

2013 年名古屋大会
シンポジウムの概要

菌根共生からみる植物栄養の新時代*

小八重善裕¹・東樹宏和²・山本哲史²・竹本大吾³・江沢辰広⁴・
河原 愛⁴・荒川竜太⁴・齋藤勝晴⁵・中川知己⁶

1. は じ め に

農業生産と環境負荷低減の両立を図る取り組みとして、菌根共生を活用した植物栽培に期待がもたれる。草本木本を問わず、多くの植物は根でアーバスキュラー菌根菌（AM 菌）や外生菌根菌と共生しており、土壤に広く伸びた菌糸を使って養分を効率よく吸収する。植物種と菌種の組み合わせの検討や、菌根の養分吸収機構の解明、収量増につながる分子機構などを明らかにすることは、植物に効率よく肥料を取り込ませ、肥料の節減を図るためにも重要である。しかし実際の生態系で機能する菌根の種類は膨大であり、またその生態や生理にも不明な点が多い。どのようにして菌根を活用・運用することが、植物生産にとって望ましいのか、明確な道筋は見えていない。ところが近年、バイオインフォマティクスを使った研究が非常に有効になってきており、実際の圃場や森林に形成される菌根の植物種、菌種、遺伝子発現、分子間相互作用など、これまで追跡が困難であった菌根の複雑な生態とその動態、さらには養分輸送を含めた生理的な振る舞いまでもが、*in silico* で予測出

来るようになる可能性を感じさせる。

本シンポジウムでは、バイオインフォマティクスが大きな威力を発揮する状況に鑑みて、菌根共生研究がおかれている現状と課題を今一度明示する。そして、現在蓄積されつつある菌根関連のデータを最大限活用し、植物栄養における菌根の機能と価値を真に理解して、農業利用につなげていくためには、今以上にどのようなアプローチ、あるいは新しい概念が必要なのか、議論しようとするものである。以下に講演の概要を紹介する。

（小八重善裕）。

2. 植物のアーバスキュラー菌根共生を介した リン酸吸収機構の最新事情 一つかず離れずのちょうどいい関係ー

植物にとってリンは欠乏しやすい栄養素の一つである。植物は菌根共生を行うことで、土壤中のリン酸を効率よく吸収する。しかし具体的にはどのような制御機構でリン酸を得ているのか、あるいはどのようにするとうまく植物がリン酸を吸収してくれるようになるのか、まだまだ不明な点が多い。

1) リン酸吸収の直接経路と菌根経路

「直接経路」とは根の表面からのリン酸吸収であり、リン酸が表皮細胞のリン酸輸送体を介して取り込まれる経路を指す。「菌根経路」は、AM 菌のリン酸が、根の皮層細胞内に形成された菌の枝分かれ構造（アーバスキュール、樹枝状体）にまで運ばれ、それを取り囲む植物膜（ペリアーバスキュール膜）に局在するリン酸輸送体を介して取り込まれる経路のことを指す（Maeda *et al.*, 2006; Javot *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012）。しかし菌根経路は、直接経路を補う付加的なものではない。植物は AM 菌と共生することで、菌の種類や感染率に関係なく、自身のリン酸の 70 % あるいはそれ以上を、直接経路でなく菌根経路で獲得するようになる（Smith *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2012）。一方で不思議なことに、樹枝状体は数日のうちに必ず崩壊するという特性を持つ（Toth and Toth, 1982; Alexander *et al.*, 1989; Kobae and Hata, 2010）。菌根による安定なリン酸の吸収は、一見矛盾するようではあるが、

Yoshihiro KOBAE, Hirokazu TOJU, Satoshi YAMAMOTO, Daigo TAKEMOTO, Tatsuhiro EZAWA, Ai KAWAHARA, Ryota ARAKAWA, Katsuharu SAITO and Tomomi NAKAGAWA: New age of plant nutrition research through the studies of mycorrhizal roots

* 本稿は、2013 年 9 月の日本土壤肥料学会名古屋大会シンポジウムの趣旨および各講演内容を要約したものである。

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科（113-8657 文京区弥生 1-1-1）

² 京都大学人間・環境学研究科（606-8501 京都市左京区吉田二本松町）

³ 名古屋大学大学院生命農学研究科（464-8610 名古屋市千種区不老町）

⁴ 北海道大学大学院農学研究院（060-8589 札幌市北区北 9 条西 9 丁目）

⁵ 信州大学農学部食料生産科学科（399-4598 上伊那郡南箕輪村 8304）

⁶ 明治大学農学部（214-8571 川崎市多摩区東三田 1-1-1）
2014 年 1 月 25 日受付・2014 年 2 月 28 日受理
日本土壤肥料学雑誌 第 85 巻 第 3 号 p.279~284 (2014)

樹枝状体が継続的に形成と崩壊を繰り返すことで実現される。

2) リン酸処理で共生が抑制されるメカニズム

菌根共生はリン肥料を与えると成立しにくい (Smith and Read, 2008)。この特性は、農業において施肥と菌根共生の活用との両立が難しいという大きな問題を引き起こすが、その抑制機構はいまだ不明である。Bruceら (1994) によれば、リン酸処理により感染単位 (一本の菌糸感染から派生する樹枝状体の集団) の発達が抑制されるとのことであるが、その細胞レベルでの機作や分子機構などを調べることはこれまで難しかった。最近演者らは、菌根特異的に発現する分子マーカーを用いた菌根のライブイメージングを駆使することで、リン酸による共生抑制の機作を細胞レベルで解き明かしつつある。リン酸による共生抑制機構を明らかにし、その抑制解除の方策を見出すことが、菌根を活用した低環境負荷型の農業実現には必要である。

AM 菌根共生は、細胞内共生が一過的かつ短時間であることや、リン酸で速やかに抑制されることなど、他の菌根には見られないユニークな特性を持つ。4 億年以上のあいだ寄り添って生きてきた植物と、AM 菌とが、極めて短時間に共生を終わらせるのはどういう理由だろうか。つかず離れずの関係に、持続的な共生のための秘訣と、そして農業利用への手掛かりが隠されているように思うのだが、その解明はこれからの課題である。(小八重善裕)

3. 植物と真菌の共生関係を森林全体レベルで解明する 外生菌根菌・アーバスキュラー菌根菌・内生菌が形作る複雑な地下群集

ひとつの森の中において、植物個体は菌根菌を介して窒素やリンといった資源を他個体・他種との間で奪い合っている。菌根菌に関わるこれまでの生態学研究の多くが、森林内の特定の植物種を選んで菌根菌群集を解明してきた。本発表では、網羅的な植物根サンプリングと次世代シーケンシングを組み合わせた最新の研究成果について発表する。

1) 真菌群集を大規模に解明するための手法整備

植物と地下で関わっている真菌の群集構造を網羅的に解明するために、第一に、真菌界を万遍なく増幅するユニバーサルな PCR プライマーを作成した (Toju *et al.*, 2012)。NCBI のデータベース上にある真菌 ITS の全配列に基づきユニバーサルプライマーを設計した。In silico PCR という評価手法により、従来のプライマーでは子嚢菌と担子菌の間で増幅効率が異なるなどの問題があることがわかり、偏りのない真菌群集構造解明のためには、新設計のプライマーを使用することが推奨された。

第二に、次世代シーケンシングで得られた膨大なリードを、正確かつ高速にアセンブルするプログラム「Assams」を作成した (Tanabe, Muranushi and Toju, in preparation)。

第三に、上記で得られたコンティグ配列をもとに、自

動で生物同定を行うプログラム「Claident」を作成した (Tanabe and Toju, 2013)。このプログラムにより、客観的な基準にしたがって膨大な生物情報を取得することが可能となった。

2) 膨大な多様性と想定外に複雑な植物-真菌関係

上記の解析環境を土台に、北海道からマレーシアにかけての様々な森林において、地下真菌群集の解明を行なったところ、一つの森林内において、数百種類以上の外生菌根菌や数十種類以上のアーバスキュラー菌根菌が出現した。この中には宿主植物に対して統計的に有意な選好性を持つものが存在した。しかし、群集全体で見ると、植物種間で数多くの共生真菌が共有されていた (Toju *et al.*, 2013a-c; Toju *et al.*, 2014)。

さらに重要なことに、多様な内生菌 (エンドファイト) らしき子嚢菌が根内に共生していることがわかった (Toju *et al.*, 2013a-c; Toju *et al.*, 2014)。こうした内生菌は宿主の範囲が極めて広い一方で、中には根圏の有機体窒素が無機化されるのを促進すると推測されている系統に近いものも存在した。しかし、その生理学的な機能は今のところ不明である。

3) 生態学の理論を適用する

上記のデータをもとに群集生態学的な統計解析を進めている。共生する真菌の種組成を基にして森林内の植物がいくつかのグループに分類されることや、根内で菌根菌と内生菌が何らかの相互作用をしていることが解明されつつある。(東樹宏和)

4. 植物の根における菌どうしの競争と調和

根共生真菌の網羅的解析から見てきた新たな視点

植物根に生息する菌類は、菌どうしも栄養やハビタットをめぐる競争していることがメソコスム実験などで明らかになっており (Kennedy *et al.*, 2007)。そのような負の相互作用は、菌どうしの競争排除を促すと予想される。逆に、正の相互作用をする菌、つまり互いに協調的な関係を結んでいる菌であれば、それらの菌は同一の根系内で共存するだろう。種間関係の結果として、真菌類はホストの根において共存や排除のパターンを示すため、ある2種の菌の空間的配置を知ることによって、それらの種間関係 (相互作用が非常に弱いか、相利的な関係か、競争の関係なのか) を推定することができる (Stone and Roberts, 1990, 1992)。

このアイデアに基づき、コナラ実生とアラカシ実生に共生する真菌類の空間的配置を明らかにした。350 m × 200 m という比較的狭い範囲でコナラ実生 249 個体、アラカシ実生 188 個体を採集し、各実生個体の根に生息する真菌類を、メタゲノム解析 (Claident, Tanabe and Toju, 2013) によって明らかにした。コナラ・アラカシからは合計 319 種類の真菌類 (塩基配列類似性 97 % 以上) が検出された。これらの菌について総当たりで2種間の空間的配置を検証した結果、外生菌根菌どうしやルートエンドファ

イトどうしのように、根内でのハビタットが重複する菌どうしは競争があると考えられた。また、菌どうしの相互作用は、ホストとなる植物種によって変化する可能性も示唆された。これは、栄養条件やハビタット選好性を介して、ホストが根における菌どうしの相互作用に影響を及ぼしている可能性を示している。(山本哲史)

5. アーバスキュラー菌根菌における Baas Beeking 仮説の検証

多重環境フィルタを生き抜く「最強ジェネラリスト」存在の可能性

'Everything is everywhere, but the environment selects'

Baas Beeking は世界各地の塩湖における好塩性微生物の研究から、微生物の分布は拡散（地理的隔離）により制限されず、ローカルな環境により決まるとの仮説を提唱した (De Wit and Bouvier, 2006)。次世代シーケンサーの普及により、広範囲の環境から得られた DNA を一斉解析することが可能になったため、本仮説へのアプローチが世界中で活発化している。

AM 菌と原始的な陸上植物の共生が始まった時期は、およそ 4 億年前のデボン紀であると推定されている (Simon *et al.*, 1993)。これまでの AM 菌の種分布に関する研究は、限定された地域の生態系に着目したものがほとんどで、グローバルスケールで分布を決める環境要因は分かっていない (Öpik *et al.*, 2006)。ただ、超大陸分裂前の三疊紀 (2.4 億年前) には既に現存の主要な分類群が出現していた (Redecker *et al.*, 2000) ことは、その種分布に大陸間隔離などの地理的要因はほとんど影響しない可能性を示唆する。

1) アーバスキュラー菌根菌における生態学的重要性

AM 菌は植物のリン酸獲得効率を著しく促進することから、早くから農業への応用が期待されてきた。ただ、実際のフィールドで有効性が示された例は少ない (Tawaraya *et al.*, 2012)。もともと農地には土着の AM 菌が棲息しているため、導入した外来 (alien) 種が定着できるか否か予測できない。しかし、AM 菌の種分布を決める環境要因を明らかできれば、どのような種をどのような場面 (生態系) で利用できるか予測可能になるはずである。

2) メタ解析：現在までの知見、仮説および手法

これまで演者らが行ってきた AM 菌の生態調査では、地理的隔離や気候要因は種分布にほとんど影響しない一方で、土壌 pH は強力な決定因子の一つであることがわかってきた (江沢・河原, 2012)。その後、リン酸施肥歴や低温、土壌攪乱、植物種 (根分泌物)、火山の降灰などの要因について研究対象を広げ、国内外の 13 調査地からデータ収集を進めるうちに、あらゆる環境下で必ず検出される分類群—ジェネラリスト—が存在する可能性が予見された。フィールドから採取した根より直接、または採取した根圏土壌を使って栽培した植物の根から DNA を抽出し、AM 菌の LSU rDNA の多型領域について合計で約 6,000 ク

ローン (サンガー法) および 125,000 リード (454 FLX Titanium) の配列情報を得て、相同性から規定した仮想種 (ファイロタイプ) の分布と、環境要因との相関解析を行ったところ、ほとんどの環境に出現する「最強ジェネラリスト」が複数の分類群から見つかった。これらジェネラリストの環境適応機構は、学術的に興味深いだけでなく、AM 菌の応用面でも重要な突破口となり得る。

(江沢辰広・河原 愛・荒川竜太)

6. イネ科牧草に共生する糸状菌エンドファイトの共生確立に関わる遺伝子群の機能解析

Epichloë/Neotyphodium 属 (epichloae) エンドファイトは、イネ科 (イチゴツナギ亜科) の牧草や芝草の地上部細胞間隙で生育し、共生関係を保っている糸状菌エンドファイトである。Epichloae エンドファイトは、宿主植物感染時に様々な生理活性物質を産生し、植物に動物や昆虫による補食の抑制、耐乾性、耐病性などの効果をもたらす (Tanaka *et al.*, 2012)。

1) 共生確立に関与する遺伝子の機能

Epichloae エンドファイトは、1) 宿主植物の成長と同調した菌糸進展をする、2) 宿主植物の抵抗性を誘導しないあるいは耐性である、といった特性により、宿主植物への安定した感染状態を確立している。Epichloae エンドファイトは細胞外マトリックスを介して植物細胞に粘着し、植物細胞の伸張に合わせて菌糸の中間部が伸長することで、植物の成長と同調した静かな共存関係を保っていると推定されている (Christensen *et al.*, 2008)。

演者はこれまでに、共生的感染に必要なエンドファイトの遺伝子として、NADPH 酸化酵素 NoxA およびその制御因子、低分子量 G タンパク質 RacA、Zn(II)Cys6 型転写制御因子 ProA、新奇核局在タンパク質 NsiA、ヘテロ 3 量体型 G タンパク質 GpaA などを単離している。これらの変異株はいずれも宿主植物内で菌糸量が増加し、植物の矮化や枯死を引き起こした (Tanaka *et al.*, 2006, 2008, 2013; Takemoto *et al.*, 2006, 2011)。

2) 共生確立と分生子形成、菌糸細胞融合の関係

植物に矮化を引き起こす変異株から単離された遺伝子には、ProA、Nox といった他の糸状菌において有性生殖や菌糸細胞融合に関与することが知られる遺伝子が含まれている。通常、野生株は培地上で殆ど分生子を形成しないが、noxA、gpaA、proA 破壊株では分生子形成が著しく増加しており、これら遺伝子が分生子形成を抑制していることが解った。一方、NoxA の制御因子である noxR 破壊株、racA 破壊株、nsiA 破壊株では、分生子形成の増加は認められなかったことより、共生確立能と分生子形成の抑制は必ずしも一致しないことが示された。一方、共生変異株の菌糸融合を観察したところ、野生株で観察される細胞融合が noxA、noxR、racA、gpaA、proA、nsiA いずれの破壊株でも失われた。以上の結果から、分生子形成の抑制と細胞融合を誘導する情報伝達がある程度関連していること、

共生確立と細胞融合能には密接な関係があること示された (Kayano *et al.*, 2013; Tanaka *et al.*, 2013). (竹本大吾)

7. 次世代シーケンサーでアーバスキュラー菌根を解析し、分かったことややっぱり分からなかったこと

AM 菌のゲノム解読は *Glomus* ゲノム国際コンソーシアムを中心に 2004 年頃からサンガー法によるシーケンスで行われてきた。2011 年からは次世代シーケンサーを用いた解読が進められており、2014 年にゲノムサイズが比較的小さい *Rhizophagus irregularis* DAOM197198 (以前は *Glomus intraradices* に分類されていた) のゲノム配列が明らかにされた (Tisserant *et al.*, 2013)。AM 菌のゲノム情報の中には、菌根共生に関する様々な疑問に対する答えが潜んでいるかもしれない。様々な疑問とは例えば、AM 菌が植物と共生できるのはなぜか、AM 菌の感染過程にはどのような遺伝子が関与しているのか、なぜ AM 菌は純粋培養できないのか、なぜ宿主特異性がないのか、AM 菌はどのようにして宿主植物に養分を供給しているのか、などである。

我々は、共生成立過程に関わる AM 菌の遺伝子を同定するため、内生菌糸と外生菌糸の発現遺伝子の比較を行った。発現遺伝子を網羅的に解析する方法として RNA-seq 解析がある。その大きな利点は、非モデル生物である AM 菌を解析できることと、AM 菌と植物の両者の発現遺伝子を同時に解析できる点にある。内生菌糸と外生菌糸で発現量が異なる遺伝子は約 3,000 種類 (ゲノム中の遺伝子の 1 割) 存在した。このうち約半分は機能未知の遺伝子であったが、内生菌糸では、糖新生やペントースリン酸経路の遺伝子発現が上昇しており、この経路で NADPH を生産し脂肪酸合成や膜合成を盛んに行い、樹枝状体形成などに利用されていると考えられる。その他にも、キチン合成の遺伝子発現も高く樹枝状体の細胞壁合成に関わると思われる。また、トレハロースやグリコーゲン合成の遺伝子発現が上昇しており、糖の貯蔵が盛んであると考えられる。一方で外生菌糸では、アルギニン合成に関わる遺伝子発現が高く、外生菌糸でアルギニンが合成され、内生菌糸まで運ばれると考えられる。

我々は網羅的な解析を行うことで、代謝ネットワーク全体を概観して共生過程の遺伝子発現変化をとらえることができた。一方で今の段階では、なぜ AM 菌が植物と共生できるのか、といったより踏み込んだ疑問には答えられていない。今後、バイオインフォマティクスとの共同で既存の解析法を適用するとともに新たな解析手法を開発しながらゲノム情報から菌根共生の主要な命題にアプローチしていく必要がある。同時に対象生物をよく知っている wet 系の研究者が、研究目的にあった材料調製や解析データの解釈を協調して行っていく必要がある。また、注目すべき AM 菌の遺伝子を抽出しても今のところ機能を解析できないのが問題となっており、形質転換法やジーンサイレンシング法の開発が望まれる。(齋藤勝晴)

8. 陸上植物における菌根菌共生メカニズムの進化を探る 昨日の友は今日も友?

植物は自然環境中で、様々な病原微生物の脅威に曝されながら生存している。植物はこれに対抗するために高度な防御メカニズムを発達させてきた (Boller and Felix 2009; Dodds and Rathjen 2010)。一方で根粒菌や菌根菌は植物の細胞内に導かれて共生を行うが、これは一般的な植物病理学の観点からは非常に不思議な生命現象である。我々は共生における防御メカニズムに興味を持ち、特に進化の観点から研究を行っている。

1) 根粒菌共生および菌根菌共生と防御応答の関わり

根粒菌共生と菌根菌共生の両方に共通で必要とされる遺伝子群は Common Symbiotic Pathway (CSP) として知られている。根粒菌共生はほぼマメ科植物に限定されており、菌根菌共生は陸上植物の大部分で観察されることから、CSP 遺伝子群の発見は、根粒菌共生が菌根菌共生から発展して獲得されたことを示唆している (Kouchi *et al.* 2010)。

根粒菌共生において CSP は、根粒菌が分泌する共生シグナル Nod ファクターを感知した LysM 型受容体キナーゼ NFR1 により活性化されて、共生プログラムが開始される (Radutoiu *et al.* 2003)。一方で NFR1 自体は、非マメ科モデル植物のシロイヌナズナで同定された防御応答を起動する LysM 型受容体キナーゼ CERK1 と非常に高い相同性を持つ (Nakagawa *et al.* 2011)。根粒菌共生は菌根菌共生だけではなく防御メカニズムとも密接に関わっており、さらに菌根菌共生と防御応答にも関連があることが推測される。

2) 菌根菌共生における共生と防御応答の進化

菌根菌共生は最初の陸上植物であるコケ植物で成立したと考えられているが、シダ植物やコケ植物の共生分子機構の知見はほとんど無い。我々は菌根菌が感染するフタバネゼニゴケを新たなモデル植物として整備を行っている。次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンスおよびゲノムシーケンスを進めており、これまで被子植物の情報のみで議論されてきた共生遺伝子の分子進化について、再考させるような結果を得ている。

3) 今後の展望と本研究の意義

陸上植物は 4 億年以上の進化の過程で、花や種子、維管束など様々な形質を産み出した。同じ期間に植物と微生物の相互作用メカニズムも、試行錯誤を繰り返しながら大きく進化したと推測される。共生と防御応答の新たなモデル植物であるフタバネゼニゴケは、このような進化のプロセスの解明に貢献できると期待される。(中川知己)

9. おわりに

バイオインフォマティクスは、これまで遺伝学や生化学などによって、一つ一つの点として理解されてきた個別の生命現象を、情報のつながりの中から芋づる式に掘り起

こすことを可能にしつつある。この手法は当然、植物栄養研究にも適用されるだろう。近い将来、実際の圃場や森林における植物栄養の理解を目指して、菌根を含んだメタゲノム、トランスクリプトームデータがパブリックに蓄積していき、多様な菌根の機能が予測できるようになる時代がやってくるかもしれない。その時にどうやって、その機能を実際に証明、検証していくのか、そしてどのようにして農業に活かすのか、それをあらかじめ議論したい、というのが本シンポジウムを企画した理由であった。ごく最近、AM菌のモデル菌である *R. irregularis* の全ゲノム配列が解読された (Tisserant *et al.*, 2013)。驚いたことに、菌根で高発現する *R. irregularis* 遺伝子の上位 50 遺伝子のうち、29 遺伝子は小分子分泌タンパク質 (<150aa) をコードしている。植物病原菌のアナロジーで行くと、これら小分子タンパク質 (エフェクター) は植物に作用して共生の成立やその機能調節に関わっている可能性が高い (Kloppholz *et al.*, 2011; Plett *et al.*, 2011)。こういった菌根菌側の分子は、菌根菌の中で解析することは難しいのだが、植物細胞に発現させてその機能を解析することが可能であり、これまで解析が困難と思われていた菌根の複雑な機能的つながりが、工夫次第で解き明かされる可能性もある。こういった新しいアプローチを海外のグループは精力的に開拓しており、われわれも世界をリードする新しい手法や概念を提唱する必要がある。(小八重善裕)

文 献

- Alexander, T., Toth, R., Meier, R., and Weber, H.C. 1989. Dynamics of arbuscule development and degeneration in onion, bean, and tomato with reference to vesicular-arbuscular mycorrhizae in grasses. *Can. J. Bot.*, **67**, 2505-2513.
- Boller, T., and Felix, G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **60**, 379-406.
- Bruce, A., Smith, S. E., and Tester, M. 1994. The development of mycorrhizal infection in cucumber: effect of P supply on root growth, formation of entry points and growth of infection units. *New Phytol.*, **12**, 507-514.
- Christensen, M. J., Bennett, R. J., Ansari, H. A., Koga, H., Johnson, R. D., Bryan, G. T., Simpson, W. R., Koolaard, J. P., Nickless, E. M., and Voisey, C. R. 2008. *Epichloë* endophytes grow by intercalary hyphal extension in elongating grass leaves. *Fungal Genet. Biol.*, **45**, 84-93.
- De Wit, R., and Bouvier, T. 2006. 'Everything is everywhere, but, the environment selects': what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environ. Microbiol.*, **8**, 755-758.
- Dodds, P. N., and Rathjen, J. P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 539-548.
- Javot, H., Penmetsa, R. V., Terzaghi, N., Cook, D. R., and Harrison, M. J. 2007. A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 1720-1725.
- 江沢辰広・河原 愛 2012. 強酸性土壌に棲息するアーバスキュラー菌根菌: バイオニア植生を支える「化石的」絶対共生菌. *生物科学*, **63**, 238-246.
- Kayano, Y., Tanaka, A., Akano, F., Scott, B., and Takemoto, D. 2013. Differential roles of NADPH oxidases and associated regulators in polarized growth, conidiation and hyphal fusion in the symbiotic fungus *Epichloë festucae*. *Fungal Genet. Biol.*, **56**, 87-97.
- Kennedy, P. G., Hortal, S., Bergemann, S. E., and Bruns, T. D. 2007. Competitive interactions among three ectomycorrhizal fungi and their relation to host plant performance. *J. Ecol.*, **95**, 1338-1345.
- Kloppholz, S., Kuhn, H., and Requena, N. 2011. A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Curr. Biol.*, **21**, 1204-1209.
- Kobae, Y., and Hata, S. 2010. Dynamics of periarbuscular membranes visualized with a fluorescent phosphate transporter in arbuscular mycorrhizal roots of rice. *Plant Cell Physiol.*, **51**, 341-353.
- Koch, A. M., Kuhn, G., Fontanillas, P., Fumagalli, L., Goudet, J., and Sanders, I. R. 2004. High genetic variability and low local diversity in a population of arbuscular mycorrhizal fungi. *Proc. Nat. Aca. Sci. USA*, **101**, 2369-2374.
- Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., Hakoyama, T., Nakagawa, T., Umehara, Y., Suganuma, N., and Kawaguchi, M. 2010. How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant Cell Physiol.*, **51**, 1381-1397.
- Öpik, M., Moora, M., Liira, J., and Zobel, M. 2006. Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *J. Ecol.*, **94**, 778-790.
- Plett, J. M., Kemppainen, M., Kale, S. D., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., Tyler, B. M., Pardo, A. G., and Martin, F. 2011. A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Curr. Biol.*, **21**, 1197-1203.
- Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Gronlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., and Stougaard, J. 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, **425**, 585-592.
- Redecker, D., Kodner, R., and Graham, L. E. 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, **289**, 1920-1921.
- Simon, L., Bousquet, J., Levesque, R. C., and Lalonde, M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*, **363**, 67-69.
- Smith, S. E., Smith, F. A., and Jakobsen, I. 2003. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol.*, **133**, 16-20.
- Smith, S. E., and Read, D. J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, Ed3, Academic Press, Inc., San Diego, CA.
- Stone, L., and Roberts A. 1990. Competitive exclusion, or species aggregation? *Oecologia*, **91**, 419-424.
- Stone, L., and Roberts A. 1990. The checkerboard score and species distributions. *Oecologia*, **85**, 74-79.
- Takemoto, D., Kamakura, S., Saikia, S., Becker, Y., Wrenn, R., Tanaka, A., Sumimoto, H., and Scott, B. 2011. Polarity proteins Bem1 and Cdc24 are components of the filamentous fungal NADPH oxidase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 2861-2866.
- Takemoto, D., Tanaka, A., and Scott, B. 2006. A p67^{Phox}-like regulator is recruited to control hyphal branching in a fungal-

- grass mutualistic symbiosis. *Plant Cell*, **18**, 2807–2821.
- Tanabe, A. S., and Toju, H. 2013. Two new computational methods for universal DNA barcoding: A benchmark using barcode sequences of bacteria, archaea, animals, fungi, and land plants. *PLOS ONE*, **8**, e76910.
- Tanaka, A., Christensen, M. J., Takemoto, D., Park, P., and Scott, B. 2006. Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic association. *Plant Cell*, **18**, 1052–1066.
- Tanaka, A., Takemoto, D., Chujo, T., and Scott, B. 2012. Fungal endophytes of grasses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **15**, 462–468.
- Tanaka, A., Takemoto, D., Hyon, G. S., Park, P., and Scott, B. 2008. NoxA activation by the small GTPase RacA is required to maintain a mutualistic symbiotic association between *Epichloë festucae* and perennial ryegrass. *Mol. Microbiol.*, **68**, 1165–1178.
- Tawaraya, K., Hirose, R., and Wagatsuma, T. 2012. Inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi can substantially reduce phosphate fertilizer application to *Allium fistulosum* L. and achieve marketable yield under field condition. *Biol. Fertil. Soils*, **48**, 839–843.
- Tisserant, E., Malbreil, M., Kuo, A., Kohler, A., Symeonidi, A., Balestrini, R., Charron, P., Duensing, N., Frei dit Frey, N., Gianinazzi-Pearson, V., Gilbert, L. B., Handa, Y., Herr, J. R., Hijri, M., Koul, R., Kawaguchi, M., Krajinski, F., Lammers, P. J., Masclaux, F. G., Murat, C., Morin, E., Ndikumana, S., Pagni, M., Petitpierre, D., Requena, N., Rosikiewicz, P., Riley, R., Saito, K., San Clemente, H., Shapiro, H., van Tuinen, D., Becard, G., Bonfante, P., Paszkowski, U., Shachar-Hill, Y., Tuskan, G. A., Young, P. W., Sanders, I. R., Henrissat, B., Rensing, S. A., Grigoriev, I. V., Corradi, N., Roux, C., and Martin, F. 2013. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 20117–20122.
- Toju, H., Sato, H., Yamamoto, S., Kadowaki, K., Tanabe, A. S., Yazawa, S., Nishimura, O., and Agata, K. 2013a. How are plant and fungal communities linked to each other in below-ground ecosystems? A massively-parallel pyrosequencing analysis of the association specificity of root-associated fungi and their host plants. *Ecol. Evol.*, **3**, 3112–3124.
- Toju, H., Sato, H., and Tanabe, A. S. 2014. Diversity and spatial structure of belowground plant-fungal symbiosis in a mixed subtropical forest of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal plants. *PLOS ONE*, **9**, e86566.
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., and Sato, H. 2012. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLOS ONE*, **7**, e40863.
- Toju, H., Yamamoto, S., Sato, H., Tanabe, A. S., Gilbert, G. S., and Kadowaki, K. 2013b. Community composition of root-associated fungi in a *Quercus*-dominated temperate forest: “co-dominance” of mycorrhizal and root-endophytic fungi. *Ecol. Evol.*, **3**, 1281–1293.
- Toju, H., Yamamoto, S., Sato, H., and Tanabe, A. S. 2013c. Sharing of diverse mycorrhizal and root-endophytic fungi among plant species in an oak-dominated cool-temperate forest. *PLOS ONE*, **8**, e78248.
- Toth, R., and Toth, D. 1982. Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae using a morphometric technique. *Mycologia*, **74**, 182–187.
- Yang, S. Y., Grønlund, M., Jakobsen, I., Grotemeyer, M. S., Rentsch, D., Miyao, A., Hirochika, H., Kumar, C. S., Sundaresan, V., Salamin, N., Catausan, S., Mattes, N., Heuer, S., and Paszkowski, U. 2012. Nonredundant regulation of rice arbuscular mycorrhizal symbiosis by two members of the *PHOSPHATE TRANSPORTER1* gene family. *Plant Cell*, **24**, 4236–4251.