequence (OQ991236, 911 bp) of the present *Elaphomyces* specimen were *E. asperulus* Vittad. (INSD accession nos. KR029753–KR029755 and KR064762) from Denmark, Italy and Sweden (Molia et al., 2020), and *E. roseoviolaceus* A. Molia & E. Larss. (INSD accession nos. KR029750 and KR029751) from Norway (Molia et al., 2020).

Table 1. Similarities of the ITS sequence (OQ991237, 565 bp) of the present *Tolypocladium* specimen (INM-2-229315) resulted by BLAST search

INSD accession no.	Taxon names	Origin	Sequence similarities	Sequence lengths (bp)
AB027366	<i>Tolypocladium japonicum</i>	Japan	99.29%	1690
KT873533	<i>T. japonicum</i>	Taiwan	98.56%	601
MT386340	<i>T. guangdongense</i>	China	93.18%	597
MT386339	<i>T. guangdongense</i>	China	93.18%	572
MT386338	<i>T. guangdongense</i>	China	93.18%	614
MT386337	<i>T. guangdongense</i>	China	93.18%	597

Table 2. Similarities of the ITS sequence (OQ991237, 565 bp) of the present *Tolypocladium* specimen (INM-2-229315) resulted by BLAST search

INSD accession no.	Taxon names	Origin	Sequence similarities	Sequence lengths (bp)
AB027366	<i>T. japonicum</i>	Japan	100.00%	1690
DQ518761	<i>T. japonicum</i>	unknown	99.77%	886
OP207731	<i>T. capitatum</i>	China	97.43%	901
AB027364	<i>T. capitatum</i>	Japan	97.43%	1653
OP207735	<i>T. paradoxum</i>	Japan	97.43%	900

Table 3. Similarities of the ITS sequence (OQ991237, 565 bp) of the present *Tolypocladium* specimen (INM-2-229315) resulted by BLAST search

INSD accession no.	Taxon names	Origin	Sequence similarities
LC500967*	<i>Elaphomyces fuscus</i>	Japan	99.84%
LC500968	"uncultured <i>Elaphomyces</i> " (mycorrhizal root tips of <i>E. fuscus</i>)	Japan	99.82%
LC523911	<i>E. fuscus</i>	Japan	99.63%
LC175083	"uncultured <i>Elaphomyces</i> YM56"	Japan	97.40%
KX238833	<i>E. asperulus</i>	Spain	95.90%
KR029750	<i>E. roseoviolaceus</i>	Norway	95.59%
KR029751	<i>E. roseoviolaceus</i>	Norway	95.59%
KX165346	<i>E. asperulus</i>	Norway	95.26%

*Sequence from the holotype of *E. fuscus*.

Discussion

Morphological features of *Tolypocladium* specimens examined in the present study such as clavate stromata on a cylindrical stipe, and lacking of the rhizomorphous structure on the basal part of stromata are well agreement in the previous descriptions of *T. japonicum* (Imai, 1935; Ke & Ju, 2015; Kobayasi & Shimizu, 1960). Microscopic features of perithecia and ascospores are also almost identical to descriptions of *T. japonicum* (Ke & Ju, 2015; Kobayasi & Shimizu, 1960). Moreover, ITS and LSU sequences newly generated in the present study show high similarities with those of *T. japonicum* from Japan and Taiwan (Tables 1 and 2). We therefore recognized the *Tolypocladium* specimens examined as *T. japonicum* as below.

***Tolypocladium japonicum* (Lloyd) C.A. Quandt, Kepler & Spatafora**, IMA Fungus 5: 126 (2014).

Figs 1 and 2.

Specimens examined: JAPAN, Ibaraki Prefecture, Itako, Shimasu, Suigo Prefectural Forest Park, (approx. 35°58'52"48N, 140°32'22"32E, alt. approx. 24 m asl.), July 3, 2022, coll. Y. Otaki, INM-2-229315 [INSD accession no.: OQ991237 (ITS), OQ991235 (LSU)]; same locality, July 3, 2022, coll. T. Kasuya, *Kasuya B4723* (TNS).

Habitat: On ascomata of *Elaphomyces* spp.

Known distribution: Japan (Imai, 1935; Kobayasi & Shimizu, 1960), China (Liang et al., 2003), Taiwan (Ke & Ju, 2015) and Austria (Kobayasi & Shimizu, 1960; Mains, 1957).

Japanese name: Tanpotake-modoki (Imai, 1935).

Morphologically, ascomata of *Elaphomyces* with mature stromata of *T. japonicum* and without them were very similar. These *Elaphomyces* specimens share morphological similarities with *E. fuscus* in the following features: (1) dark yellow warts of ascomata, (2) whitish outer layer of the peridium, (3) dark brown to blackish powdery gleba, and (4) reticulate, dark reddish brown ascospores under the microscope. Aforementioned characteristics are main diagnostic features of *E. fuscus* and the present *Elaphomyces* specimens were morphologically almost identical to the original description of *E. fuscus* (Shirakawa & Tanaka, 2020). In addition, the ITS sequence newly generated in the present study shows high similarity (99.84%) with those of from the holotype of *E. fuscus* (Table 3). We therefore recognized the specimens examined with or without stromata of *T. japonicum* as *E. fuscus* as below.

Elaphomyces fuscus M. Shirakawa, Mycoscience 61: 319 (2020).

Figs 1, 2 and 4.

Specimens examined: JAPAN, Ibaraki Prefecture, Itako, Shimasu, Suigo Prefectural Forest Park, (approx. 35°58'52"48N, 140°32'22"32E, alt. approx. 24 m asl.), July 3, 2022, coll. T. Kasuya, INM-2-229316 [INSD accession no.: OQ991238 (ITS), OQ991236 (LSU)]; same locality, July 3, 2022, coll. Y. Otaki, *Kasuya B4724* (TNS).

Habitat: Hypogeous, growing in clusters 3–10 cm underground under *Quercus serrata* and *Pinus densiflora* trees.

Known distribution: Japan (Tokyo: Shirakawa & Tanaka, 2020; Ibaraki: new record).

Japanese name: Gomatama-tsucidango (Shirakawa & Tanaka, 2020).

Notes: Reticulate ascospores of *E. fuscus* are main distinguishable features from *E. granulatus* Fr., and also the present species differs from *E. japonicus* Lloyd in its reticulate ascospores and yellowish warts of ascomata (Shirakawa & Tanaka, 2020). Similarities of ITS and LSU sequences of *E. fuscus* and *E. asperulus* are high (ITS: 95.26 to 95.90%; LSU: 99.78%), and also, both species are morphologically similar, but the peridium of the former is not homogeneously purplish hue such as the latter species (Paz et al., 2017; Shirakawa & Tanaka, 2020). Ascospores of *E. asperulus* show confluent warty ornamentation while those of *E. fuscus* are labyrinthine, irregular meshes (Paz et al., 2017; Shirakawa & Tanaka, 2020). Although ITS and LSU sequences of *E. roseoviolaceus* also shows high similarity (ITS: 95.59%; LSU: 99.78%) with those of *E. fuscus*, morphological features of both species are quite different. *Elaphomyces roseoviolaceus* has spiny verrucose ascospores and dark pink to violaceous peridium (Molia et al., 2020).

Elaphomyces fuscus was previously known only from the type locality. We revealed that the first distributional record of *E. fuscus* outside the type locality by morphological observations and molecular identification of the present *Elaphomyces* specimens. As above mentioned, the vertical section of a mycorrhizal tip covering the ascoma of *E. fuscus* (Fig. 2F) shows the typical ectomycorrhizal structure of gymnosperms. Because the present *Elaphomyces* specimens were collected underneath *Q. serrata* and *P. densiflora* trees, we treat this is a portion of *P. densiflora* roots. Previously ectomycorrhizal association of *Q. serrata* with *E. fuscus* was reported only (Shirakawa & Tanaka, 2020), therefore we here add *P. densiflora* as a novel host plant of *E. fuscus*. Additionally, we report *E. fuscus* as a new host fungus of *T. japonicum*. Although ascomata of *E. fuscus* with mature stromata of *T. japonicum* and without them

Acknowledgements

are morphologically very similar each other, sizes of ascospores are different (Fig. 3). Further studies are required to clarify the mechanism of formation of different sizes of ascospores.

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 deeply thank Ms. Yua Otaki, Ms. Mihoko Uzawa, Mr. Yoshinori Inaba and volunteer staffs of Ibaraki Nature Museum 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 in part by JSPS KAKENHI Grant Numbers JP20K06805 and JP23K05895.

References

- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J. (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36–42.
- Bass, B.P., Engel, K.B., Greytak, S.R., Moore, H.M. (2014) A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue: how well do you know your FFPE specimen? *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 138: 1520–1530.
- Feldman, A.T., Wolfe, D. (2014) Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Histopathology: Methods in Molecular Biology* 1180: 31–43.
- Hatakeyama, S., Orihara, T. (2022) Taxonomic history of the genus *Elaphomyces*, with emphasis on *E. granulatus* and *E. muricatus*. *Truffology* 5: 69–75 (in Japanese with English summary).
- Imai, S. (1935) Studies on the Hypocreaceae of Japan II. *Transactions of the Sapporo Natural History Society* 14: 101–106.
- Kasuya T., Hosaka K., Uno K., Kakishima M. (2012) Phylogenetic placement of *Geastrum melanocephalum* and polyphyly of *Geastrum triplex*. *Mycoscience* 53: 411–426.
- Kasuya T., Uzawa M., Hosaka K. (2022) *Scleroderma capeverdeanum*, a subhypogeous fungus new to Japan, collected from the *Eucalyptus* plantation in Ibaraki Prefecture. *Truffology* 5: 23–32.
- Ke, Y.-H., Ju, Y.-M. (2015) Two rare ophiocordycipitaceous fungi newly recorded in Taiwan. *Botanical Studies* 56: 30.
- Kobayasi, Y., Shimizu, D. (1960) Monographic studies of *Cordyceps* 1. Group parasitic on *Elaphomyces*. *Bulletin of the National Science Museum, Tokyo* 5: 69–85.
- Liang, Z.-Q., Liu, A.-Y., Liu, M.-H. (2003) Two new records of mycogenous *Cordyceps* in China. *Mycosystema* 22: 159–160.
- Mains, E.B. (1957) Species of *Cordyceps* parasitic on *Elaphomyces*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 84: 243–251.

- Molia, A., Larsson, E., Jeppon, M., Læssøe, T., Larsson, K.H. (2020) *Elaphomyces* section *Elaphomyces* (Eurotiales, Ascomycota) — taxonomy and phylogeny of North European taxa, with the introduction of three new species. *Fungal Systematics and Evolution* 5: 283–300.
- Paz, A., Bellanger, J.M., Lavoise, C., Molia, A., Ławrynowicz, M., Larsson, E., Ibarguren, I.O., Jeppson, M., Læssøe, T., Sauve, M., Rizhard, 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.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671–675.
- Shirakawa, M., Tanaka, M. (2020) Two new deer truffle species, *Elaphomyces marmoratus* and *Elaphomyces fuscus* spp. nov., from a secondary forest in Japan. *Mycoscience* 61: 315–322.
- Smith, S.E., Read, D.J. (2008) *Mycorrhizal symbiosis*, 3rd Edition. Academic Press, London.
- Van den Tweel, J.G., Taylor, C.R. (2010) A brief history of pathology: preface to a forthcoming series that highlights milestones in the evolution of pathology as a discipline. *Virchows Archiv* 457: 3–10.
- Vilgalys R., Hester M. (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238–4246.
- 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*. Academic Press, New York, pp. 315–322.

観察記録 (Observation)

キチャセイヨウショウロ *Tuber iryudaense* のタイプ産地に続く新産地

Second locality of a rare true truffle, *Tuber iryudaense*

折原 貴道^{1*}, 久高 充²Takamichi Orihara^{1*}, Mitsuru Hisataka²

¹ 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-shi, Kanagawa 250-0031, Japan

² 静岡県沼津市
Numazu-shi, Shizuoka, Japan

* 主著者 (Corresponding author)
E-mail: t_orihara@nh.kanagawa-museum.jp

Article Info: Submitted: 5 December 2024 Published: 31 December 2024

キチャセイヨウショウロ *Tuber iryudaense* H. Sasaki, A. Kinosh., M. Nakajima, Orihara & Nara は 2021 年に国内から新種として記載されたトリュフ（セイヨウショウロ属）の一種であるが、分布が極めて局所的で、2000 年代以降、現在までタイプ産地である神奈川県小田原市入生田のシイ・カシ林からのみ報告されている（Kinoshita et al., 2021; 折原, 2023）。近年に新種記載された種についてはレッドリストの評価対象外とされる場合もあるが（例：環境省自然環境局野生生物課希少種保全推進室, 2020）、その希少性から、新種記載直後ではあったものの例外的に神奈川県レッドリストの「注目種」に選定されている（出川・折原, 2022）。本種は、系統的には、チャセイヨウショウロ *T. tomentosum* H. Sasaki, A. Kinosh. & Nara などともに、セイヨウショウロ属内の“Macrosporium Clade”に含まれる（Kinoshita et al., 2021）。形態的には、成熟時、子実体表面に綿毛状、くすんだ黄色～黄褐色の最外皮層が発達する点、子嚢内部に大型の子嚢胞子が 1 個形成される点が特徴的である。

この度、筆者らはタイプ産地に続く 2 箇所目の産地として、静岡県伊豆の国市において本種の発生を確認したので、採集標本の観察記録とともに報告する。

***Tuber iryudaense* H. Sasaki, A. Kinosh., M. Nakajima, Orihara & Nara, Mycologia 113 (3): 657 (2021) [MB#836063]**

和名: キチャセイヨウショウロ

肉眼的特徴: 子嚢果は類球形、直径 5–18 mm、外皮表面は平滑、

赤褐色～淡黄褐色、成熟するにつれ黄土色～黄金色の菌糸が緩く絡み合った綿毛状～マット状の最外皮層が発達する。グレバは外皮から白色の基層板が不規則に貫入・分岐し、子実層ははじめ半透明、淡褐色、子嚢胞子の成熟に伴い暗赤褐色～黒褐色となる。子嚢胞子が大型のため、肉眼やルーペ等で成熟した胞子を視認できる。においは顕著でない。

顕微鏡的特徴: 外皮実質は 150–300 μm 、幅 2.5–8 μm 、厚壁 (>1 μm) の糸状菌糸が密に錯綜した層からなり、表面近くは黄色、内部は黄白色。最外皮菌糸は糸状、非常に緩く絡み合い、頻繁に Y 字状に分岐し、肥厚せず、薄壁、くすんだ黄色～黄褐色、幅 3.5–6 μm 。グレバの基層板は、密に錯綜し部分的に肥厚した薄壁の菌糸からなり、菌糸は幅 3.5–9 μm 。子嚢は類球形～広楕円形、108–145 \times 83–118 μm 、平均 122.8 \times 99.4 μm 、 $Q = 1.0\text{--}1.5$ (n = 15)、1 胞子性、黄白色、壁の厚さ 5.5–16.5 μm 。子嚢胞子は広楕円形、78.5–99.9 \times 53.4–64.9 μm 、平均 88.9 \times 59.7 μm 、 $Q = 1.3\text{--}1.7$ (n = 15; オрнаメント含まず)、初め無色、成熟時は暗赤褐色、表面には粗い網目状のオрнаメントが発達し、オрнаメントの高さは 3.3–8 μm 、網目の数は長径あたり 3–5 個。

観察標本: 静岡県伊豆の国市浮橋、落葉広葉樹林内クヌギ樹下、2023 年 5 月 28 日、久高充採集 (Original No. 2023-76)、KPM-NC 30212, 30213; 同左、2023 年 6 月 17 日、久高充採集 (Original No. 2023-76Re)、KPM-NC 30214; 同左、2023 年 7 月 22 日、久高充・折原貴道採集、KPM-NC 30215; 静岡県伊豆の国市浮橋、コナラ樹下、2023 年 7 月 22 日、折原貴道採集、KPM-NC 30216; 神奈川県小田原市入生田、2022 年 7 月 9 日、佐々木

図 1.

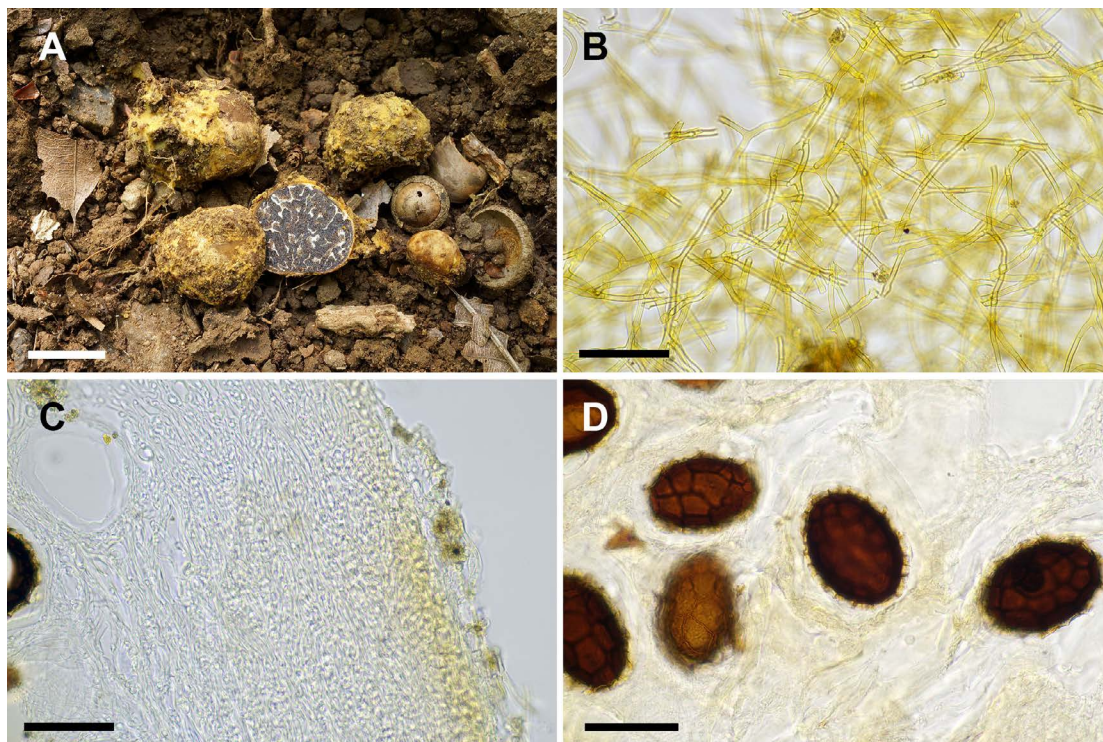


図 1. キチャセイヨウショウロ *Tuber iryudaense* (静岡県伊豆の国市産; KPM-NC 30216). 顕微鏡画像は凍結乾燥標本を 3% KOH 水溶液で前処理した後、ラクトグリセロールで封入し撮影した. A: 子実体. B: 最外皮の菌糸. C: 外皮断面. D: 子囊と子嚢胞子. スケール: A = 1 cm; B-D = 50 μ m.

Fig. 1. *Tuber iryudaense* collected from Izunokuni-shi, Shizuoka Prefecture (KPM-NC 30216). For microscopy, freeze-dried tissues were presoaked with 3% potassium hydrate solution and mounted with lacto-glycerol. A: Ascomata. B: External filamentous hyphae. C: Peridial layer. D: One-spored asci and ascospores. Bars: A = 1 cm; B-D = 50 μ m.

廣海採集, KPM-NC 29448; 同左, 2024 年 7 月 7 日、佐々木廣海採集, KPM-NC 30706.

所見:伊豆の国市浮橋産の供試標本の形態観察の結果、タイプ産地である小田原市入生田産の標本の形態記載 (Kinoshita et al., 2021) と比べ、子実体径や外皮厚さ、外皮を構成する菌糸幅などで相違がみられた。しかし、これらを観察子実体の大きさや成熟度合い、観察方法によるばらつきによる相違と判断すれば、孢子形態をはじめとするその他の形態的特徴は両産地の標本ともほぼ一致した。

併せて、分子同定のために核 rDNA ITS 領域のシーケンシングをおこなった。DNA 抽出は Izumitsu et al. (2012) の手法に基づいて実施し、その後 ITS 領域の PCR をおこなった。プライマーペアには ITS1F (Gardes & Bruns, 1993)・ITS4 (White et al., 1990) を用い、以降の手法は Orihara et al. (2012, 2016) に従った。得られた ITS 配列は GenBank を通して国際ヌクレオチドシーケンスデータベースに登録した。伊豆の国市産の標本 (KPM-NC 30216) から得られた ITS 配列 (GenBank acc. No. PQ803797) と小田原市入生田産の標本 (KPM-NC 25676) の ITS 配列 (GenBank acc. No. LC570847; 折原, 2023) を比較した結果、両者は 100% の相同性を示した (667 bp/667 bp)。以上の結果から、伊豆の国市産の標本は、形態学的にも系統学的にもキチャセイヨウショウロ *T. iryudaense* であると結論付けられた。なお、タイプ

産地の小田原市入生田でも新種記載以後、複数地点で断続的に発生が確認され続けており (折原, 2023)、本研究でも新たにタイプ産地で採集された標本を一部供試した。

本種のタイプ産地の発生環境は、スダジイやウラジロガシなどが優占する照葉樹林である (Kinoshita et al., 2021; 折原, 2023)。一方、今回新たに本種の発生が確認された伊豆の国市の産地の環境はクヌギ、コナラが優占する落葉広葉樹林であった。このことから、本種はシイ・カシ類だけでなく落葉性のナラ類とも広く菌根共生する菌であることが推察される。関東地方南部から伊豆半島にかけては、国内でも多くの地下生菌研究者および愛好家により集中的かつ継続的に地下生菌の探索がなされている地域の一つであるが、前述のように *T. iryudaense* の発生が確認されたのはこれで 2 箇所目であり、本種は稀産種と判断してよいと思われる。しかし、本報告で明らかになったように、本種はブナ科の多様な樹木と菌根を形成すると考えられることから、実際にはより広域に分布していることも考えられる。今後、より広域にわたりトリュフ類の探索が行われることで、本種の分布の実態が明らかになることが期待される。

謝辞

本研究は独立行政法人日本学術振興会 科研費 (研究課題番号: 22K06381) の助成を受けて行われた。

引用文献

- 出川洋介・折原貴道 (2022) 菌類. 神奈川県環境農政局緑政部自然環境保全課・神奈川県立生命の星・地球博物館 (編) 神奈川県レッドデータブック 2022 植物編, pp. 380–425, 神奈川県, 横浜.
- 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.
- 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.
- 環境省自然環境局野生生物課希少種保全推進室 (2020) 参考資料 3 評価対象種の基本的条件. Available from <https://www.env.go.jp/content/900515315.pdf> (downloaded on 27 Dec. 2024).
- Kinoshita A., Sasaki H., Orihara T., Nakajima M., Nara K. (2021) *Tuber iryudaense* and *T. tomentosum*: Two new truffles encased in tomentose mycelium from Japan. *Mycologia* 113: 653–663.
- 折原貴道 (2023) キチャセイヨウシヨウロ. 折原貴道 (監修) 生命の星・地球博物館 入生田菌類誌調査グループ (編) 新・入生田菌類誌. 生命の星・地球博物館 入生田菌類誌調査グループ, 神奈川, pp. 34–35.
- 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.
- Orihara T., Lebel T., Ge Z.W., Smith M.E., Maekawa N. (2016) Evolutionary history of the sequestrate genus *Rossbeevera* (Boletaceae) reveals a new genus *Turmalinea* and highlights the utility of ITS minisatellite-like insertions for molecular identification. *Persoonia* 37: 173–198.
- 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.

標本リスト (Specimen list)

2023 年に香川県内で採集された地下生菌

Truffles and truffle-like fungi collected in 2023 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

^{*} Corresponding author (主著者)

E-mail: sakurabaharuhiko@gmail.com

Article Info: Submitted: 13 January 2024 Published: 31 December 2024

2023 年に香川県内で採集された地下生菌のうち、著者らが採集した標本を報告する (表 1、図 1–8)。標本はいずれも栃木県立博物館 (TPM) 収蔵庫に収蔵されている。

謝辞

本報告を作成するにあたり、折原貴道様、山本航平様、平尾知也様、嶋田友久様には、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、次の皆様に大変お世話になりました。ここに深謝いたします: 平尾知也様、中村香代子様、嶋田友久様、林 鈴以様。

表 1. 2023 年に香川県で採集された地下生菌

Table 1. Specimens of truffles and truffle-like fungi collected in 2023 in Kagawa Prefecture

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	パOUCHャー 標本番号	標本の 状態	備考
<i>Octaviania</i> subg. <i>Parcaea</i> sp.	ホシミノタマタケ属バルカイ亜属の一種	三豊市財田町	広葉樹林, ネズミモチ樹下, 地中	2023年1月7日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-01	TPM-M-10276	凍結乾燥	
<i>Gautieria</i> sp.	カウチエリア属の一種	三豊市財田町	広葉樹林, アラカシ樹下, 腐植中	2023年1月8日	平尾知也	平尾知也	KG2023-02	TPM-M-10277	凍結乾燥 図 1	
<i>Zelleromyces</i> (= <i>Lactarius</i>) sp.	チチシヨウロ	木田郡三木町	広葉樹林, アラカシ樹下, 地表に露出	2023年1月21日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-03	TPM-M-10278	凍結乾燥	
<i>Stephanospora</i> sp.	ステファニアスポラ属の一種	高松市中間町	広葉樹林, ウバメガシ・アラカシ樹下, 腐植中	2023年2月4日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-04	TPM-M-10279	凍結乾燥 図 2	
<i>Elaphomyces muricatus</i>	アミメツチダング	高松市中間町	広葉樹林, アラカシ樹下, 地中	2023年2月12日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-05	TPM-M-10280	凍結乾燥	タンポタケ寄生
<i>Octaviania</i> subg. <i>Parcaea</i> sp.	ホシミノタマタケ属バルカイ亜属の一種	仲多度郡まんのう町	広葉樹林, アラカシ樹下, 地中	2023年2月25日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2023-06	TPM-M-10281	凍結乾燥	
<i>Lactarius spinosporus</i>	スイチチシヨウロ	仲多度郡まんのう町	広葉樹林, マテバシイ樹下, 地中	2023年2月25日	櫻庭三恵	大前宗之	KG2023-07	TPM-M-10282	凍結乾燥 図 3	
<i>Elaphomyces muricatus</i>	アミメツチダング	綾歌郡5渡川町	広葉樹林, アラカシ樹下, 地表に露出	2023年2月26日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2023-08	TPM-M-10283	凍結乾燥	
<i>Zelleromyces</i> (= <i>Lactarius</i>) sp.	チチシヨウロ	三豊市財田町	広葉樹林, アラカシ樹下, 地表に露出	2023年3月4日	林 鈴以	櫻庭春彦	KG2023-09	TPM-M-10284	凍結乾燥	
<i>Elaphomyces muricatus</i>	アミメツチダング	三豊市財田町	広葉樹林, アラカシ樹下, 腐植中	2023年3月11日	嶋田友久	嶋田友久	KG2023-10	TPM-M-10285	凍結乾燥	
<i>Hymenogaster</i> sp.	ヒメノガステル属の一種	仲多度郡まんのう町	アベマキ樹下, 腐植中	2023年3月21日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-11	TPM-M-10286	凍結乾燥	
<i>Stephanospora</i> sp.	ステファニアスポラ属の一種	三豊市財田町	広葉樹林, アラカシ樹下, 腐植中	2023年4月1日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-12	TPM-M-10287	凍結乾燥	
<i>Hydnonyia</i> sp.	クルミタケ属の一種	仲多度郡琴平町	ノメイヨシノ樹下, 法面に露出	2023年5月13日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2023-13	TPM-M-10288	凍結乾燥	
<i>Elaphomyces</i> aff. <i>mutabilis</i>	ツツレンシロツチダング類似種	三豊市財田町	ツブラシイ樹下, 地中	2023年5月21日	嶋田友久	嶋田友久	KG2023-14	TPM-M-10289	凍結乾燥	
<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	2023年6月18日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-15	TPM-M-10290	凍結乾燥	
<i>Alpova</i> sp.	アルボバ属の一種	仲多度郡まんのう町	ヒノキ樹林, アラカシ樹下, 法面に露出	2023年6月24日	櫻庭三恵	平尾知也	KG2023-16	TPM-M-10291	凍結乾燥 図 4	
<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	2023年7月1日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-17	TPM-M-10292	凍結乾燥	
<i>Rossobeevera eucyanea</i>	アオノメクワツブタケ	綾歌郡5渡川町	溪流脇, ヒサカキ樹下, 腐植中	2023年7月22日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-18	TPM-M-10293	凍結乾燥	
<i>Aroramyces</i> sp.	アロラマイセス属の一種	綾歌郡5渡川町	アラカシ樹下, 腐植中	2023年7月22日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-19	TPM-M-10294	凍結乾燥	
<i>Rossobeevera griseovelutina</i>	ネズミツチダングタケ	綾歌郡5渡川町	アラカシ樹下, 腐植中	2023年7月22日	櫻庭春彦	折原貴道	KG2023-20	TPM-M-10295	凍結乾燥 図 5	
<i>Rossobeevera griseovelutina</i>	ネズミツチダングタケ	仲多度郡まんのう町	アカシデ・アカマツ樹下, 腐植中	2023年8月6日	嶋田友久・ 中村香代子	櫻庭春彦	KG2023-21	TPM-M-10296	凍結乾燥	
<i>Zelleromyces</i> (= <i>Lactarius</i>) sp.	チチシヨウロ	三豊市財田町	ヤブツバキ樹下, 地表に露出	2023年9月3日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-22	TPM-M-10297	凍結乾燥	
学名なし	コカネシヨウロタケ	高松市栗林町	アカマツ・アラカシ樹下, 法面に露出	2023年9月10日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2023-23	TPM-M-10298	凍結乾燥 図 6	
<i>Stephanospora</i> sp.	ステファニアスポラ属の一種	三豊市財田町	ヒサカキ・コナラ樹下, 地表に露出	2023年9月24日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-24	TPM-M-10299	凍結乾燥	
<i>Elaphomyces</i> aff. <i>mutabilis</i>	ツツレンシロツチダング類似種	仲多度郡まんのう町	広葉樹林, アラカシ樹下, 腐植中	2023年10月15日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-25	TPM-M-10300	凍結乾燥	ミヤマタンポタケ類似 種寄生

表 1. (続き)
Table 1. (continued)

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>Zelleromyces (=Lactarius) sp.</i>	チチシヨウロ	仲多度郡まんのう町	広葉樹林、アラカシ樹下、腐植中	2023年10月15日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2023-26	TPM-M-10301	凍結乾燥	
<i>Zelleromyces (=Lactarius) sp.</i>	チチシヨウロ	仲多度郡まんのう町	アカマツ・コナラ樹下、地中	2023年10月29日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-27	TPM-M-10302	凍結乾燥	
<i>Elaphomyces aff. mutabilis</i>	ツツレンソツチダンゴ類似種	東かがわ市川股	アラカシ樹下、地表に露出	2023年11月4日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-28	TPM-M-10303	凍結乾燥	
<i>Hydnocystis japonica</i>	ウツロイモタケ	東かがわ市川股	アラカシ・ヒサカキ樹下、地表に露出	2023年11月4日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-29	TPM-M-10304	凍結乾燥	
<i>Lactarius spinosporus</i>	スイチチシヨウロ	東かがわ市川股	アラカシ樹下、腐植中	2023年11月4日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2023-30	TPM-M-10305	凍結乾燥	
<i>Gautieria sp.</i>	ガウチエウリア属の一種	仲多度郡まんのう町	コナラ林近傍、腐植中	2023年11月11日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2023-31	TPM-M-10306	凍結乾燥	
<i>Hymenogaster sp.</i>	ヒメノガステル属の一種	仲多度郡まんのう町	コナラ林近傍、地中	2023年11月11日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-32	TPM-M-10307	凍結乾燥	
<i>Aroramycetes sp.</i>	アロラマイセス属の一種	仲多度郡まんのう町	コナラ林近傍、地中	2023年11月11日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-33	TPM-M-10308	凍結乾燥	
<i>Hysterangium sp.</i>	ヒステランギウム属の一種	東かがわ市川股	アラカシ樹下、腐植中	2023年11月19日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-34	TPM-M-10309	凍結乾燥	
<i>Octaviania subg. Parcaea sp.</i>	ホシミノタマタケ属ハルカイ亜属の一種	東かがわ市川股	アラカシ樹下、地表に露出	2023年11月19日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2023-35	TPM-M-10310	凍結乾燥	
<i>Octaviania subg. Parcaea sp.</i>	ホシミノタマタケ属ハルカイ亜属の一種	観音寺市大野原町	アラカシ樹下、腐植中	2023年11月23日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-36	TPM-M-10311	凍結乾燥	
<i>Hellogaster columelififer</i>	ジャガイモタケ	綾歌郡綾川町	アラカシ・コナラ樹下、地中	2023年11月25日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-37	TPM-M-10312	凍結乾燥	
<i>Octaviania subg. Parcaea sp.</i>	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	リョウブ・ヒサカキ樹下、腐植中	2023年11月26日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-38	TPM-M-10313	凍結乾燥	
<i>Octaviania subg. Parcaea sp.</i>	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	ヤブツバキ・ヒサカキ樹下、腐植中	2023年11月26日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2023-39	TPM-M-10314	凍結乾燥	
<i>Aroramycetes sp.</i>	アロラマイセス属の一種	綾歌郡綾川町	アラカシ樹下、腐植中	2023年12月2日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2023-40	TPM-M-10315	凍結乾燥 図 7	
<i>Turnaminea persicina</i>	ウスベニタマタケ	綾歌郡綾川町	アラカシ・コナラ樹下、腐植中	2023年12月2日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2023-41	TPM-M-10316	凍結乾燥	ミヤマタンボタケ類似種寄生
<i>Elaphomyces aff. mutabilis</i>	ツツレンソツチダンゴ類似種	綾歌郡綾川町	アラカシ・コナラ樹下、腐植中	2023年12月2日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2023-42	TPM-M-10317	凍結乾燥	
<i>Elaphomyces muricatus</i>	アミメツチダンゴ	綾歌郡綾川町	アラカシ・コナラ樹下、腐植中	2023年12月2日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-43	TPM-M-10318	凍結乾燥	ハナヤスリタケ寄生
<i>Hellogaster columelififer</i>	ジャガイモタケ	高松市塩江町	モミ樹下、腐植中	2023年12月2日	櫻庭三恵	櫻庭春彦	KG2023-44	TPM-M-10319	凍結乾燥	
<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	2023年12月9日	櫻庭春彦	櫻庭春彦	KG2023-45	TPM-M-10320	凍結乾燥 図 8	



図 1. ガウチエリア属の一種 *Gautieria* sp. (TPM-M-10277).
スケール: 1 cm.



図 5. ネズミツチダマタケ *Rossbeevera griseovelutina* (TPM-M-10295). スケール: 1 cm.



図 2. ステファノスポラ属の一種 *Stephanospora* sp. (TPM-M-10279). スケール: 1 cm.

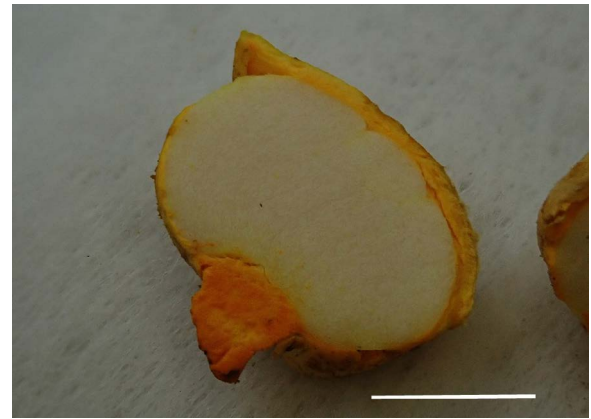


図 6. コガネショウロタケ (TPM-M-10298). スケール: 1 cm.



図 3. スイチシショウロ *Lactarius spinosporus* (TPM-M-10282).
スケール: 1 cm.



図 7. アロラマイセス属の一種 *Aroramycetes* sp. (TPM-M-10315).
スケール: 1 cm.



図 4. アルポバ属の一種 *Alpova* sp. (TPM-M-10291).
スケール: 1 cm.



図 8. ホンセイヨウショウロ *Tuber japonicum* (TPM-M-10320).
スケール: 1 cm.

標本リスト (Specimen list)

日本地下生菌研究会第5回および第6回地下生菌観察会で 採集された地下生菌

Truffle-like fungi collected in the 5th and 6th JATS Foray

折原 貴道^{1*}, 佐々木 廣海²

Takamichi Orihara^{1*}, Hiromi Sasaki²

¹ 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-shi, Kanagawa 250-0031, Japan

² 神奈川県藤沢市
Fujisawa-shi, Kanagawa, Japan

* 主著者 (Corresponding author)
E-mail: t_orihara@nh.kanagawa-museum.jp

Article Info: Submitted: 4 December 2024 Published: 31 December 2024

静岡県駿東郡小山町および神奈川県南足柄市にて2022年10月22日に開催された第5回地下生菌観察会、ならびに高知県香美市および安芸郡芸西村にて2023年10月21–23日に開催された第6回地下生菌観察会において採集された地下生菌を報告する(表1、2、図1–6)。標本はいずれも神奈川県立生命の星・地球博物館収蔵庫(KPM)に収蔵されている。

謝辞

本観察会を行うにあたって、観察地の採集許可や案内等に多大なるご協力を頂いた小山町役場の伊藤様、高知県森林技術センターの藤本浩平様および和食敦子様、芸西村役場の池田様にお礼申し上げます。

表 1. 第 5 回地下生菌観察会 (2022 年 10 月 22 日) で採集された地下生菌

Table 1. Truffle-like fungi collected in the 5th JATS Foray held in Oyama-cho, Shizuoka Pref. and Minamiashigara-shi, Kanagawa Pref.

学名	和名	採集地	発生環境 (植生)	採集日	採集者	同定者	バウチャー標本番号	標本の状態	備考
<i>Russula</i> sp. (sequestrate)	ミヤマコイシタケ	静岡県駿東郡小山町 足柄峠城址公園	アカガシ樹下	2022 年 10 月 22 日	折原貴道	折原貴道	KPM-NC 29611	凍結乾燥標本	図 1
<i>Russula</i> sp. (sequestrate)	ミヤマコイシタケ	静岡県駿東郡小山町 足柄峠城址公園		2022 年 10 月 22 日	井上潔・生駒和代	折原貴道	KPM-NC 29612	温風乾燥標本	
<i>Russula</i> sp. (sequestrate)	ミヤマコイシタケ	静岡県駿東郡小山町 足柄峠城址公園		2022 年 10 月 22 日	折原貴道・嶋崎拓	折原貴道	KPM-NC 29613	温風乾燥標本	
<i>Rhizopogon roseolus</i> (Corda) Th. Fr.	シヨウロ	静岡県駿東郡小山町 足柄峠城址公園	アカマツ樹下	2022 年 10 月 22 日	松本安旦	阿部寛史	KPM-NC 29614	凍結乾燥標本	図 2
<i>Heliogaster columellifer</i> (Kobayasi) Orihara & Iwase	ジャガイモタケ	静岡県駿東郡小山町 足柄峠城址公園		2022 年 10 月 22 日	生駒和代	折原貴道	KPM-NC 29615	凍結乾燥標本	
<i>Heliogaster columellifer</i> (Kobayasi) Orihara & Iwase	ジャガイモタケ	神奈川県南足柄市	アカマツ樹下	2022 年 10 月 22 日	井上潔	折原貴道	KPM-NC 29616	凍結乾燥標本	
<i>Hymenogaster tener</i> Berk. & Broome s. l.	シロツブタケ (広義)	神奈川県南足柄市	アカマツ樹下	2022 年 10 月 22 日	折原貴道	折原貴道	KPM-NC 29617	凍結乾燥標本	図 3

表 2. 第 6 回地下生菌観察会 (2023 年 10 月 21-23 日) で採集された地下生菌

Table 2. Truffle-like fungi collected in the 6th JATS Foray held in Kami-shi and Geisei-mura, Kochi Pref.

学名	和名	採集地	発生環境 (植生)	採集日	採集者	同定者	バウチャー標本番号	標本の状態	備考
<i>Protuberia nipponica</i> Kobayasi	シラタマタケ	高知県香美市 県立森林技術センター	コジイ樹下	2023 年 10 月 21 日	佐々木廣海	折原貴道	KPM-NC 30337	凍結乾燥標本	トリコデルマ属菌 <i>Trichoderma</i> sp. が寄生
<i>Elaphomyces mutabilis</i> species complex	ツツレシロツツチダンゴ複合種群の一種	高知県香美市 県立森林技術センター	コジイ樹下	2023 年 10 月 21 日	折原貴道	折原貴道	KPM-NC 30338	凍結乾燥標本	
<i>Elaphomyces mutabilis</i> species complex	ツツレシロツツチダンゴ複合種群の一種	高知県香美市 県立森林技術センター	コジイ樹下	2023 年 10 月 21 日	佐々木廣海	折原貴道	KPM-NC 30339	凍結乾燥標本	図 4. 地上生であるが、ツチダンゴ属 <i>Elaphomyces</i> と強い類縁関係があることから、例外的にリストに含めた
<i>Pseudotulostoma japonicum</i> (Otami) I. Asai, H. Sato & Nara	コウボウアデ	高知県香美市 県立森林技術センター	コジイ樹下	2023 年 10 月 21 日	阿部寛史・折原貴道	折原貴道	KPM-NC 30340	凍結乾燥標本	
<i>Elaphomyces mutabilis</i> species complex	ツツレシロツツチダンゴ複合種群の一種	高知県香美市 県立市喜々峰森林公園		2023 年 10 月 22 日	平尾知也	折原貴道	KPM-NC 30342	凍結乾燥標本	
<i>Elaphomyces mutabilis</i> species complex	ツツレシロツツチダンゴ複合種群の一種	高知県香美市 県立市喜々峰森林公園	コジイ・コナラ・アカマツ樹下	2023 年 10 月 22 日	阿部寛史	折原貴道	KPM-NC 30343	凍結乾燥標本	
<i>Elaphomyces mutabilis</i> species complex	ツツレシロツツチダンゴ複合種群の一種	高知県香美市 県立市喜々峰森林公園	コジイ樹下	2023 年 10 月 22 日	折原貴道	折原貴道	KPM-NC 30344	凍結乾燥標本	図 5
<i>Hydnocystis japonica</i> (Kobayasi) Trappe	ウツロイモタケ	高知県香美市 県立市喜々峰森林公園		2023 年 10 月 22 日	櫻庭三恵	折原貴道	KPM-NC 30345	凍結乾燥標本	
<i>Stephanospora</i> sp.	ステファアノスポラ属の一種	高知県香美市 県立市喜々峰森林公園		2023 年 10 月 22 日	櫻庭春彦	折原貴道	KPM-NC 30346	凍結乾燥標本	黄色土色子実体
<i>Tuber</i> sp. (puberulum group)	セイヨウシヨウロ属の一種	高知県香美市 県立市喜々峰森林公園	アカマツ樹下	2023 年 10 月 22 日	折原貴道	折原貴道	KPM-NC 30347	凍結乾燥標本	
<i>Entoloma</i> sp. (sequestrate) (シクエストラート菌)	イソボンシマジ属の一種	高知県香美市 県立市喜々峰森林公園	アカマツ樹下	2023 年 10 月 22 日	櫻庭三恵・平尾知也・折原貴道	折原貴道	KPM-NC 30348	凍結乾燥標本	図 6
<i>Elaphomyces</i> sect. <i>Ceratogaster</i> sp.	ツチダンゴ属の一種	高知県安芸郡芸西村	アラカシ樹下	2023 年 10 月 23 日	平尾知也	折原貴道	KPM-NC 30358	凍結乾燥標本	黒色小型子実体



図 1. ミヤマコイシタケ *Russula* sp. (sequestrate) (KPM-NC 29611).
Bar : 1 cm.



図 4. コウボウフデ *Pseudotulostoma japonicum* (KPM-NC 30340).
Bar : 2 cm.

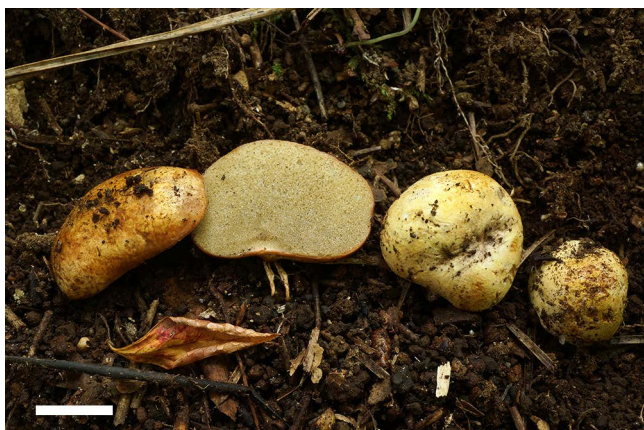


図 2. ショウロ *Rhizopogon roseolus* (KPM-NC 29614). Bar : 1 cm.



図 5. ツツレシロツチダング複合種群の一種 *Elaphomyces mutabilis* species complex (KPM-NC 30344). Bar : 2 cm.



図 3. シロツブタケ (広義) *Hymenogaster tener* s. l. (KPM-NC 29617). Bar : 1 cm.



図 6. イツボンシメジ属の一種 *Entoloma* sp. (sequestrate) (KPM-NC 30348). Bar : 1 cm.

その他普及記事 (Other articles)

論文紹介：生息地の分断化は絶滅危惧外生菌根菌集団の遺伝子流動を強く制限する—トガサワラ特異的地下生菌トガサワラショウロの分布域全体での調査から—

Introduction to "Habitat fragmentation strongly restricts gene flow in endangered ectomycorrhizal fungal populations: Evidence from *Rhizopogon togasawarius*, specific to *Pseudotsuga japonica*, across the entire distribution range"

阿部 寛史

Hiroshi Abe

東京大学大学院新領域創成科学研究科, 〒 277-8563 千葉県柏市柏の葉 5-1-5

Evaluation of Natural Environment Laboratory, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa-shi, Chiba 277-8563, Japan

E-mail: h_abe@s.nenv.k.u-tokyo.ac.jp

Article Info: Submitted: 18 November 2024 Published: 31 December 2024

生息地の分断化は遺伝子流動を減少させ、遺伝的浮動や近親交配を通じて遺伝的多様性の喪失を引き起こす (Frankham et al., 2010)。しかし、森林生態系で重要な役割を担う外生菌根菌 (以下、菌根菌) において、生息地の分断化が遺伝的多様性に与える影響は全く研究されていなかった。本研究では、絶滅危惧樹木トガサワラと特異的に共生する地下生菌トガサワラショウロ *Rhizopogon togasawarius* Mujic, K. Hosaka & Spatafora (ショウロ科ショウロ属) の集団遺伝構造とデモグラフィ (集団分化の歴史) を調査した。その結果、分断化によって集団間の遺伝子流動が強く制限され、トガサワラショウロの遺伝的多様性が低下していることが明らかになった (Abe et al., 2024)。本普及記事では、その概略を紹介する。

生息地の分断化は生物多様性への主要な脅威の一つであり、遺伝子流動の制限による遺伝的分化や遺伝的多様性の減少を引き起こす (Fahrig, 2003)。特に近親交配により有害な劣性遺伝子のホモ接合が進むことで引き起こされる近交弱勢は、個体の適応度を低下させ、絶滅リスクを高める (Charlesworth & Willis, 2009)。こうした生息地の分断化の影響は多くの動植物で研究されてきたが、絶滅が危惧される微生物では全く研究がされていない。

菌類の保全が遅れている理由の一つに、保全状況評価のための詳細な分布データの不足が挙げられる。実際、IUCN レッ

ドリストの絶滅危惧カテゴリーでは、植物が 24,919 種、動物が 16,900 種リストされているのに対し、菌類はわずか 226 種に過ぎない (IUCN, 2023)。しかし、多くの菌類が陸上生態系で重要な役割を果たしているため、菌類種の保全を軽視することはできない。特に、外生菌根菌は温帯から亜寒帯地域の森林生態系において重要であり、樹木の栄養吸収に不可欠である (Smith & Read, 2008)。通常、1 種類の樹木に多くの菌根菌が共生するが、攪乱後の実生定着では特定の菌根菌に依存することが知られる (Glassman et al., 2016; Peay et al., 2009)。これらの菌の絶滅は、宿主樹木の定着や森林再生に深刻な影響を及ぼす可能性がある。トガサワラショウロ (図 1) は、日本固有の絶滅危惧



図 1. 筆者が採集したトガサワラショウロ *Rhizopogon togasawarius* (三重県大又産)。

針葉樹トガサワラに特異的に共生する菌根菌である (Mujic et al., 2014)。この共生関係は、宿主と菌根菌の祖先が北米から移住して以来、3000 万年以上にわたって続いている (Mujic et al., 2019)。20 世紀半ば以降、日本の自然林は経済成長とともに急増した木材需要を満たすため、広範囲にわたりスギやヒノキの人工林に転換された。その結果、トガサワラの分布は以前の記録から大幅に減少し、残存している木は特定の保護地域に約 2000 本のみとなっている (IUCN, 2023; Tamaki et al., 2018)。トガサワラショウロは自然条件下ではトガサワラとしか共生しないため、その分布域は宿主樹木の分布域に限定される (Okada et al., 2022)。よって、トガサワラショウロの著しく分断化された生息地と明確に定義された分布域を利用すれば、分布域全体にわたる集団の遺伝的構造を調査することが可能である。また、トガサワラでは分断化により残存した林間の遺伝子流動が著しく制限され、潜在的な近交弱勢が原因で発芽率が低下していることが報告されている (Tamaki et al., 2018)。ショウロ属の胞子は菌食性動物によって散布されるが、これらの動物は移動範囲が小さく、地理的障壁の影響を強く受ける (Grubisha et al., 2007)。したがって、トガサワラショウロへの脅威はさらに大きくなると予想される。

そこで、絶滅危惧菌類に対する保全遺伝学研究として、トガサワラショウロ集団を対象に、①トガサワラ林の分断化が遺伝子流動を制限しているか、②トガサワラショウロ集団内で低い遺伝的多様性と高い近親交配が見られるか、③集団の遺伝的分化が宿主集団と一致しているか、の 3 つの仮説を検証した。

紀伊半島の 3 集団 (川又観音 : KW、三ノ公 : SN、大又 : OM) と四国の 2 集団 (安田川 : YS、西ノ川 : NK) を対象に調査を行った (図 2)。これまで菌根菌の集団遺伝学研究では主に子実体が使用されてきた。しかし、トガサワラショウロの子実体の発見例は 2 例しかないため現実的ではない (Mujic et al., 2014; 折原, 2019)。そこで、トガサワラと同属のダグラスファー実生を現地土壌で育成し、根に菌根を合成させる方法 (Murata et al., 2017) を使用した。5 つの集団からトガサワラショウロが感染した菌根を 391 根端収集し、20 遺伝子座の SSR マーカーで遺伝子型を決定して、固有の遺伝子型を持つ 236 個体で集団遺伝解析を行った。

その結果、集団全体で強い遺伝的分化 ($F_{ST} = 0.255$) が見られ、8 km しか離れていない集団間でも有意な遺伝的分化 ($F_{ST} = 0.075$) が確認された (表 1)。STRUCTURE 解析では、トガサワラショウロ集団が 5 つのクラスターに分かれ、ほとんどの個体が各調査地固有の遺伝的組成を示した (図 2)。以上の結果は、トガサワラショウロ集団間の遺伝子流動が著しく制限されていることを示す。トガサワラショウロの生息地は山岳地帯の急峻な尾根によって分断されているため、胞子分散を担う菌食性動物がこれらの地理的障壁を越えられず、遺伝子流動が制限されたとみられる。北米では、小さな海峡 (約 5 km) や島内の乾燥した

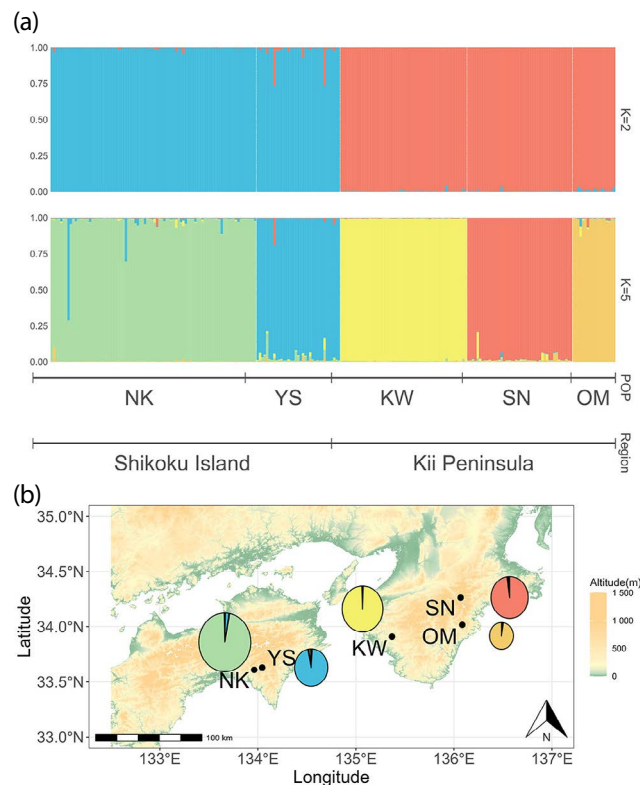


図 2. トガサワラショウロの集団遺伝構造 (Abe et al. (2024) から許諾を得て転載). STRUCTURE bar plot (a) とその地理的分布 (b) を示す. 円グラフのサイズはサンプル数, 色は対立遺伝子組成に基づく遺伝的に異なるクラスターを表す. KW: 川又観音, NK: 西ノ川, OM: 大又, SN: 三ノ公, YS: 安田川.

表 1. トガサワラショウロ集団の F_{ST} (Abe et al., 2024 より引用)

Population	KW	SN	OM	YS	NK
KW	–				
SN	0.152*	–			
OM	0.191*	0.163*	–		
YS	0.188*	0.200*	0.176*	–	
NK	0.177*	0.198*	0.171*	0.075*	–

*: 有意な F_{ST} 値 ($P < 0.05$). Population の表記は本文参照.

谷に隔てられたショウロ属の集団間で、強い遺伝的分化 ($F_{ST} = 0.054-0.258$) が報告されている (Grubisha et al., 2007)。一方、風で胞子を分散するヌメリグチ属では、数百 km 離れていても遺伝的分化は最小限 ($F_{ST} = 0.00-0.15$) にとどまる (Rivera et al., 2014)。これらの結果は、生息地の分断化が遺伝子流動に与える影響は、地下生菌の方が大きいことを示している。

DIYABC-RF (Collin et al., 2021) によるデモグラフィック解析では、遺伝子流動の制限が、紀伊半島と四国の間では約 6000 世代前、四国内の最も近い集団間では約 1500 世代前から続いていることが示された。花粉化石記録から、最終氷期に四国と紀伊半島の低地に広く分布していたトガサワラが、後氷期には山岳地帯へ縮小したことが知られている (Ooi, 2016)。このため、トガサワラショウロの直近の集団分岐は、最終氷期極大期の終盤 (約 19,000 年前) に対応する可能性がある。この場合、紀伊半島と四国の集団分岐は、両者が陸続きだった約 76,000 年

表 2. トガサワラショウロの集団遺伝指標 (\pm Standard error) (Abe et al., 2024 より引用)

Population	A_e	H_o	H_E	A_r	F_{IS}
KW	1.74 (\pm 0.13)	0.324 (\pm 0.043)	0.364 (\pm 0.046)	2.94 (\pm 0.29)	0.120 (\pm 0.045)*
SN	2.31 (\pm 0.27)	0.395 (\pm 0.062)	0.437 (\pm 0.063)	3.99 (\pm 0.49)	0.106 (\pm 0.041)*
OM	2.21 (\pm 0.19)	0.428 (\pm 0.057)	0.460 (\pm 0.056)	3.10 (\pm 0.26)	0.098 (\pm 0.057)
YS	2.37 (\pm 0.19)	0.476 (\pm 0.041)	0.524 (\pm 0.041)	3.76 (\pm 0.28)	0.106 (\pm 0.034)*
NK	2.52 (\pm 0.31)	0.444 (\pm 0.061)	0.464 (\pm 0.065)	4.00 (\pm 0.50)	0.049 (\pm 0.018)*
Total	2.17 (\pm 0.10)	0.400 (\pm 0.024)	0.438 (\pm 0.024)	5.27 (\pm 0.55)	-

A_e : 有効対立遺伝子数. A_r : アレリックリッチネス. F_{IS} : 近交係数. H_o : ヘテロ接合度の観察値. H_E : ヘテロ接合性の期待値. *: 有意な F_{IS} 値 ($P < 0.05$). Population の表記は本文参照.

前に生じたと考えられる。よって、生息地の分断化は人為起源ではなく過去の気候変動や関連する生物地理イベントで引き起こされたと考えられる。

トガサワラショウロの遺伝的多様性は、他のショウロ属 (例: ショウロ, $H_o = 0.438-0.612$, $H_E = 0.611-0.696$; 阿部ら (2018)) や宿主であるトガサワラ ($H_o = 0.500-0.683$, $H_E = 0.559-0.628$; Abe et al. (2024)) よりも低下していた (表 2)。また DIYABC-RF 解析で長期間の集団隔離が予測された紀伊半島の 3 集団では、四国の 2 集団より遺伝的多様性が低かった (表 2)。これらの結果は、集団隔離が絶滅危惧菌類の遺伝的多様性の減少を引き起こすことを示している。また、トガサワラショウロ集団の有効集団サイズは、絶滅が懸念されるレベル ($N_e = 9.0-58.0$) まで低下していた。有効集団サイズは遺伝的多様性の損失を調整した集団サイズで、保全遺伝学で重要なパラメータである (Frankham et al., 2010)。一般的に、 $N_e > 50$ (1 世代あたりの 1% の近親交配を許容) が短期的絶滅の回避に必要とされるが (Franklin, 1980)、トガサワラショウロでは 5 集団中 4 集団で、この値を下回っていた。近交係数 ($F_{IS} = 0.049-0.120$) も高く、4 集団で有意であったため、近交弱勢が懸念される (表 2)。実際、トガサワラショウロは残存するトガサワラ林ではほぼ共生しておらず (Murata et al., 2013)、子実体も稀である (Mujic et al., 2014; 折原, 2019)。これは、北米でダグラスファーに普遍的に共生し、多くの子実体を形成する *R. vinicolor* や *R. vesiculosus* とは対照的である (Molina et al., 1999)。

トガサワラショウロとトガサワラの集団遺伝構造 (SSR マーカー 6 遺伝子座で解析) を比較したところ、両者の F_{ST} 値に有意な相関があり集団分化の系統樹も同じ樹形を示した (図 3)。これにより、両者が共通の遺伝的分化の過程をたどってきたことが示唆された。一方で、遺伝的分化はトガサワラショウロでかなり進行していた。この理由の 1 つに、遺伝子流動メカニズムの違いがあると考えられる。トガサワラを含む針葉樹は、花粉を大量に放出し、長距離にわたる遺伝子流動を行う。たとえば、*Pinus sylvestris* の花粉の約 4.3% は 30 km 以上移動する (Robledo-Armuncio & Gil, 2005)。実際、地理的障壁により遺伝子流動が制限されているトガサワラショウロとは対照的に、トガサワラでは各地域の最も近い集団間で遺伝的分化は有意でなかった (Abe et al., 2024)。

以上より、トガサワラショウロの絶滅リスクが宿主生息地の分断

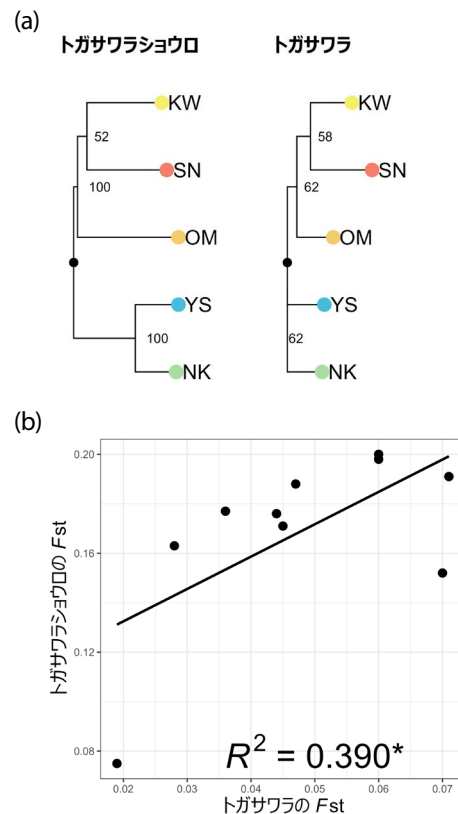


図 3. トガサワラショウロおよびトガサワラ集団の近隣結合法 (Neighbor-Joining method) 系統樹 (a) と F_{ST} の比較 (b) (Abe et al., 2024 より許諾を得て転載). 系統樹中の数字はブートストラップ値を示す. *: $P < 0.05$. KW: 川又観音, NK: 西ノ川, OM: 大又, SN: 三ノ公, YS: 安田川.

化によって高まることが示された。本研究は、森林生態系で重要な役割を果たしながら、これまで見過ごされてきた菌類を含む微生物の保全の必要性を強調するものである。さらに、Abe et al. (2024) では、保全に向けた具体的な施策 (保全単位の設置、生息域内および域外保全、遺伝的救助など) を提案している。詳細は、当該文献を参照されたい。菌類は、菌根菌を代表として他の生物との相互作用を通じて生態系を支える重要な存在である。そのため、菌類の絶滅が他の生物群に波及することは明白であり、保全の必要性は極めて高い。一方で、菌類における絶滅リスクの評価や遺伝的情報の活用は、現状ではほとんど進んでいない。特に本稿が示すように、地下生菌は地上に子実体を形成する菌類と比較して絶滅リスクが高く、その評価が急務である。本研究をきっかけに、地下生菌を含む菌類の保全への

認識が広がり、より多くの方々とともに菌類保全研究を進められることを願う。

謝辞

本研究は、Abe et al. (2024) Habitat fragmentation strongly restricts gene flow in endangered ectomycorrhizal fungal populations: Evidence from *Rhizopogon togasawarius*, specific to *Pseudotsuga japonica*, across the entire distribution range. *Molecular Ecology* 33: e17533. として発表された。本稿の執筆にあたり、共著者であり研究デザイン設計および論文執筆にご指導を賜りました奈良一秀教授に深く感謝申し上げます。また、共著者で SSR マーカーの開発を担当した Gan Lu 氏、研究デザイン設計にご協力いただいた村田政穂博士に厚く御礼申し上げます。さらに、サンプリングにご協力いただいた松田陽介教授、岡田経太博士、岩泉正和博士、酒井敦博士に感謝の意を表します。本研究は、JSPS 科研費 (15H02449、18H03955、23H00340) の助成を受けて実施されました。

引用文献

- 阿部寛史・田淵諒子・奥田康仁・松本晃幸 (2018) 三つの異なる空間スケールにおける SSR マーカーを用いた外生菌根菌ショウロの遺伝構造解析。日本森林学会誌 100: 8–14.
- Abe H., Gan L., Murata M., Nara K. (2024) Habitat fragmentation strongly restricts gene flow in endangered ectomycorrhizal fungal populations: Evidence from *Rhizopogon togasawarius*, specific to *Pseudotsuga japonica*, across the entire distribution range. *Molecular Ecology* 33: e17533.
- Charlesworth D., Willis J.H. (2009) The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics* 10: 783–796.
- Collin F., Durif G., Raynal L., Lombaert E., Gautier M., Vitalis R., Marin J., Estoup A. (2021) Extending approximate Bayesian computation with supervised machine learning to infer demographic history from genetic polymorphisms using DIYABC Random Forest. *Molecular Ecology Resources* 21: 2598–2613.
- Fahrig L. (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 487–515.
- Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. (2010) *Introduction to conservation genetics* (2nd ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Franklin I.R. (1980) Evolutionary change in small populations. In: Soulé M.E., Wilcox B.A. (eds.) *Conservation biology: An evolutionary-ecological perspective*. Sinauer Associates, Massachusetts, pp. 135–149.
- Glassman S.I., Levine C.R., DiRocco A.M., Battles J.J., Bruns T.D. (2016) Ectomycorrhizal fungal spore bank recovery after a severe forest fire: Some like it hot. *The ISME Journal* 10: 1228–1239.

- Grubisha L.C., Bergemann S.E., Bruns T.D. (2007) Host islands within the California northern Channel Islands create fine-scale genetic structure in two sympatric species of the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Rhizopogon*. *Molecular Ecology* 16: 1811–1822.
- IUCN. (2023) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2023-1. Available from <https://www.iucnredlist.org> (retrieved 29 Mar. 2024).
- Mujic A.B., Hosaka K., Spatafora J.W. (2014) *Rhizopogon togasawariana* sp. nov., the first report of *Rhizopogon* associated with an Asian species of *Pseudotsuga*. *Mycologia* 106: 105–112.
- Mujic A.B., Huang B., Chen M., Wang P., Gernandt D.S., Hosaka K., Spatafora J.W. (2019) Out of western North America: Evolution of the *Rhizopogon-Pseudotsuga* symbiosis inferred by genome-scale sequence typing. *Fungal Ecology* 39: 12–25.
- Molina R., Trappe J.M., Grubisha L.C., Spatafora J.W. (1999) *Rhizopogon*. In: Cairney J.W.G., Chambers S.M. (eds.) *Ectomycorrhizal fungi key genera in profile*. Springer Berlin, Heidelberg, pp. 129–161.
- Murata M., Kinoshita A., Nara K. (2013) Revisiting the host effect on ectomycorrhizal fungal communities: Implications from host–fungal associations in relict *Pseudotsuga japonica* forests. *Mycorrhiza* 23: 641–653.
- Murata M., Nagata Y., Nara K. (2017) Soil spore banks of ectomycorrhizal fungi in endangered Japanese Douglas-fir forests. *Ecological Research* 32: 469–479.
- Okada K.H., Abe H., Matsuda Y., Nara K. (2022) Spatial distribution of spore banks of ectomycorrhizal fungus, *Rhizopogon togasawarius*, at *Pseudotsuga japonica* forest boundaries. *Journal of Forest Research* 27: 308–314.
- Ooi N. (2016) Vegetation history of Japan since the last glacial based on palynological data. *Japanese Journal of Historical Botany* 25: 1–101.
- 折原貴道 (2019) トガサワラショウロ *Rhizopogon togasawariana* の和歌山県における初記録。 *Truffology* 2: 18–19.
- Peay K.G., Garbelotto M., Bruns T.D. (2009) Spore heat resistance plays an important role in disturbance-mediated assemblage shift of ectomycorrhizal fungi colonizing *Pinus muricata* seedlings. *Journal of Ecology* 97: 537–547.
- Rivera Y., Burchhardt K.M., Kretzer A.M. (2014) Little to no genetic structure in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus spraguei* (Syn. *S. pictus*) across parts of the northeastern USA. *Mycorrhiza* 24: 227–232.
- Robledo-Arnuncio J., Gil L. (2005) Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. *Heredity* 94: 13–22.
- Smith S.E., Read D. (2008) *Mycorrhizal symbiosis* (3rd ed.). Academic Press, London.
- Tamaki S., Isoda K., Takahashi M., Yamada H., Yamashita Y. (2018) Genetic structure and diversity in relation to the recently reduced population size of the rare conifer, *Pseudotsuga japonica*, endemic to Japan. *Conservation Genetics* 19: 1243–1255.

Truffology (日本地下生菌研究会会報) 第7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. 7 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 : 2024年12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/>