

研究報告

## 印度塊菌、麗江塊菌及深脈塊菌菌絲培養之研究

傅春旭<sup>1)</sup> 蔡明哲<sup>2,3)</sup> 李鎧彤<sup>4)</sup> 黃勁暉<sup>5)</sup> 張詠怡<sup>6,7)</sup>

### 摘 要

將印度塊菌(*Tuber indicum*)、麗江塊菌(*T. lijiangense*)及深脈塊菌(*T. elevatireticulatum*)於1/2 MS上作菌種分離，進行分子生物鑑定，與基因庫的基因序列作比對，確定所分離出的菌株分別亦是印度塊菌、麗江塊菌及深脈塊菌。將印度塊菌菌株次培養到不同的培養基，發現其菌株可在1/2 MS、YEA、PDA、YMTA、Soil extract培養基上生長；印度塊菌及深脈塊菌在1/2 MS培養基中有較快的生長；麗江塊菌在YMTA培養基中有較快的生長。展望掌握塊菌的菌種分離及菌絲培養，可以進一步確立塊菌與不同樹種的共生關係外，亦期望可以應用至塊菌產業生產中。

關鍵詞：塊菌、菌株分離、分子生物鑑定、顯微特徵、培養基篩選。

傅春旭、蔡明哲、李鎧彤、黃勁暉、張詠怡。2019。印度塊菌、麗江塊菌及深脈塊菌菌絲培養之研究。台灣林業科學34(2):127-34。。

<sup>1)</sup> 林業試驗所森林保護組副研究員，10066台北市南海路53號 Associate Researcher, Division of Forest Protection, Taiwan Forestry Research Institute. 53 Nanhai Rd., Taipei 10066, Taiwan.

<sup>2)</sup> 國立臺灣大學森林環境暨資源學系教授，10617台北市羅斯福路四段1號 Professor, Department of Forestry and Resource Conservation, National Taiwan University. 1 Roosevelt Road, Section 4, Taipei 10617, Taiwan.

<sup>3)</sup> 國立臺灣大學生物資源暨農學院實驗林管理處處長，55750南投縣竹山鎮前山路一段12號 Director, The Experimental Forest, College of Bio-resources and Agriculture, National Taiwan University. 12 Qianshan Road, Section 1, Zhushan Township, Nantou County 557, Taiwan.

<sup>4)</sup> 前衛植保有限公司助理研究員，30095新竹市香山區五福路一段230巷21號 Assistant Researcher of Plant Pathology, Advance Plant Protection Limited Company. No. 21, Lane 230, Section 1, Wufu Road, Siangshan District, Hsinchu City 30095, Taiwan.

<sup>5)</sup> 天蕊股份有限公司專案經理，11192台北市士林區菁山路151號 Project Manager, Tianroei Limited Company. 151 Jingshan Rd, Shihlin Dist., Taipei City 11192, Taiwan.

<sup>6)</sup> 國立臺灣大學森林環境暨資源學系碩士研究生，10617台北市羅斯福路四段1號 Master student, Department of Forestry and Resource Conservation, National Taiwan University. 1 Roosevelt Road, Section 4, Taipei 10617, Taiwan.

<sup>7)</sup> 通訊作者 Corresponding author, e-mail:luplupcheung@gmail.com

2018年10月送審 2018年12月通過 Received October 2018, Accepted December 2018.

## Research paper

## Study of the in vitro Culture of *Tuber indicum*, *T. lijiangense* and *T. elevatireticulatum* Mycelium

Chuen-Hsu Fu,<sup>1)</sup> Ming-Jer Tsai,<sup>2,3)</sup> Hoi-Tung Li,<sup>4)</sup>  
King-Fai Wong,<sup>5)</sup> Wing-Yi Cheung<sup>6,7)</sup>

### 【 Summary 】

Pure cultures of *Tuber indicum*, *T. lijiangense*, and *T. elevatireticulatum* were obtained through isolation of fertile tissues of fruiting bodies in 1/2 Murashige and Skoog (MS) agar medium. Molecular identification of the fruiting bodies and pure cultures were carried out. *Tuber indicum* was subcultured on different types of agar medium and showed growth on 1/2 MS, yeast extract agar (YEA), potato dextrose agar (PDA), YMTA, and soil extract agar medium. *Tuber indicum* and *T. elevatireticulatum* exhibited the best growth on 1/2 MS medium, while *T. lijiangense* exhibited the best growth on YMTA medium. Mastering isolation and culturing skills of *Tuber* spp. to obtain mycelium culture can assist investigations into mutualistic relationships between *Tuber* spp. and different host trees, and also be applied to truffle production in the future.

**Key words:** *Tuber*, isolation, molecular identification, microscopic features, medium selection.

**Fu CH, Tsai MJ, Li HT, Wong KF, Cheung WY. 2019.** Study of the in vitro culture of *Tuber indicum*, *T. lijiangense* and *T. elevatireticulatum* mycelium. Taiwan J For Sci 34(2):127-34.

### 緒言

塊菌，亦稱為松露，屬於子囊菌(Ascomycota)中的塊菌科(Tuberaceae)塊菌屬(*Tuber*)真菌。

塊菌於泥土下生長，主要與松科(Pinaceae)及殼斗科(Fagaceae)樹木形成外生菌根生長。除了要與特定植物共生外，塊菌對生長的环境亦有一定的要求，在合適的环境及季節下才能形成發育子實體。一般而言，塊菌偏好在石灰質、酸鹼值介於7~8的偏鹼土壤中生長(Smith and Read 2008, Kinoshita 2016)。該子實體亦即是大眾一般所認識的高級食材—塊菌。由於子實體(塊菌)需要在特定環境、與特定的宿主共生才能形成，故此產量稀少。成熟的塊菌子實體有獨特馥郁的香味，能提升食材的香氣及味道層次，受到食客的追捧。在求過於供的情況

下，塊菌的價格居高不下，成為眾人口中的昂貴、五星級的食材，廚房的鑽石。

為提高塊菌子實體的產量，迎合市場需求，國外的塊菌業界如法國、意大利、西班牙等，均進行不少塊菌相關的人工栽培研究。在人工栽培過程中，比較常用到塊菌孢子作接種源。將成熟的塊菌子實體以均質器將其打碎，取得孢子懸浮液後，將孢子懸浮液施加在宿主植物的根系上作接種(Hu et al. 2005, Wendén et al. 2009, Benucci et al. 2011)。由於塊菌分離率低、菌絲生長速度較慢(Iotti et al. 2002)，故較少利用塊菌菌絲作接種，應用於產業生產中，相信塊菌菌絲的分離和培養技術提昇，能有助塊菌菌株保存及人工栽培的發展。

過往亦有進行塊菌菌絲分離培養相關之

研究。台灣曾進行印度塊菌(*Tuber indicum* Cooke & Massee)菌落生長的研究，其結果指出以 YpSs 洋菜培養基、pH 6、25°C 下印度塊菌菌落生長情況最佳，菌落呈厚而密實的白色絨狀菌絲(Hu et al. 2008)。意大利學者Iotti et al. (2002)從6種塊菌子實體(*Tuber maculatum* Vittad., *T. melanosporum* Vittad., *T. aestivum* Vittad., *T. marcosporum* Vittad., *T. rufum* Picco, and *T. brumale* Vittad.)以woody plant medium 純培養出塊菌菌絲，並指出6種塊菌呈白色菌落，但不同品種之間的菌絲密度則有不同，由蜘蛛網狀至棉絮狀；菌絲透明至淺啡黃色、有隔膜。Mischiati and Fontana (1993)從小葉櫟(*Tilia cordata* Mill.)、夏櫟(*Quercus robur* L.)及歐洲榛(*Corylus avellana* L.)的塊菌菌根中，以Hagem-Modess medium純培養出*Tuber magnatum* Picco，其菌落少氣生菌絲、多潛生於培養基的表面，呈白至奶白色；菌絲透明、平滑、有隔膜。

由於塊菌菌絲的特徵不多，在不同的培養基下和不同的塊菌品種皆呈現略為不同的菌相，導致難以以菌落的形態及菌絲的特徵辨別、鑑定。透過分子生物科技，以intertranscribed spacer 4 (ITS4)及ITS5作引子，便能以少量的真菌菌絲、進行鑑定，鑑定至物種層面。因此，配合分子生物科技，便能明確地分辨出所培得的菌絲是否屬塊菌的菌絲。

## 材料與方法

### 一、材料來源

共有一種黑塊菌子實體及兩種白塊菌子實體，合共三種塊菌進行分離及菌絲培養。其中為黑塊菌—印度塊菌(*T. indicum*)及白塊菌—麗江塊菌(*T. lijiangense* L. Fan & J.Z. Cao)均購自中國雲南會澤。另外一種白塊菌—深脈塊菌(*T. elevatireticulatum* Wong & Li) (Lin et al. 2018)則採自臺灣南投縣臺大實驗林溪頭營林區內的江南油杉(*Keteleeria fortunei* var. *cyclolepis* (Flous) Silba)根圈範圍內。

## 二、菌種分子鑑定

### (一) 子實體分子鑑定

利用已火焰滅菌的解剖刀取出子實體內部的產孢組織(gleba)，利用TANBead® Nucleic Acid Extraction Kit及TANBead® Nucleic Acid Extractor進行DNA萃取，以作聚合酶鏈鎖反應(polymerase chain reaction; PCR)。PCR中利用ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')及ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')通用性引子對(White et al. 1990)，使用Genomics 2x Taq PCR MasterMix(內含20 mM KCl、4 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、pH 8.8之40 mM Tris-HCl、0.2% Triton X-100、20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.2 mg/ml bovine serum albumin (BSA)、0.4 mM dNTP mix、100 U/ml Taq DNA Polymerase and stabilizer) (基龍米克斯生物科技股份有限公司)。PCR以Multigene Thermal Cycler (Labnet International, USA)進行。起始變性(denaturation)溫度為94°C 3 min；變性溫度為94°C 30 s，黏合(annealing)溫度為56°C 30 s，增幅溫度72°C 30 s，循環30週期；最後延展(extension)溫度72°C 5 min。以電泳估計各樣本之鹼基對長度(bp)後，把產物送至昕穎生醫技術股份有限公司以Sanger Sequencing Method (ABI3730)進行定序。取得定序結果後，與美國生物技術資訊中心網站(National Center for Biotechnology Information; NCBI)之資料庫內登錄的基因序列，以核酸基因庫序列群組分析程式(Basic Logical Alignment Search Tool; BLAST)作序列相似度比對。

### (二) 菌落菌絲分子鑑定

利用已火焰滅菌的5號鑷子從平板培養基內夾出適量的菌絲，以子實體分子鑑定之相同的方法，但變性、黏合及增幅循環為60週期。取得定序結果後，作序列相似度比對。

## 三、菌種分離及次培養

將塊菌子實體於自來水下沖洗，輔以小刷輕力清洗附在子實體上的泥土，使子實體表面不帶泥土，並用濾紙拭乾子實體表面水

份。將已清洗乾淨的子實體於無菌操作台上剖半，用已火焰滅菌的解剖刀取出子實體內部產孢組織用作菌種分離。將取出的產孢組織接種於1/2 MS (1/2 Murashige & Skoog medium basal salt mixture, 1/2 MS; 2.2 g Murashige & Skoog medium power (Duchefa Biochemie, the Netherlands), 15 g agar powder (Himedia, India), 1 L distilled water) 平板培養基上，在17°C 不光照恆溫培養，定期觀察菌落生長。

當菌種在1/2 MS培養基上長出菌絲時，於無菌操作台內，以已火焰滅菌的解剖刀切出1x1 cm大小的菌塊，次培養至1/2 MS平板培養基。

#### 四、印度塊菌於不同培養基下的生長

製備不同的平板培養基，包括營養培養基 (nutrient agar, NA; 28 g NA powder (Himedia), 1 L distilled water)、馬鈴薯抽出物培養基 (potato dextrose agar, PDA; 39 g PDA powder (Himedia), 1 L distilled water)、麥芽抽出物培養基 (malt extract agar base, MEA; 50 g MEA powder (Himedia), 1 L distilled water)、酵母抽出物培養基 (yeast extract agar, YEA; 3 g yeast extract powder (Himedia), 5 g peptone powder (Himedia), 15 g agar powder (Himedia), 1 L distilled water)、YMT培養基 (YMTA; 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Yakuri, Japan), 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Hayashi, Japan), 20 g glucose powder (Himedia), 5 g malt extract powder (Himedia), 2 g yeast extract powder (Himedia), 200  $\mu\text{g/L}$  Sigma Thiamine-HCl powder (Sigma, St. Louis, MO, USA), 15 g agar powder (Himedia), 1 L distilled water) (Hu and Liou 1995)、玉米粉培養基 (corn meal agar, Corn; 17 g corn meal agar powder (Himedia), 1 L distilled water)、胰蛋白酶大豆培養基 (tryptic soy agar, TSA; 40 g tryptic soy agar powder (Merck, Darmstadt, Germany), 1 L distilled water)、V8洋菜培養基 (V8 agar, V8; 100 ml V8 juice (Campbell's, USA), 15 g agar powder (Himedia), 1 L distilled water)、1/2 MS平板培養基。土壤提取液培養基 (soil extract) 製法為將1 L泥土加入4 L蒸餾水，

攪拌後沉澱，利用濾紙過濾其上清 (supernatant) 取得土壤提取液，將1 L土壤提取液加入15 g agar powder (Himedia) 製備土壤提取液培養基。

以火焰滅菌的直徑1cm穿孔器取出塊菌菌種，接在以上的培養基中，放在17°C 不光照恆溫培養，定期觀察菌落生長。

#### 五、不同塊菌菌種於1/2 MS、YMTA及土壤提取液培養基下的生長

製備1/2 MS、YMTA及soil extract培養基，以火焰滅菌的1 cm穿孔器取出不同塊菌菌絲菌種，接在以上的培養基中，放在17°C 不光照恆溫培養，定期觀察菌落生長。

## 結果

### 一、分子鑑定

透過分子鑑定方法，將購自中國雲南會澤的印度塊菌子實體及菌種分離後長出的菌絲之定序結果，與資料庫進行核酸基因序列比對後顯示，與基因庫內的 *T. indicum* (GU979080) 的相似度達99%；購自中國雲南會澤的麗江塊菌子實體及菌種分離後長出的菌絲之定序結果，與資料庫進行核酸基因序列比對後顯示與基因庫內的 *T. lijiangense* (KP276188) 的相似度達99%；採自台灣境內的深脈塊菌子實體及菌種分離後長出的菌絲之定序結果，與資料庫進行核酸基因序列比對後顯示與基因庫內的 *T. elevatireticulatum* (MF540616-21) 屬同一物種。

### 二、菌種分離

印度塊菌、麗江塊菌及深脈塊菌子實體能於1/2 MS平板培養基上成功進行菌株分離，但也有部份被培養的產孢組織沒有長出菌絲至培養基中或被細菌、其他真菌污染。

### 三、印度塊菌於不同培養基下的表現

將印度塊菌菌種次培養於不同培養基上後，發現有菌絲從菌種長至1/2 MS、YEA、PDA、YMTA、soil extract培養基中；而NA、MEA、Corn、V8、TSA則沒有菌絲從菌種長至



培養基中(Fig. 1)。Table 1為印度塊菌於不同培養基下菌落直徑，soil extract的菌落直徑最大，培養2個月直徑達6.2 cm，但其菌絲密度較低、較為疏落，其次為1/2 MS，培養2個月雖只有直徑達3.5 cm，但呈現較為密集的菌絲。

四、不同塊菌菌種於1/2 MS、YMTA及土壤提取液培養基下的生長

將印度塊菌、麗江塊菌及深脈塊菌菌種次培養於1/2 MS、YMTA及soil extract培養基上後，三種菌種都有在此三種培養基上長出菌絲(Fig. 2)。Table 2為不同塊菌菌種於1/2 MS、YMTA及土壤提取液培養基下菌落直徑。在1/2MS下，深脈塊菌呈最快的生長，培養2個月後其菌落直徑為7.4 cm，其次為麗江塊菌，培養2個月後其菌落直徑為4.6 cm，印度塊菌的

生長速度為三者中較慢，培養2個月後其菌落直徑為3.9 cm。麗江塊菌相對其他培養基，在YMTA上呈現最快、較密集的菌絲生長，培養2個月後菌落直徑達7.5 cm，比較於1/2 MS的生長速度快；相對印度塊菌及深脈塊菌在YMTA上的生較慢，培養2個月後菌落直徑只有1.8 cm及2.7 cm。雖然於soil extract培養基上，印度塊菌及深脈塊菌在培養2個月的菌落直徑較大，但菌絲疏落。故此，在是次試驗中印度塊菌及深脈塊菌適宜以1/2 MS培養，而麗江塊菌則宜用YMTA培養。

五、菌絲形態

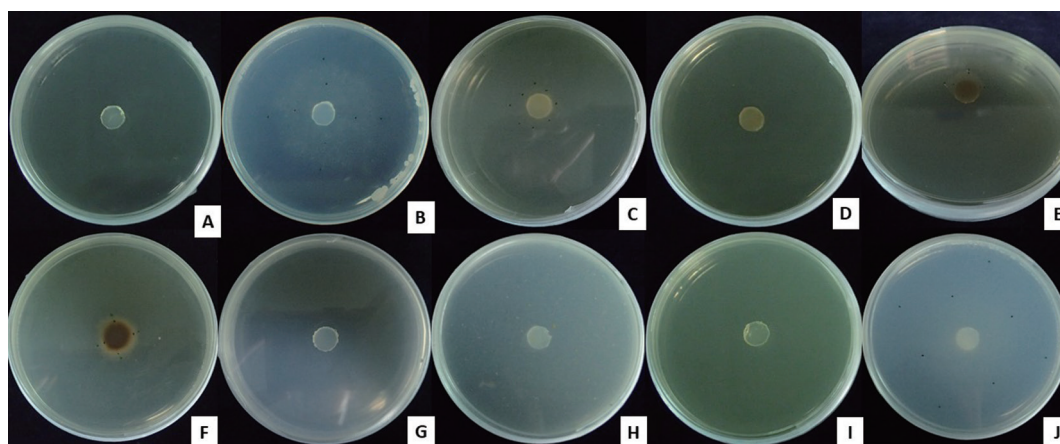
三種塊菌於三種不同的培養基上的形態相似，且具相近的顯微特徵。三者的菌落生長速度慢，菌絲潛於培養基中生長，較少出現氣

**Table 1. Mycelial growth of *Tuber indicum* on different media**

Medium	NA	1/2 MS	YEA	MEA	PDA	YMTA	Corn	V8	TSA	Soil
Colony diameter after 1 mo (cm)	×	3.0	1.8	×	1.0	1.2	×	×	×	3.7
Colony diameter after 2 mo (cm)	×	3.5	2.0	×	1.6	1.2	×	×	×	6.2
Mycelium density <sup>1)</sup>	N/A	++	++	N/A	++	++	N/A	N/A	N/A	+

×, no growth on the agar medium.

<sup>1)</sup> Mycelium density: + sparse mycelium; ++ dense mycelium.



**Fig. 1. Colony morphology of *Tuber indicum* cultured on different types of medium for 2 mo. A, NA; B, 1/2 MS; C, YEA; D, MEA; E, PDA; F, YMTA; G, Corn; H, V8; I, TSA; J, Soil.**

生菌絲。於光學顯微鏡下觀察，菌絲透明、稀疏，具隔膜，於1/2 MS培養基下培養，菌絲直徑約3.5~4  $\mu\text{m}$ 。部份菌絲特化形成環狀結構 (Fig. 3)。培養期間，未有產生有性或無性世代的孢子。

## 討論

受試驗的塊菌菌絲於不同培養基上呈現不同的生長狀況，其中白塊菌尤其麗江塊菌於YMTA上明顯生長良好，估計麗江塊菌能有效利用培養基中的營養源，包括葡萄糖、麥芽抽出物、酵母抽出物、胺基酸，轉化為菌絲的生長。而印度塊菌則可能未能有效利用YMTA的營養，以致呈現少量近無的生長。印度塊菌可能偏好營養較稀少的培養基，故於富含營養的培養基如NA、YEA、MEA、PDA及TSA均沒

有生長或只長出少量菌絲便停止生長。相反，1/2 MS所含的營養不多，但有不同種類的鹽類，反而能促使印度塊菌的菌絲生長，形成較

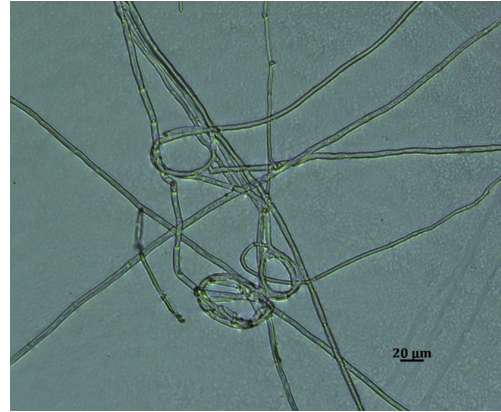


Fig. 3. Morphology of hyphae of *Tuber indicum*.

Table 2. Mycelial growth of 3 *Tuber* spp. on 1/2 MS, YMTA, and soil extract medium

Medium	<i>T. indicum</i>			<i>T. lijiangense</i>			<i>T. elevatireticulatum</i>		
	1/2 MS	YMTA	Soil	1/2 MS	YMTA	Soil	1/2 MS	YMTA	Soil
Colony diameter after 1 mo (cm)	2.6	1.0	3.0	2.3	3.1	2.4	6.3	2.0	3.7
Colony diameter after 2 mo (cm)	3.9	1.8	5.2	4.6	7.5	3.0	7.4	2.7	7.1
Mycelium density <sup>1)</sup>	++	++	+	++	++	+	++	++	+

<sup>1)</sup>Mycelium density: + sparse mycelium; ++ dense mycelium.

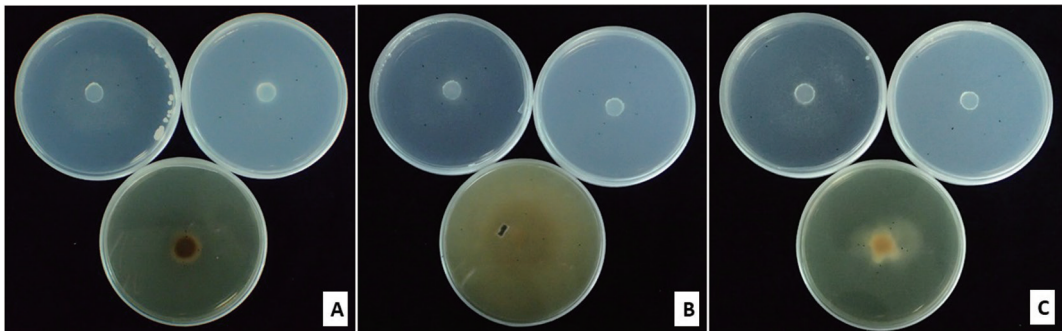


Fig. 2. Colony morphology of 3 *Tuber* spp. (A, *T. indicum*; B, *T. lijiangense*; C, *T. elevatireticulatum*) cultured on 1/2 MS (up-left), YMTA (down), and soil extract (up-right) medium for 2 mo.

明顯的菌落。於土壤提取液培養基中，印度塊菌、麗江塊菌及深脈塊菌均呈現相似的菌相，菌絲較細長、稀疏，估計土壤提取液培養基模擬了與塊菌生境相似的稀少營養環境，促使菌絲以較細長、稀疏的形態生長，以搜尋生境土壤中的宿主根系，增加形成菌根的機會。

從塊菌的子實體中分離出菌株的成功率不高。菌絲在培養基的生長速度慢，培養時間長，增加被細菌或其他環境真菌污染機會。當菌種被真菌污染後，由於塊菌菌落生長速度慢，對比大多數造成污染的真菌菌落生長速度快，亦容易產生產孢構造，故此不消數日便會將原本塊菌的菌株完全覆蓋，因而失去菌株。此外，由於塊菌子實體內的產孢組織並非無菌狀態，從子實體作分離時無可避免地伴隨細菌，造成污染源。比較嚴重的細菌污染可以觀察到細菌濃稠的菌泥包覆整個樣本，沒有菌絲從其中生長出來；比較輕微的細菌污染可以發現細菌只是在培養基上圍繞樣本生長，菌絲會潛生於培養基中間，沒有沾上細菌，故在此情況下仍可獲得菌種。亦有發現塊菌子實體樣本在培養基上，在沒有真菌及細菌的污染下，仍沒有菌絲從樣本中長出或是菌絲從樣本長出少量菌絲後，停止生長，所長出的菌絲量不足以作分子生物鑑定，以進行往後的實驗。

當可以成功分離出菌絲後，亦不代表能穩定地次培養菌種，使菌種得以保留。在每次次培養之前，會先進行菌絲的分子生物鑑定，確定菌種為塊菌屬真菌(*Tuber* sp.)再作次培養。但是亦有出現經分子生物鑑定確定菌種後，作次培養後，長出的真菌不是塊菌屬真菌的情況。培出的菌種呈現白色絨毛狀的菌相，再以分子生物鑑定後，發現真菌品種為*Parengyodontium album* (Limber) C.C. Tsang et al.。次培養菌株後，部份樣本仍會無可避免地被其他真菌及細菌污染，失去菌種。部份樣本長出少量菌絲後便停止生長，只有少部份持續生長，重新形成明顯的菌落。大部份的菌種於第一次培養時，均能再長出菌絲，形成菌落，但進行第二次培養時，菌種的活性明顯下降，部份菌株次培養後，不再長出菌絲，因而失去菌種。

雖然塊菌菌絲的培養仍然有不少未知情況、失敗率高，但成功分離及純化菌種後可以進得更多的試驗。如取得純化的塊菌菌種後，與無菌植物苗木在實驗室內作接種，由於接種環境中只有塊菌菌種和植物苗木的根系，當兩者相遇並成功形成菌根，便毫無疑問地可以確立兩者的共生關係。此外，亦可以利用塊菌菌絲作接種源，將菌種接到與共生宿主根系，成為塊菌苗，栽培適當年期後可望結出塊菌子實體，成為產業生產的其中一種方式。

## 結論

由於塊菌菌絲生長慢、巨觀及微觀特徵不多，且種內的分別不大，透過分子生物鑑定的方法，確認塊菌子實體及分離出的菌絲的物種，能快速、準確地得悉有否成功分離到塊菌菌種，以進行往後的試驗。透過培養基篩選方法發現1/2 MS均適合受試驗的塊菌菌株生長。成功分離塊菌菌絲及篩選出合適的培養基其實為塊菌菌絲培養研究的開端，當可以穩定地次培養、保存菌種，才可以應用到共生關係、保育、產業生產、抽出物等研究，豐富整個塊菌相關的研究。

## 謝誌

本研究承蒙行政院農業委員會科技計劃「107非用材林產品研發與生產(2/3)」經費補助，謹此致謝。

## 引用文獻

- Benucci GMN, Bonito G, Falini LB, Ben-civenga M. 2011.** Mycorrhization of pecan trees (*Carya illinoensis*) with commercial truffle species: *Tuber aestivum* Vittad and *Tuber borchii* Vittad. *Mycorrhiza* 22:383-92.
- Hu HT, Liou CF. 1995.** Study on the relationship between *Pinus taiwanensis* Hay. and *Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Sing. (II)

Effects of pH and temperature on colony growth of *Tricholoma matsutake*. Q J Exp For Natl Taiwan Univ 9(3):21-7.

**Hu HT, Wang Y, Hu BY. 2005.** Cultivation of *Tuber formosanum* on limed soil in Taiwan. NZ J Crop Hort Sci 33:363-6.

**Hu HT, Wang YN, Liou CF. 2008.** Effect of temperature and pH on the colony growth of *Tuber melanosporum* Vittad., *Tuber magnatum* Pico and *Tuber pseudoexcavatum* Wang et al. in agar medium. Q J Chin For 41(2):181-98.

**Iotti M, Amicucci A, Stocchi V, Zambonelli A. 2002.** Morphological and molecular characterization of mycelia of some *Tuber* species in pure culture. New Phytol 155:499-505.

**Kinoshita A, Sasaki H, Nara K. 2016.** Two new truffle species, *Tuber japonicum* and *Tuber flavidosporum* spp. nov. found from Japan.

Mycoscience 57:366-73.

**Lin CL, Tsai MJ, Fu CH, Chang TT, Li HT, Wong KF. 2018.** *Tuber elevatireticulatum* sp. nov, a new species of whitish truffle from Taiwan. Bot Stud 59(1):25.

**Mischiati P, Fontana A. 1993.** In vitro culture of *Tuber magnatum* mycelium isolated from mycorrhizas. Mycol Res 97(1):40-4.

**Smith SE, Read DJ. 2008.** Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. UK: Academic Press. 787 p.

**Wedén C, Pettersson L, Danell E. 2009.** Truffle cultivation in Sweden: results from *Quercus robur* and *Corylus avellana* field trails on island of Gotland. Scand J For Res 24:37-53.

**White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press. p 315-22.