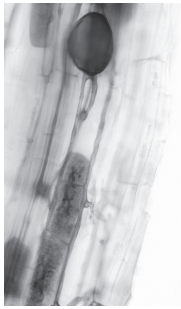




HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	土壌微生物が創る共生の世界：その先端的研究事例と農業への応用的研究展開：2. 第二，第三次技術革新が開くアーバスキュラー菌根共生研究：栄養共生機構・生態・ビジネス展望
Author(s)	江澤，辰広
Citation	日本土壌肥科学雑誌，87(1)，64-69 https://doi.org/10.20710/dojo.87.1_64
Issue Date	2016-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67002
Type	journal article
File Information	87_64.pdf





土壌微生物が創る共生の世界 —その先端的研究事例と農業への応用的研究展開—

2. 第二, 第三次技術革新が開くアーバスキュラー菌根共生研究 —栄養共生機構・生態・ビジネス展望—

江沢辰広
北海道大学大学院農学研究院

キーワード アーバスキュラー菌根菌, 共生, リン酸, 膜輸送体, 分子生態

1. はじめに一植物と菌類の共生—

Mycorrhiza (菌根) とは, ラテン語の菌類を意味する接頭辞 **myco-** とギリシャ語の根 (**rhiza**) から合成された用語で, 真菌類 (糸状菌) と植物根の共生複合体を表す。菌根を形成する菌類を一般に「菌根菌」と呼び, その中でもアーバスキュラー菌根菌 (**arbuscular mycorrhizal fungi**, 以下 **AM 菌** と略す) は, 陸域生態系において最も普遍的に分布する菌根菌である (Smith and Read, 2008)。AM 菌と植物との共生の歴史は古く, およそ 4 億年前のデボン紀の原始的な植物の化石から, 現在と同様の菌根様の構造体が見つかっている (Redecker *et al.*, 2000)。今でも大部分の陸上植物が菌根共生する能力を維持していることや, 分子進化時計から推定される AM 菌の系統発生時期が陸上植物の出現時期と一致している事実は, AM 菌との共生に成功した植物が, 現在の陸上植物の大元の祖先であることを示唆している (Simon *et al.*, 1993)。

2. 大規模塩基配列解読技術がもたらす 共生研究の新展開

菌根共生の成立に必要な宿主植物側の遺伝子群は, 逆遺伝学的アプローチ (共生変異体のスクリーニング) により数多く同定され, それらの多くはマメ科植物における根粒菌の認識に関わるものと共通していることから, **common symbiosis signaling pathway** と呼ばれるよう

になった (Parniske, 2000)。この逆遺伝学の発展を第一次技術革新と位置付けると, 現在の塩基配列解読技術の飛躍的な進歩—いわゆる次世代, 第三世代シーケンサーの登場—は, 生物学全体に強烈なインパクトを与える第二次技術革新と言える。大規模シーケンス技術の進歩がもたらすものは, 研究効率の飛躍的向上だけでなく, 得られるシーケンスリード数が桁違いであることから, これまで証明困難と考えられていた仮説へのアプローチや複雑なメカニズムの解明を可能にすると期待されている。

1) 絶対生体栄養性

AM 菌を大きく特徴付ける性質である絶対生体栄養性とは, 生きた宿主と共生しなければ増殖できないことを言う。ゲノム時代の到来により, その秘密がゲノムを読み解くことで明かされる期待が高まっている。最近, モデル菌株 *Rhizophagus irregularis* DAOM197198 のゲノム情報が公開された (Tisserant *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014)。配列情報の公開後, ゲノムに含まれる遺伝子群の解析が進むと, 脂肪酸の *de novo* 合成を担う細胞質型脂肪酸合成酵素複合体をコードする遺伝子群が欠落していることがわかってきた (Wewer *et al.*, 2014)。脂肪酸は細胞膜やオルガネラ膜脂質などの基本生体成分を構成すると共に, AM 菌においては, 特に炭素貯蔵・輸送形態として必須の化合物であることから, これら遺伝子の欠失が AM 菌の絶対生体栄養性に関わっている可能性が指摘されている。

2) 栄養共生機構の分子基盤

AM 菌は植物への感染が成立すると, 植物からは対価として光合成産物 (主にブドウ糖) の供給を受け (Solaiman and Saito, 1997), それをエネルギー源として土壤中に菌糸のネットワークを構築する。この菌糸ネットワークから吸収されたリン酸は, ポリリン酸と呼ばれるリン酸重合体に変換され, 菌糸内を通じて樹枝状体まで運ばれた後, 再びリン酸に分解されてから放出されると考えられている (Ezawa *et al.*, 2002) (図 1)。AM 菌におけるリン酸供給の分子機構については, 高親和性リン酸輸送体の遺伝子が 1995 年に酵母の相同遺伝子として単離されて以

Tatsuhiro EZAWA: Symbiotic world dominated by soil microorganisms: introduction to the advanced research on symbiosis and their applications to agriculture. 2. The second and third technical innovations open up new aspects of arbuscular mycorrhizal symbiosis: obligate biotrophism, ecology, and business perspective
060-8589 札幌市北区北 9 条西 9 丁目
(tatsu@res.agr.hokudai.ac.jp)
2015 年 10 月 13 日受付・2015 年 11 月 5 日受理
日本土壌肥科学雑誌 第 87 巻 第 1 号 p.64~69 (2016)

来 (Harrison and van Buuren, 1995), ほとんど研究例がなかった。分子解析に必要十分量で、かつ、雑菌汚染のない菌糸材料を得るのが困難であることも理由の一つであった。ところが、次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq の登場により、比較的微量の RNA さえ得られれば、mRNA の網羅的塩基配列決定と発現定量—トランスクリプトーム解析—が非モデル生物においても可能になった。

AM 菌は小さな微生物であるにもかかわらず、圧倒的なバイオマスを持つ宿主植物に対し、その必要とするリン酸の大部分を供給する潜在力を持つ (Smith *et al.*, 2003). それを可能にするのがポリリン酸合成・蓄積能である。ポリリン酸とは無機リン酸が高度に重合した無機高分子で、特に AM 菌のポリリン酸の蓄積速度はポリリン酸超集積細菌に匹敵するほど速く (Ezawa *et al.*, 2004), しかも最大で生体全リンの 60–70 % もの量を蓄積できる (Hijikata *et al.*, 2010). ただ、ポリリン酸の個々のリン酸残基は、それぞれ一つの負電荷を持つことから、ポリリン酸蓄積時の細胞は大量の負電荷を抱えることになり、これを電氣的に中和するメカニズムの存在が予想された。そこで我々は、ポリリン酸蓄積の細胞応答機構を生理および分子レベルで明らかにするために、ポリリン酸蓄積前後における比較トランスクリプトーム解析を行った (Kikuchi *et al.*, 2014). AM 菌の根外菌糸にリン酸を施用すると、瞬時にポリリン酸の蓄積が始まると共に、同調的および等価的な Na^+ , K^+ , Ca^{2+} および Mg^{2+} の吸収が観察されたことから、ポリリン酸の電荷を中和しているのは、主にこれら 4 つのカチオンであると考えられた。この時、リン酸吸収を担う H^+ 共役型および Na^+ 共役型リン酸輸送体とそれらを駆動する H^+ -ATPase および Na^+ -ATPase の遺伝子群、ポリリン酸合成を担う VTC complex の遺伝子群、さらには原形質膜型および液胞膜型の各種カチオン輸送体遺伝子群の迅速かつ組織的な発現上昇が起きていた (図 1). これらの結果は、リン酸吸収プロセス一つをとっても、単純にリン酸取り込

みに関わる遺伝子群だけでなく、細胞の恒常性を保つための多種多様な遺伝子群が動員されるという複雑な制御系が働いていることを意味する。

3) 絶対共生菌に絶対的に共生する細菌・ウイルス

AM 菌の細胞内に細菌様の共生体が存在することは、既に 40 年以上前から知られていたものの、単離培養できないことから、最近までその実態は明らかにされなかった (Bonfante and Anca, 2009). 内生細菌は、少なくとも複数種の AM 菌に存在していることが確認されており、その中でも *Gigaspora margarita* BEG34 の保持する内生細菌の性質が、Bonfante らのグループによりよく調べられている。*Burkholderia* にするこの細菌は、細胞質を介して次世代の胞子に受け継がれるが、単胞子分離を繰り返すと、この内生細菌が極端に少ない、あるいは除去された系統が現れる。この内生細菌不在系統および保持系統の RNA-Seq から、内生細菌が宿主 *G. margarita* の表現形質に及ぼす影響が調べられた (Salvioli *et al.*, 2015). 内生細菌の保持系統では、胞子発芽時の酸化的リン酸化反応に関わる遺伝子群の発現上昇と、それに伴う ATP 量の増加が観察されたことから、この細菌の共生は、エネルギー代謝を亢進することがわかった。さらに、保持系統では膜系や細胞壁キチン合成などの細胞増殖に関わる遺伝子群の発現が高く、事実、胞子形成数は、不在系統の 2 倍であった。この内生細菌が脱落せずに *G. margarita* の細胞内で長く保持され続けてきた事実は、これら表現形質が宿主の生存に有利に働くことを意味している。

現在知られている菌類ウイルスのほとんどは二本鎖 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) をゲノムに持っている。動植物のウイルスとは異なり、菌類ウイルスは細胞外の伝搬経路は持たず (発見されておらず)、その伝搬は細胞質を介して (垂直伝搬か菌糸融合グループ内の水平伝搬) のみ起こることから、オルガネラのような“細胞質遺伝因子”の一つと考えることもできる。一方、細胞増殖の盛んな部位、たとえば菌糸先端や胞子などではウイ

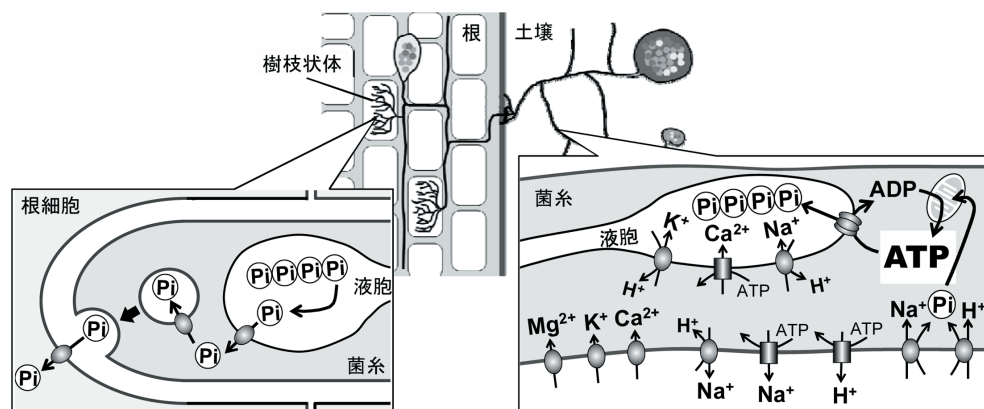


図1 アーバスキュラー菌根におけるリン酸吸収・移行モデル

土壌中の菌糸は、リン酸輸送体を介して吸収したリン酸をポリリン酸として液胞内に蓄積し、樹枝状体まで輸送する。この時、リン酸吸収と同調的、等価的なカチオン吸収も起こる。樹枝状体ではポリリン酸分解により生じたリン酸がゴルジネットワークなどを介して放出され (推定)、植物のリン酸輸送体により根細胞に取り込まれる。

ルスの希釈や脱落が起こる。地熱地帯に自生するパニックグラスというイネ科植物が、特定のウイルスを保持する内生糸状菌（エンドファイト）と共生することで耐熱性を獲得しているという報告（Márquez *et al.*, 2007）をきっかけに、筆者らはAM菌のストレス耐性メカニズムの視点からウイルス探索に着手した。その頃、強酸性土壌から分離したAM菌は、強酸性土壌での植物の生残性を著しく向上させることを見いだしており（Maki *et al.*, 2008）、ウイルスの存在が一次宿主であるAM菌の耐酸性、さらには二次宿主である植物の耐酸性にも関わっている可能性を考えたからである。耐酸性AM菌 *R. clarus* RF1の菌糸から精製したdsRNA画分を電気泳動により分析したところ、サイズの異なる4種類ものウイルス様dsRNAが観察されたことから、常法（ショットガン法）ではなく、次世代シーケンサーRoche 454を用いたウイルスメタゲノム解析を選択した（Ikeda *et al.*, 2012）。このとき配列決定したウイルスの中でも、特に4.8 kbpゲノムを持つものは新規ウイルスであり、存在量も特に多かった。そこで、このウイルスの脱落システムを作製するため、10以上の単孢子分離システムを確立し、ウイルスの存在と表現型の解析を行った。残念ながら、ウイルスの在・不在は、酸性土壌における植物生長促進能にほとんど影響しなかったが、ウイルス脱落システムでは、保持システムの約2倍量の孢子が形成された。内生細菌の例と同様、ウイルスの脱落は比較的容易に起こるのに対し、細胞外経路での伝搬は容易に起こらないことから、*R. clarus* RF1においては、ウイルス保持システムに対して正の選択圧がかかっていると解釈できる。つまり、（内生細菌の例に反して）孢子形成数の半減すら宿主菌の生存に有利、少なくとも不利にはならないことを示唆している（Ikeda *et al.*, 2012）。現在では、さらに大規模な配列解析により、*R. clarus* RF1（日本産）および同種のインドネシア株から10種類にも及ぶ相同ウイルス群が見つかると共に（Suzuki *et al.*, unpublished results）、別種の欧州株からも相同性の高いウイルス群が見つかった（L. Lanfranco and P. Bonfante, pers. comm.）。今後は、これらウイルスとAM菌との共進化やウイルス感染と表現形質との関係の解明が必要である。

4) Baas-Becking 仮説へのアプローチ

近年のシーケンス技術の進歩により、微生物生態学の分野では80年以上前に提唱されたBaas-Becking 仮説（De Wit and Bouvier, 2006）— Everything is everywhere, but environment selects —へのアプローチが活発化している。Baas-Becking は塩水湖に棲息する藻類の生態研究から、微生物の分布は地理的隔離（拡散効率）の影響を受けず、地域環境により一義的に規定されるとの仮説を提唱した。この仮説の検証は、検出が容易な優占種を対象とするだけでは不完全であり、希少種にいたるまでの徹底的な記述が必要であると共に、全球規模で採取した膨大な数のサンプルを解析する必要がある。

単離培養が容易でないAM菌においては、その種構成

を調べるにあたって、早い時期からrDNAの塩基配列をマーカーとした分子生態学的手法が用いられてきた。幸いAM菌の種数は全球レベルでも300種程度と予測されているため（Öpik *et al.*, 2013）、土壤細菌を対象とする場合と比べると、一サンプル当りのシーケンス数は少なくとも比較的深いカバー率が得られる。Davison *et al.* (2015) は、データベースに蓄積されているデータに加え、五大陸にまたがる67サイトから1,014の根サンプルを採取して解析し、検出された合計236種のうち、93%は複数の大陸から、34%はすべての大陸から検出されたことを報告した。これらの結果は、AM菌には地域固有種はほとんど存在せず、全球規模で極めて効率的に拡散していることを示唆しており、Baas-Becking 仮説を強く支持する。一方、気流（風）によるAM菌の拡散は、極めて限定的であるとの報告（Egan *et al.*, 2014）もあり、全球規模でのAM菌の種分布を説明するには、さらに斬新な仮説が必要である。

3. 第三次技術革新

— 絶対生体栄養菌の遺伝子ノックダウン —

AM菌の菌糸には細胞と細胞を隔てる隔壁が無く、「水道ホース」のような細胞壁に包まれた細胞質に複数の核が共存している。このような生物を多核体といい、特にAM菌の一つの孢子には、数百から多いもので二千個もの核が含まれている（Bécard and Pfeffer, 1993）。純粋培養できないこと、および多核体であることは、AM菌における逆遺伝学的アプローチを困難にしている。一方、Nowara *et al.* (2010) は、絶対寄生（生体栄養）性のウドンコ病菌 *Blumeriagraminis* と寄主の相互作用研究において、*B. graminis* の病原性因子をコードする *Avra10* の一部配列を含むdsRNAを寄主細胞に導入すると、*B. graminis* 菌糸内でRNA干渉による *Avra10* の発現低下が起こり、付着器形成が阻害されることを報告した。すなわち、導入されたdsRNAに由来するsiRNA（small interference RNA）が寄主細胞内で生成され、これが付着器形成のために接触してきた *B. graminis* の細胞に移行することで *Avra10* のmRNAに対してRNA干渉を起こしたのである。この方法はhost-induced gene silencing（HIGS）と命名され、絶対寄生・共生生物と宿主との相互作用研究に画期的な技術革新をもたらした。さらにRNA-Seqの普及は、ゲノム情報の無い寄生・共生菌側の遺伝子レパートリーの取得を可能にし、標的遺伝子の絞り込みを容易にした。しかし、この報告以来、菌根共生においてこの手法を使った研究は、現在までのところAM菌の単糖輸送体遺伝子に関する報告（Helber *et al.*, 2011）一例のみであり、HIGSによるノックダウンは容易ではないことをうかがわせる。たとえば、ノックダウン実験の設計段階においては、どの遺伝子を標的にするのか、その遺伝子のどの領域をsiRNAとして発現させるのか、など効果的にノックダウンするためには多くの予備検討が必要である。さらに、siRNAを恒常的に作らせる組換え植物の作出自体に

も長期間を要するため、一つ一つの検討事項に対してそれぞれ組換え体を作るのは非現実的であり、見切り発車せざるを得ない。その意味でHIGSは、かなりギャンプリグなアプローチであるとも言える。

一方、植物遺伝子の迅速な機能解析法として、**virus-induced gene silencing (VIGS)**が確立されている(Lu *et al.*, 2003)。従来は、siRNAを生成する組換え植物を作製することで標的遺伝子のノックダウンを行っていたが、この方法では全身感染性の植物ウイルスに標的遺伝子の一部を組み込んで対象植物に接種し、体内でウイルスが複製する際に標的部分を含んだdsRNAが形成されることを利用してノックダウンする。用いるウイルスベクターの種類によって宿主域が一定範囲内に限られる欠点はあるものの、AM菌に限っては宿主域が極めて広いため、この欠点は障害とならない。さらにVIGSでは、ウイルスベクターのコンストラクトをベンチトップで作れば直ちにノックダウン実験が開始できるため、標的遺伝子のスクリーニングや領域に関して十分な予備検討が行えること、反復個体を多数用意できることなど、多くの利点がある。筆者らのグループでは、Otagaki *et al.* (2006)の開発したキュウリモザイクウイルスベクターを用いた方法により、いくつかのAM菌遺伝子のノックダウンに成功している(Kikuchi *et al.*, unpublished results)。HIGS同様、siRNAが共生菌に移行するメカニズムは不明であるものの、今後、事例を積み重ねて行くことで信頼性を高めれば、VIGSは絶対寄生・共生生物の遺伝子機能解析法のスタンダードになる可能性がある。

4. ビジネス展望

1980から90年代にかけて、世界中でAM菌ビジネスが活発化し、日本においてもバブル期のバイオテックブームに乗って大手メーカーがAM菌資材の生産に乗り出した。しかし、化学肥料多投入型の先進国農業に微生物肥料は馴染まず、その後、国内では多くのメーカーが撤退した。研究者サイドからすれば、AM菌接種源の適切な利用場面や有効活用に向けた土壌管理・栽培法に関する十分な知見をタイムリーに提供できなかった反省がある。しかし、最近、再び世界中でビジネス化に向けた応用研究が活発化している。近年の世界的な景気後退やリン鉱石の高騰などを受けて、ビジネス展開への期待が高まっていることも原因と考えられる。ここ数年は、大学などの公的研究機関からも野外におけるAM菌接種の有効性を示した報告がいくつか出始めている。例えば、欧州におけるマメ・穀物栽培(Pellegrino *et al.*, 2011; Pellegrino and Bedini, 2014)や日本におけるネギ栽培(Tawaraya *et al.*, 2012)、中には*in vitro*毛状根培養系で生産された接種源をコロンビアのキャッサバ栽培に用いて成果を挙げた例も報告されている(Ceballos *et al.*, 2013)。AM菌接種によるリン酸減肥(Tawaraya *et al.*, 2012)あるいは収量増(Ceballos *et al.*, 2013)の収支も試算され、一定の経済効果が期待できる

ことも示されている。

一方、もともとAM菌が常在する農地への接種源導入と比べ、鉱物・土砂採掘の跡地、噴火・土石流災害跡地、道路・ダム建設の際に生じる法面など、表土(≡AM菌自然接種源)が消失した土地の緑化修復では、より確実な接種効果が期待できる。植物の種子と共に植生基盤を斜面に吹き付けて固着させる、いわゆる吹付緑化工法は、吹付層の下が岩盤であっても緑化可能な優れた工法である。しかし、パイライトなどイオウを含む岩盤の上に吹付けた場合、イオウの酸化により生じる硫酸が排水のpHを極端に低下させ、吹付層の植物を枯死させてしまうケースがある。酸性土壌では可溶化するアルミニウムイオンが根の伸長を阻害し、養水分獲得ができなくなることにより生育障害が発生するが(Kochian *et al.*, 2004)、耐酸性AM菌と共生すると、根の伸長は阻害されても菌根経由で養水分獲得ができる(Kawahara and Ezawa, unpublished results)。そこで、民間二社と筆者らでコンソーシアムを形成し、耐酸性AM菌接種源の生産体制構築とAM菌を利用した緑化工法の開発を行った(田中ら, 2010)。日本における緑化工事全体に占める強酸性土壌の出現割合は数%とさほど高くはないものの(堀江氏私信)、事業化達成後数年を経て、大規模な工事現場でも使われ始めている(図2)。

研究者の立場からAM菌のビジネス展開をサポートすることは、研究の活性化のみならず、経済・社会との接点

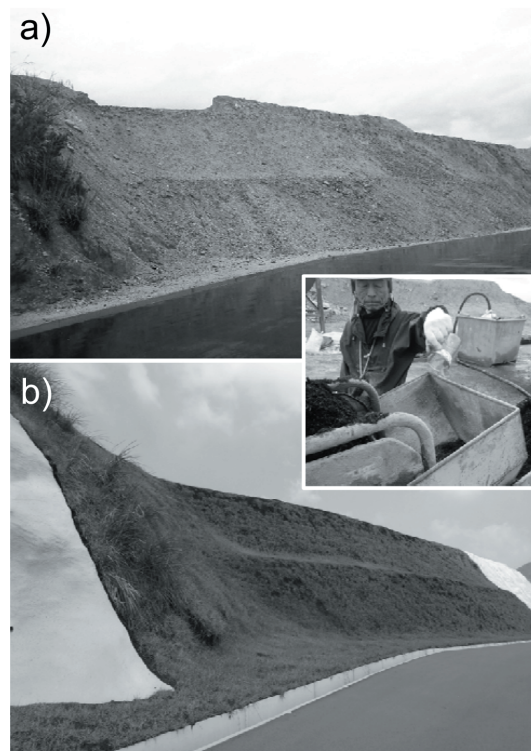


図2 岡山県備前市の鉱山跡地の法面に生成した酸性硫酸塩土壌(a)と菌根菌資材を用いた吹付緑化施工後5か月が経過し、植生が定着した同法面(b)挿入写真は吹付用の植生基材に菌根菌資材を混和する作業(堀江氏提供)。

を明確化する上で極めて意義深い。現在、AM菌ビジネスの成否を握る最も重要な課題は、接種源の安価な生産システムの確立である。ゲノム情報が公開された現在、AM菌の高密度培養や純粋培養へのアプローチが世界各地で活発化しているはずであり、競争力のあるAM菌資材が市場に出回れば、資材の普及を後押しするだけでなく、利用技術の開発も活性化することは間違いない。AM菌の利用場面においては、生態学的視点、例えば種分布と環境との関係や、接種に対する植物およびAM菌群集の反応を解析、さらに予測することが極めて重要である (Rodriguez and Sanders, 2015)。耐酸性AM菌を利用した緑化工法の開発が進んだ背景には、いくつかの生態学上の重要な知見があったことが大きい。たとえば、耐酸性種は中性土壤にも広く分布するジェネラリストであるという知見は (An *et al.*, 2008; Kawahara *et al.*, in submission), 耐酸性種の環境嗜好性は低く、広い土壤環境に適応 (導入) 可能なことを意味している。農地においても、どのような導入種が、どのような群集構成・理化学環境の下で接種効果を発現するのか明らかにする必要がある。対象とする作物の遺伝型もAM菌の接種効果を左右する重要な因子である。多投入型農業に合わせて選抜育種された近代のコムギ品種は、在来種に比べてAM共生に対する生長応答が小さい、あるいはマイナスであることが既に20年以上前に報告されている (Hetrick *et al.*, 1993)。育種学との連携により、AM共生を効果的に利用して養分獲得できる品種の育成が実現すれば、接種資材と組み合わせた新たなビジネス展開も期待できる。

謝辞：本稿で紹介した研究の一部は、科学研究費補助金 (22380042 および 26292034)、科学研究費新学術領域研究「ゲノム支援」により行われた。酸性土壌緑化工法の開発は、ノーステック財団研究開発シーズ育成補助金を受け (江沢)、日特建設 (株) およびセントラル硝子 (株) との共同研究として行った。研究動向の最新情報の収集に当たっては、科学技術振興機構 ACCEL 事業の補助を受けた。

文 献

- An, G.-H., Miyakawa, S., Kawahara, A., Osaki, M., and Ezawa, T. 2008. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi associated with pioneer grass species *Miscanthus sinensis* in acid sulfate soils: Habitat segregation along pH gradients. *Soil Sci. Plant Nutri.*, **54**, 517–528.
- Bécard, G., and Pfeffer, P. E. 1993. Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during *in vitro* development. *Protoplasma*, **174**, 62–68.
- Bonfante, P., and Anca, I.-A. 2009. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: A network of interactions. *Ann. Rev. Microbiol.*, **63**, 363–383.
- Ceballos, I., Ruiz, M., Fernández, C., Peña, R., Rodríguez, A., and Sanders, I. R. 2013. The *in vitro* mass-produced model mycorrhizal fungus, *Rhizophagus irregularis*, significantly increases yields of the globally important food security crop cassava. *PLoS ONE*, **8**, e70633.
- Davison, J., Moora, M., Öpik, M., Adholeya, A., Ainsaar, L., Bå, A., Burla, S., Diedhiou, A. G., Hiiesalu, I., Jairus, T., Johnson, N. C., Kane, A., Koorem, K., Kochar, M., Ndiaye, C., Pärtel, M., Reier, Ü., Saks, Ü., Singh, R., Vasar, M., and Zobel, M. 2015. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science*, **349**, 970–973.
- 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.
- Egan, C., Li, D.-W., Klironomos, J. 2014. Detection of arbuscular mycorrhizal fungal spores in the air across different biomes and ecoregions. *Fungal Ecol.*, **12**, 26–31.
- Ezawa, T., Cavnaro, T. R., Smith, S. E., Smith, F. A., and Ohtomo, R. 2004. Rapid accumulation of polyphosphate in extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus as revealed by histochemistry and a polyphosphate kinase/luciferase system. *New Phytol.*, **161**, 387–392.
- Ezawa, T., Smith, S., and Smith, F. A. 2002. P metabolism and transport in AM fungi. *Plant Soil*, **244**, 221–230.
- Harrison, M. J., and van Buuren, M. L. 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature*, **378**, 626–629.
- Helber, N., Wipfel, K., Sauer, N., Schaarschmidt, S., Hause, B., Requena, N. 2011. A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp. is crucial for the symbiotic relationship with plants. *Plant Cell*, **23**, 3812–3823.
- Hetrick, B. A. D., Wilson, G. W. T., and Cox, T. S. 1993. Mycorrhizal dependence of modern wheat cultivars and ancestors: A synthesis. *Can. J. Bot.*, **71**, 512–518.
- Hijikata, N., Murase, M., Tani, C., Ohtomo, R., Osaki, M., and Ezawa, T. 2010. Polyphosphate has a central role in the rapid and massive accumulation of phosphorus in extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.*, **186**, 285–289.
- Ikeda, Y., Shimura, H., Kitahara, R., Masuta, C., and Ezawa, T. 2012. A novel virus-like double-stranded RNA in an obligate biotroph arbuscular mycorrhizal fungus: A hidden player in mycorrhizal symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **25**, 1005–1012.
- Kikuchi, Y., Hijikata, N., Yokoyama, K., Ohtomo, R., Handa, Y., Kawaguchi, M., Saito, K., and Ezawa, T. 2014. Polyphosphate accumulation is driven by transcriptome alterations that lead to near-synchronous and near-equivalent uptake of inorganic cations in an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.*, **204**, 638–649.
- Kochian, L. V., Hoekenga, O. A., and Pineros, M. A. 2004. How do crop plants tolerate acid soils? – mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Ann. Rev. Plant Biol.*, **55**, 459–493.
- Lin, K., Limpens, E., Zhang, Z., Ivanov, S., Saunders, D. G. O., Mu, D., Pang, E., Cao, H., Cha, H., Lin, T., Zhou, Q., Shang, Y., Li, Y., Sharma, T., van Velzen, R., de Ruijter, N., Aanen, D. K., Win, J., Kamoun, S., Bisseling, T., Geurts, R., and Huang, S. 2014. Single nucleus genome sequencing reveals high similarity among nuclei of an endomycorrhizal fungus. *PLoS Genet.*, **10**, e1004078.
- Lu, R., Martin-Hernandez, A. M., Peart, J. R., Malcuit, I., and Baulcombe, D. C. 2003. Virus-induced gene silencing in

- plants. *Methods*, **30**, 296–303.
- Maki, T., Nomachi, M., Yoshida, S., and Ezawa, T. 2008. Plant symbiotic microorganisms in acid sulfate soil: Significance in the growth of pioneer plants. *Plant Soil*, **310**, 55–65.
- Márquez, L. M., Redman, R. S., Rodriguez, R. J., and Roossinck, M. J. 2007. A virus in a fungus in a plant: Three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science*, **315**, 513–515.
- Nowara, D., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., Ridout, C., Douchkov, D., Hensel, G., Kumlehn, J., and Schweizer, P. 2010. HIGS: Host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *Plant Cell*, **22**, 3130–3141.
- Öpik, M., Zobel, M., Cantero, J., Davison, J., Facelli, J., Hiiesalu, I., Jairus, T., Kalwij, J., Koorem, K., Leal, M., Liira, J., Metsis, M., Neshataeva, V., Paal, J., Phosri, C., Pölme, S., Reier, Ü., Saks, Ü., Schimann, H., Thiéry, O., Vasar, M., and Moora, M. 2013. Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, **23**, 411–430.
- Otagaki, S., Arai, M., Takahashi, A., Goto, K., Hong, J.-S., Masuta, C., and Kanazawa, A. 2006. Rapid induction of transcriptional and post-transcriptional gene silencing using a novel *cucumber mosaic virus* vector. *Plant Biotech.*, **23**, 259–265.
- Parniske, M. 2000. Intracellular accommodation of microbes by plants: A common developmental program for symbiosis and disease? *Curr. Opin. Plant Biol.*, **3**, 320–328.
- Pellegrino, E., Bedini, S. 2014. Enhancing ecosystem services in sustainable agriculture: Biofertilization and biofortification of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.*, **68**, 429–439.
- Pellegrino, E., Bedini, S., Avio, L., Bonari, E., and Giovannetti, M. 2011. Field inoculation effectiveness of native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi in a mediterranean agricultural soil. *Soil Biol. Biochem.*, **43**, 367–376.
- Rodriguez, A., and Sanders, I. R. 2015. The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. *ISME J.*, **9**, 1053–1061.
- Salvioli, A., Ghignone, S., Novero, M., Navazio, L., Venice, F., Bagnaresi, P., and Bonfante, P. 2015. Symbiosis with an endobacterium increases the fitness of a mycorrhizal fungus, raising its bioenergetic potential. *ISME J.*
- 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., and Read, D. J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*: Academic Press, London.
- 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.
- Solaiman, M. D. Z., and Saito, M. 1997. Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New Phytol.*, **136**, 533–538.
- 田中 淳・堀江直樹・江澤辰広・伴 資英. 2010. 耐酸性菌根菌を活用した強酸性法面緑化適用の可能性. 緑工誌, **36**, 119–122.
- 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. Fert. Soil*, **48**, 839–843.
- Tisserant, E., et al. 2013. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 20117–20122.
- Wewer, V., Brands, M., Dörmann, P. 2014. Fatty acid synthesis and lipid metabolism in the obligate biotrophic fungus *Rhizophagus irregularis* during mycorrhization of *Lotus japonicus*. *Plant J.*, **79**, 398–412.