

博士論文

シオガマギク属寄生植物とアーバスキュラー菌根菌を含む
多種共生系の研究

川井 友裕

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科

バイオサイエンス領域 植物共生学研究室

(吉田 聡子教授)

提出 令和 5 年 3 月 17 日

目次

1. 略語一覧.....	3
2. 序論.....	4
2-1. 植物共生真菌・アーバスキュラー菌根菌の生理生態と共生機構	4
2-1-1. 植物と菌根菌の共生関係	4
2-1-2. AM 共生の成立過程	5
2-1-3. 一部の植物における AM 共生能の喪失.....	8
2-2. 寄生植物の生理生態.....	10
2-2-1. 寄生植物.....	10
2-2-2. 寄生植物の生活環.....	11
2-3. ハマウツボ科寄生植物の進化及び AM 共生.....	13
2-3-1. ハマウツボ科寄生植物の進化.....	13
2-3-2. AM 菌と関係を持つハマウツボ科寄生植物・シオガマギク属.....	14
2-4. 本研究の概要.....	16
3. 材料と方法	17
3-1. 植物の根内生真菌類の菌叢解析.....	17
3-2. 室内実験に用いた植物の発芽.....	19
3-3. 環境ストレス条件における AM 菌の接種試験.....	20
3-4. 宿主植物由来の AM 菌感染促進因子を特定するための AM 菌感染実験	22
3-5. 植物根内の AM 菌の染色及び顕微鏡観察	24
3-6. 植物根からの RNA 抽出	25
3-7. 植物及び AM 菌の遺伝子発現解析.....	26
3-8. 植物体のバイオマスの測定.....	27
3-9. 植物体のリン含有量の測定.....	28
3-10. 内生真菌類の単離と同定.....	28
3-11. 内生真菌類の再接種試験.....	30
4. 結果.....	32
4-1. 野外で採取したシオガマギク属植物の根内菌叢の網羅的解析	32
4-1-1. 野外で採取した植物の根内菌叢における真菌系統の組成.....	32
4-1-2. 野外で採取した植物の根内菌叢における生態学的機能の組成	34
4-1-3. 野外で採取した植物の根内菌叢構造の植物種及び山域ごとの比較.....	34

4-2.室内実験によるシオガマギク属の AM 菌の感染促進条件の探索	36
4-3. 室内実験においてシオガマギク属の根に感染した AM 菌の表現型の詳細な観察	38
4-4. 室内実験における宿主植物によるシオガマギク属の AM 菌感染促進機構の推定	39
4-4-1. 宿主植物によるシオガマギク属の AM 菌感染促進機構の仮説.....	39
4-4-2. 仮説 (1) 宿主植物との根の連結を介した感染機構の検証.....	39
4-4-3. 仮説 (2) 宿主植物の根滲出液の成分を介した感染機構の検証	40
4-4-4. 仮説 (3) 宿主植物と共生状態にある AM 菌による感染機構の検証	41
4-5. 室内実験におけるシオガマギク属と AM 菌の共生関連遺伝子群の発現動態...22	
4-6. 室内実験におけるシオガマギク属の生育に対する AM 菌の接種効果.....44	
4-7. 野外の土壌を用いたシオガマギク属の内生真菌の単離と同定	46
4-8. 室内実験におけるシオガマギク属に対する単離真菌の接種及び AM 菌との共接種の効果.....47	
5. 考察.....	49
5-1. AM 菌と特定の真菌類によるシオガマギク属の生長促進.....	49
5-2. 宿主植物によるシオガマギク属の AM 菌感染促進機構	52
5-3. シオガマギク属の根における AM 菌の菌糸侵入の様式	54
5-4. シオガマギク属への AM 菌感染の分子機構.....	56
5-5. シオガマギク属の AM 菌感染機構の特徴	58
5-6. シオガマギク属における AM 菌感染と環境ストレスとの関係.....	59
5-7. 高山環境におけるシオガマギク属と菌根菌.....	60
6. 総括.....	62
6-1. 本研究で得られた成果.....	62
6-2. 今後の課題	63
6-3. 本研究の意義.....	63
7. 図表.....	64
8. 参考文献.....	125
9. 謝辞.....	137

1. 略語一覽

AM: arbuscular mycorrhizal
AMT: ammonium transporter
BAS: branched absorbing structures
cDNA: complementary DNA
CO: chitooligosaccharide
CSSP: common symbiotic signaling pathway
CFW: calcofluor white
GFP: green florescent protein
HIF: haustorium inducing factor
ITS: internal transcribed spacer
LCO: lipochitooligosaccharide
mRNA: messenger RNA
MMN: modified melin-norkrans
MST: monosaccharide transporter
Myc-LCO: mycorrhizal LCO
Nod factor: nodulation factor
OTU: operational taxonomic unit
PAM: periarbuscular membrane
PBS: phosphate-buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
PI: propidium iodide
PPA: prepenetration apparatus
PT: phosphate transporter
RNA-seq: RNA-sequencing
rRNA: ribosomal RNA
RT-qPCR: reverse transcription quantitative PCR
SE: standard error
SL: strigolactone
TAE: tris-acetate-EDTA
WGA: wheat germ agglutinin

2. 序論

2-1. 植物共生真菌・アーバスキュラー菌根菌の生理生態と共生機構

2-1-1. 植物と菌根菌の共生関係

植物は動物とは異なり、その場に一度定着すると移動できないため、生息環境の悪化から逃れることができない。そこで、植物は様々な環境適応能力を獲得している。その一つとして、環境中の微生物との相互作用を通じた環境適応能力が挙げられる。多くの植物は特定の細菌や真菌と共生関係を築くことで、生長に必要な不可欠な栄養を獲得している。特に、真菌類と植物根が緊密に結合して一体となった共生体を菌根 (mycorrhiza) と呼ぶ¹。菌根は、その構造から、アーバスキュラー菌根 (arbuscular mycorrhizal: AM)、外生菌根、内外生菌根、アルブトイド菌根、モノトロポイド菌根、エリコイド菌根、ラン菌根の大きく 7 種類に分類される²。そして、これらの菌根を形成して植物と共生関係を結ぶ真菌類を総称して菌根菌という。9 割以上の陸上植物が何らかの菌根菌と共生していることが知られており¹、菌根共生は自然界の植物において普遍的な現象であると言える。

アーバスキュラー菌根 (AM) 菌は、グロムス門 (Glomeromycota) に属する 150 種程度の真菌類の総称で、陸上に生息する 7-8 割程度の植物種はこの AM 菌と共生関係を結ぶことが推定されている^{3,4}。土壌中に広く存在する AM 菌は、菌糸を植物根の中に侵入させ、皮層細胞において菌糸を密に分岐させた樹枝状体 (arbuscule) と呼ばれる特徴的な共生器官を形成する (図 1)。この樹枝状体において、AM 菌は土壌中から吸収したリンや窒素などの無機栄養を植物に供給し、植物から光合成産物由来の炭素源を受け取る栄養交換を行う (図 1)。AM 菌は土壌中に菌糸を伸ばすことで、植物根の吸収できない範囲にある無機栄養を吸収して植物に供給し、生長を促進する。特に、AM 共生は、植物の生長に必須であるリンの獲得において非常に重要な役割を果たしている。実

際、イネ (*Oryza sativa*) の獲得したリンのうち 70% 程が AM 菌から供給されたものであったという実験結果の報告もある⁵。また、AM 共生は、植物の生長促進効果だけでなく、病原微生物への抵抗性の上昇や^{6,7,8}、水分供給による乾燥耐性の向上などにも効果があることが知られている^{9,10}。これらの性質を活かし、AM 菌を農業用資材として利用する例もある。植物と AM 菌の共生の仕組みの解明は、化学肥料や農薬を用いない農作物の栽培を通じた持続可能な農業の実現に貢献することが期待されている。

2-1-2. AM 共生の成立過程

植物はその生活環において AM 菌との共生が必須ではない一方、AM 菌は植物根と共生しないと次世代胞子を形成しない、絶対共生菌である。AM 菌はほとんどの菌糸や胞子に隔壁を欠くため、明確な細胞を定義できず、連続した細胞質に数千もの核を含む多核体である¹¹。また、現在のところ AM 菌の生活環において有性生殖は確認されていない。これらのユニークな性質から、AM 菌において伝統的な遺伝学的手法は不適であり、安定的な形質転換体の作製も現在まで成功していない¹²。このように AM 菌に関する研究には困難な点が多いものの、宿主植物と共生を確立させ、次世代胞子を形成するまでの AM 菌の生活環の仕組みは、この十数年間で少しずつ解明されてきている (図 2)。AM 菌は非共生状態では胞子中に蓄えられた脂質をエネルギー源として利用して菌糸を土壌中にランダムに伸ばし、植物根を探索する¹³。AM 菌の菌糸は、植物が根の周囲の土壌中に分泌したストリゴラクトン (Strigolactone: SL) 類を受容すると菌糸分岐が促進され、植物根と出会うやすくなる (図 2)。SL はストリゴール (strigol) をはじめとする類似構造を持つセスキテルペンラクトン類の総称であるが (図 3)、当初は、他の植物の根に侵入して栄養を獲得して生長する根寄生植物の種子発芽を誘導する物質として発見された¹⁴。しかし、その後、AM 菌の菌糸分岐を誘導するシグナル分子としての機能と¹⁵、植物自身のシュート分枝を抑制するなどの植物ホルモンとしての機能

があることが明らかにされた^{16,17}。すなわち、SLは植物が栄養欠乏状態に陥った時に自身の生長を抑えて栄養を節約しつつ、より多くの栄養を獲得するための共生菌を誘引するために土壤中に分泌するシグナル分子なのである。また、いくつかの植物種が根から分泌するフラボノイド (Flavonoid) の一種であるケルセチン (quercetin) やケルシトリン (quercitrin) も AM 共生の促進効果が報告されており¹⁸、具体的なメカニズムは未解明であるが、フラボノイド類も AM 菌に対するシグナルに関与している可能性も考えられている。

AM 菌から植物へのシグナル分子についても、いくつかの報告がなされている。まず、窒素固定共生細菌である根粒菌からマメ科 (Fabaceae) 植物へのシグナル分子である nodulation factor (Nod factor) と非常に良く似た構造を持つリポキトオリゴ糖 (lipochitooligosaccharide: LCO) が、AM 菌の共生前の発芽胞子の浸出液中から精製・単離された¹⁹。これは Nod factor と区別するために mycorrhizal factor-LCO (Myc-LCO) と呼ばれており、Nod factor と同様に植物細胞内で共生応答に必要な Ca^{2+} の周期的な濃度変化である Ca^{2+} スパイクングを誘導することが示されている²⁰。また、同様に AM 菌が生成する短鎖オリゴ糖 (short-chain chitooligosaccharide: short-chain CO) も Ca^{2+} スパイクングを誘導することが示された²¹。これらの結果から、Myc-LCO や short-chain CO と SL を介した共生前の AM 菌と植物の間のシグナルコミュニケーションは、AM 共生の確立において重要な役割を担っていると考えられる²²。こうした AM 菌由来のシグナルは植物の根の表皮細胞の細胞膜表面に存在する受容体様キナーゼ Chitin Elicitor Receptor Kinase 1 (CERK1) 及び、その共受容体 Myc Factor Receptor 1 (MYR1) によって認識され²³、 Ca^{2+} スパイクングを介した共生シグナルの伝達が起きると考えられている。そのシグナルを受けて、植物は AM 菌との共生プログラムを発動し、菌糸の生体内への侵入を受け入れる²⁴。なお、この Ca^{2+} スパイクングを介したシグナル伝達経路に関与する遺伝子群は菌根共生及び根粒共生で多くが共通しているために、共通共

生シグナル経路 (common symbiotic signaling pathway: CSSP) と呼ばれ、AM 共生あるいは根粒共生を行う植物に広く保存されている (図 4)²⁴。AM 菌は菌糸が植物根に接触すると、根の表皮に菌足 (付着器 (hyphopodium) と呼ばれる) を形成して根の中に侵入する (図 2)。この過程で植物は、菌糸が通過するためのスペースであり、菌糸をガイドする機能を持つと考えられる prepenetration apparatus (PPA) を表皮細胞内に形成する²²。PPA を通って菌糸が根の表皮細胞の内側にある皮層細胞まで侵入すると、AM 菌は内生菌糸を密に分岐させ、植物と協調的に樹枝状体を形成する (図 2)。樹枝状体は、periarbuscular membrane (PAM) という植物細胞膜に囲まれており、樹枝状体の生体膜と PAM を横切って存在するリン酸輸送体や単糖輸送体など多くの輸送体によって、AM 菌と植物の間で栄養や物質が交換されている²⁵。非共生状態の AM 菌の菌糸はランダムに伸長するのに対して、AM 菌が共生状態になると植物根の外側でも特異的な外生菌糸を形成する。この外生菌糸は直線的で太い runner hyphae と runner hyphae から数回分岐した branched absorbing structures (BAS) から構成される²⁶。共生が進行すると最終的に BAS の先端に次世代胞子を形成して、世代交代する。絶対共生菌である AM 菌は、土壌中では植物との共生が成立した場合にのみ次世代胞子を形成するため、非共生状態から共生状態への移行は AM 菌の生活環において重要な発生段階である。

AM は形成される樹枝状体の形態に基づいて 2 つのサブタイプに分けられ、それぞれアラム型 (Arum-type)、パリス型 (Paris-type) と呼ばれている²⁷。アラム型では、表皮細胞に侵入した菌糸がわずかにコイルを形成した後、皮層の細胞間隙に菌糸を伸ばしつつ、分岐した菌糸を周囲の細胞に侵入させて樹枝状体を形成する。そのため、菌根の広がる速度が比較的速い。これに対し、パリス型は皮層の細胞間隙に菌糸を伸ばすことはせず、侵入した細胞内でコイルを形成した後に、細胞間を貫いて隣の細胞へと菌糸が侵入する。このタイプは菌根の発達が遅い。これらの AM のタイプの違いは植物種に依存することが知られ、マメ科のミヤコグサ (*Lotus japonicus*) やイネ科のイネ (*Oryza*

sativa) ではアラム型が、リンドウ科のトルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum*) ではパリ
ス型が形成される²⁸。

2-1-3. 一部の植物における AM 共生能の喪失

AM 共生の起源は非常に古く、4 億年以上前の祖先陸上植物 *Aglaophyton major* の化石においても樹枝状体様構造が見られることから、AM 共生の起源はデボン紀まで遡ると推測される^{29,30,31}。AM 菌は無機栄養や水分の供給を通して祖先植物の陸上進出を助けた可能性も考えられている^{29,30,31}。また、AM 共生に関連する遺伝子の多くは、コケ植物から維管束植物に至るまで陸上植物全般に保存されていることが明らかにされている。具体的には、CSSP 中のシグナル伝達関連遺伝子 (*CCaMK*、*CYCLOPS*) や、転写因子の遺伝子 (*RADI*、*RAM1*、*WRI*)、SL 生合成関連遺伝子 (*CCD8*、*MAX1*)、脂肪酸生合成遺伝子 (*RAM2*、*FatM*) などがコケ植物であるフタバネゼニゴケ (*Marchantia paleacea*) のゲノムにも存在することが報告されている (図 4)^{32,33}。そして、フタバネゼニゴケにおいても、生体内で生合成された SL が AM 菌に対するシグナル分子として機能することや、脂質が AM 菌に供給されることも示されている^{32,33}。これらのことから、AM 共生は植物の陸上進出以後から続く、重要な共生システムであると考えられる。

一方、野生の植物個体の観察報告などから、2-3 割程度の陸上植物種は AM 菌と共生していないと推定されている³⁴。AM 菌と共生しない植物には、AM 菌以外の生物を共生体として利用するものや、AM 菌が生息できない特殊な環境に自生するものが多い³⁴。AM 菌以外の生物と共生する植物としては、土壤中の腐生菌である *Rhizoctonia* 属と共生するハクサンチドリ (*Dactylorhiza aristata*) のようなラン科 (*Orchidaceae*) 植物や³⁴、ベニタケ目 (*Russulales*) の外生菌根菌と共生するツツジ科 (*Ericaceae*) のギンリョウソウ (*Monotropastrum humile*) のような菌従属栄養植物など³⁵、AM 菌以外の真

菌類と共生するものが挙げられる。また、他の植物に寄生して生長する寄生植物や、昆虫を捕らえてエネルギー源とすることで生長する食虫植物も多くは AM 菌とは共生しない^{3,4}。植物は AM 菌に対して光合成産物に由来する糖や脂質などの炭素源を与えており、植物が光合成により生産した炭素源のうち約 20% が AM 菌へ供給されているとする研究もある³⁶。菌従属栄養植物や寄生植物、食虫植物はそれぞれ効率的に栄養を獲得するための特殊な仕組みを発達させているので、エネルギーを費やさねばならない AM 菌との共生はしない方が適応的であると考えられる。AM 菌の生存が厳しかったり、存在密度が著しく低かったりするような特殊な環境に自生する植物としては、海藻や浮草、湿地性植物のように海や河川、湿地などの水場に生える植物や^{3,4,37}、樹木や岩場に張り付いて生長する着生植物がある^{3,4}。また、砂漠や周北極地方、高山などの厳しい環境に自生する植物も AM 菌と共生していないことが多い^{3,4}。また、アブラナ科 (Brassicaceae) やヒユ科 (Amaranthaceae)、タデ科 (Polygonaceae)、カヤツリグサ科 (Cyperaceae) など特定の科に属する植物は AM 菌と共生しないことが報告されている³⁷。通常、植物は土壌中の有機態リン酸を直接吸収することはできないが、これらの科に属する植物はクエン酸などの有機酸を分泌して有機態リン酸からリン酸イオンを生じさせたり、ホスファターゼを分泌して有機態リン酸から無機リン酸を生じさせたりするといった、土壌中のリンを効率よく吸収する機構を有しており、AM 菌と共生しなくても効率よく無機栄養を吸収できることが明らかになっている³⁷。また、アブラナ科のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の根から生長促進真菌 *Colletotrichum tofieldiae* が発見されており³⁸、アブラナ科植物は特定の真菌類と共生関係を構築していることも示唆されている。これまでに述べたような AM 菌と共生しない植物系統は、比較ゲノム解析の結果から、AM 共生に必須な遺伝子の多くを喪失したことが報告されており、共生機構を遺伝子レベルで失っていることが分かってきている^{39,40}。ただし、実験室環境下であるが、シロイヌナズナの根においてごくわずかに AM 菌の感染が観察された

とする報告も存在する^{41,42,43}。同様にタデ科においても、富士山に自生するイタドリ (*Fallopia japonica*) の根において AM 菌の感染が観察されたとする報告例があるなど⁴⁴、従来の定説と野外の植物における菌根共生の実態が一致しない例も近年報告されている。ただし、AM 菌の感染によって、このような AM 共生関連遺伝子を持たない植物種の生長がどのような影響を受けるかよく分かっていない。

2-2. 寄生植物の生理生態

2-2-1. 寄生植物

他の植物の組織に侵入し、その相手の植物と維管束系を繋げて水や栄養分を奪って生長する植物を寄生植物と呼ぶ⁴⁵。ヤドリギ (*Viscum album*) やネナシカズラ (*Cuscuta japonica*) のように植物の茎に寄生する茎寄生植物と、ヤセウツボ (*Orobanche minor*) やナンバンギセル (*Aeginetia indica*) のように植物の根に寄生する根寄生植物がある。寄生植物は全被子植物のうち 1.2% に相当する 4,530 種が複数の科にまたがって存在し⁴⁶、被子植物の進化の過程で少なくとも 12 回の独立した進化によって生じたと考えられている⁴⁷。これらの寄生植物には生活環の宿主植物への依存度により、独立栄養でも育つことができる条件的寄生植物 (facultative parasitic plant) と、宿主植物なしでは生活環を回すことのできない絶対寄生植物 (obligate parasitic plant) に分けられる⁴⁶。さらに、絶対寄生植物には、光合成能を保持している半寄生植物 (hemiparasitic plant) と、光合成能を喪失した全寄生植物 (holoparasitic plant) がある⁴⁶。

寄生植物に寄生された宿主植物は、栄養を奪われてしまうので、多くの場合生育阻害が生じる。寄生植物の中には穀物や野菜などの農作物に寄生して収量を大幅に減じることで、世界的に深刻な農業被害を引き起こしているものが存在する。例えば、「魔女の雑草 (witch weed)」とも呼ばれるストライガ属 (*Striga*) 植物は、ソルガム (*Sorghum bicolor*) やトウモロコシ (*Zea mays*)、イネなどの重要な穀物に寄生し、アフリカ大陸の

発展途上国を中心に 1 年で 10 億ドルにも及ぶ莫大な被害を出していると言われる⁴⁸。ストライガのような寄生植物は、宿主植物に接着して育つため除草剤などの使用が難しいこと、種子サイズが 200 μm 以下と非常に小さく、また一個体あたり約 10 万個もの種子をつけるため土壌からの種子の除去がほぼ不可能であること、その種子は風に乗って容易に拡散するが、土壌中で数十年も休眠可能であることなどが理由となり、有効な駆除方法は確立されていない^{45,48}。そのため、一度これらの寄生植物の種子に汚染された農地は数十年にわたって被害が継続し、被害地域が広がる一方である⁴⁸。このような農業被害を撲滅するべく、実際に農業被害を引き起こしている寄生植物種を対象に生態学・生理学・遺伝学など様々な分野で研究が行われている。

2-2-2. 寄生植物の生活環

寄生植物はその一生の大部分で宿主植物に依存した生活を送ることになるため、非常に巧みな寄生戦略を獲得している。条件的寄生植物の種子は独立栄養の植物と同様に気温や水分、光といった環境条件で発芽するが、絶対寄生植物は宿主植物に寄生しないと生存できないため、宿主植物由来のシグナルを認識することにより種子の発芽が誘導されるという仕組みを有する (図 5)。ハマウツボ科絶対根寄生植物の場合、この宿主植物由来のシグナル分子は SL 類であることが明らかにされている (図 3)^{14,15}。絶対根寄生植物の SL 感受性は非常に高く、例えば、SL の一種であるストリゴールは約 3×10^{-11} M という非常に低濃度でストライガの種子の発芽を誘導する¹⁴。根寄生植物は、発芽後に吸器 (haustorium) と呼ばれる器官を根に形成して宿主の根への侵入を開始する (図 5)。吸器の形成は SL とは異なる宿主由来シグナルの認識によって誘導されることが知られており、1986 年に吸器形成を誘導する物質 (haustorium inducing factor: HIF) として 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (DMBQ) が単離された⁴⁹。その後の研究により、HIF は植物の細胞壁を構成するリグニン (lignin) に由来することが示唆されてい

る⁵⁰。ハマウツボ科の根寄生植物はこれらの HIF を認識した後、表皮細胞でオーキシン (auxin) の合成を活性化させることで細胞分裂を促進し、こぶ状の吸器をつくり始める⁵¹。その後、吸器原基の表面に多数発生した根毛状の細胞 (吸器毛) が宿主の根を捉え、吸器が宿主の根を突き破って侵入する⁵²。最終的に、寄生植物は吸器を介して自らの維管束と宿主の維管束を連結することで寄生を確立する⁵²。一方、茎寄生植物であるネナシカズラは、土壌で発芽すると素早く茎を伸ばし、回施點頭運動を行いながら宿主植物を探す⁵³。そして、茎が宿主の茎に接触すると宿主に絡みつき、吸器を形成して宿主の茎に侵入することで寄生することが知られている⁵³。

このようにして形成された吸器を通じて、寄生植物と宿主植物の間では様々な物質が輸送されている。最も主要な輸送物質は、光合成産物や無機栄養などを含む栄養と水である。宿主と維管束がつながっているために寄生植物は栄養を直接大量に奪い取ることができる。実際、条件的寄生植物のコシオガマ (*Phtheirospermum japonicum*) は寄生せずとも生長が可能であるが、寄生した場合の方が寄生しなかった場合よりも同じ期間でより大きく生長できる。一方、寄生された宿主植物は生育が阻害される。栄養以外にも、宿主において発現させた緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP) をフェリパンキ (*Phelipanche aegyptiata*) が吸器を通じて取り込んでいる様子が確認されるなど⁵⁴、タンパク質やウイルスも輸送されていることが知られている⁵⁵。ネナシカズラでは、宿主の持つ除草剤耐性タンパク質の伝播によって、除草剤耐性を獲得したという研究例もあり⁵⁶、宿主のタンパク質の獲得が寄生植物の生存や生長に有利に働く可能性も指摘されている。さらに、ネナシカズラ属植物では、宿主のシロイヌナズナから伝令 RNA (messenger RNA: mRNA) を取り込んだり⁵⁷、逆に送り込んだりしていること⁵⁵、宿主に micro RNA を送り込んで、宿主の遺伝子発現に干渉していることなども確認されている⁵⁷。輸送される micro RNA の一部は、宿主の免疫機構をターゲットとしており、寄生植物が宿主の免疫反応を制御することで効率的に寄生を成立させていることが示唆さ

れている⁵⁸。また、コシオガマが宿主のシロイヌナズナに植物ホルモンの一種であるサイトカイニン (cytokinin) を送り込んで、宿主の根を肥大化させるといった現象も報告されており⁵⁹、寄生植物は物質輸送を通して宿主を制御することが示されている。

2-3. ハマウツボ科寄生植物の進化及び AM 共生

2-3-1. ハマウツボ科寄生植物の進化

ハマウツボ科 (Orobanchaceae) は、約 90 属からなり、*Lindenbergia* 属や *Rehmannia* 属など一部の属を除く全ての種が根寄生植物であり、独立栄養植物、条件的寄生植物、絶対半寄生植物及び、絶対全寄生植物の全ての寄生レベルが揃っているというユニークな特徴を持つ (図 6)^{45,46}。また、ハマウツボ科の分子系統樹では *Lindenbergia* 属などの独立栄養植物群が基部に位置し、寄生植物種は単系統に収束するため、寄生能力の獲得は一度の進化で起こったと推定されている^{60,61}。分子系統解析によると、ハマウツボ科に属する植物は大きく 6 つのクレードに分かれる。クレード 1 は独立栄養植物である属で構成され、他の寄生植物のみからなる 5 つのクレードのうち 3 つは光合成能を失った絶対全寄生植物を含む⁶¹。異なるクレードで独立に絶対寄生植物が出現していることから、条件的寄生植物から絶対寄生植物への進化は独立に複数回起こったことが示唆されている⁴⁵。これらの特徴を持つハマウツボ科は、寄生能の獲得と、独立栄養から従属栄養生活への移行の進化を解析する材料として最適である。

実際、ハマウツボ科を対象とする進化生物学的研究により、寄生植物の進化に関する様々な知見が得られ始めている。葉緑体ゲノムのシーケンス解析では、寄生植物、特に光合成能を欠損している全寄生植物において、ゲノムサイズが小さくなっていることが明らかになっている⁶²。寄生植物と宿主の間で遺伝子の水平伝播が起きている証拠も確認されており、双子葉植物であるハマウツボ科寄生植物 *Striga hermonthica* のゲノム中の遺伝子コード領域に、宿主であり単子葉植物であるソルガムのゲノムと非常に酷似

した領域が存在することが明らかになっている⁶³。吸器を介して RNA の輸送が観察されているので、寄生植物のゲノムはこのような RNA の逆転写の過程を経て獲得していることが推察されている⁵⁵。フェリパンキの一種 *Phelipanche aegyptiaca* のゲノムは宿主のマメ科植物からアルブミン遺伝子 (*ALBUMIN 1*) を⁶⁴、オロバンキ属の *Orobanchae aegyptiaca* のゲノムは宿主のアブラナ科植物からストリクトシジン生合成遺伝子 (*STRICTOSIDINE SYNTHASE-LIKE GENE*) を獲得しているなど⁶⁵、獲得した遺伝子が寄生植物の生長時や寄生時に有利に働くことが示唆される例もある。ストライガ属やオロバンキ属 (*Orobanchae*) などのハマウツボ科根寄生植物において、発芽時に宿主由来の SL を認識する SL 受容体として Karikin-Insensitive (KAI) 2d が同定されている⁶⁶。ハマウツボ科根寄生植物の KAI2d は、植物体の燃焼時に発生する煙の中に含まれる被子植物の発芽誘導物質・カリキン (karikin) 受容体 (KAI2) の祖先型遺伝子の進化によって生じたもので、KAI2d の獲得により宿主植物由来の SL に反応して発芽する機構を手に入れたと考えられている⁶⁶。寄生植物の KAI2d は、他の被子植物が植物ホルモンとして SL を認識する受容体 (Dwarf 14: D14) とは収斂進化の関係にあることが報告されている⁶⁶。

2-3-2. AM 菌と関係を持つハマウツボ科寄生植物・シオガマギク属

シオガマギク属 (*Pedicularis*) は、ハマウツボ科の属の一つで、周北極地方や山岳地域などの北半球の寒冷地域に広く分布し、世界で 800 種程が記載されている⁶⁷。日本においても高山や高原などに 15 種が自生しており^{68,69}、そのほとんどの種は高山植物(高木の生長限界である森林限界より高標高の場所に生える植物)として知られる(図 7)。シオガマギク属は条件的半寄生植物であり⁷⁰、光合成能を保持し、独立栄養でも生きることができるが、周囲に植物が存在するときには寄生しながら生長する。寄生植物は菌根菌と共生しないとされてきたが³⁴、2007 年及び 2008 年に Ai Rong Li らのグループ

が中国に自生するシオガマギク属植物の根において AM 菌などの真菌類の感染を観察し、複数のシオガマギク属植物種において AM 菌の感染が確認されたことを報告している^{71,72}。著者らも、日本列島各地のシオガマギク属の自生個体の根を採取して菌糸を染色し、顕微鏡下で観察を行い、AM 菌の感染が日本の野外のシオガマギク属においても見られることを確認している (図 8)⁷³。日本に自生するシオガマギク属では過半数の植物種において AM 菌の感染が確認され、シオガマギク属全般的に AM 菌と関係を持つことが分かった (図 9)。また、検出された AM 菌の分子系統解析の結果から、日本のシオガマギク属植物種には Glomerales 目の *Rhizophagus* 及び *Glomus* の 2 属の AM 菌が感染していることが明らかになった⁷³。その一方、シオガマギク属以外のハマウツボ科寄生植物種の野外の自生個体では AM 菌の感染を観察することができなかった (図 8)。これらの野生個体の調査結果から、シオガマギク属は寄生能と AM 菌との関係の両方を併せ持つ進化的にユニークな寄生植物系統と言える。そして、ハマウツボ科の基部に位置する独立栄養植物である *Lindenbergia* 属は AM 菌と共生することが確かめられていることから^{39,74}、シオガマギク属を含むハマウツボ科は AM 菌との共生能の喪失過程を追跡することができる系でもあり (図 6)、植物における形質の喪失過程の解明といった進化生物学的研究にも役立つ材料と考えられる。

シオガマギク属は極域・高山という特殊環境に自生する寄生植物であることから、栽培・実験が容易ではなく、実験室レベルでの菌根共生に関する研究例は多くない。中国に自生するシオガマギク属植物 2 種 (*Pedicularis rex* 及び *P. tricolor*) を用いて圃場環境下で行われた AM 菌接種試験では、両種における AM 菌の感染量が低い傾向であったことや AM 菌が供給したと推定されるリン量がごくわずかであったことから、シオガマギク属植物と AM 菌は共生関係にはない可能性が考えられている⁷⁵。しかし、これらの実験は限られた条件下で行われており、AM 菌の感染がシオガマギク属の生存や生長に与える実際の影響は十分に評価しきれていないと考えられる。すなわち、他の

植物における共生システムと同様にシオガマギク属と AM 菌が相利共生の関係にあるか、極域・高山のような特殊環境下でシオガマギク属の生長に AM 菌の感染が貢献しているかなど、両者の関係性を明らかにすることは課題として残されている。

ストライガやオロバンキなどのハマウツボ科絶対寄生植物は、AM 共生する植物種との比較ゲノム解析によって、AM 共生に必須な遺伝子群の多くを喪失したことが推定されている³⁹。さらに、所属研究室において、シオガマギク属の一種 *P. kansuensis* の全ゲノムシーケンスを実施して他の寄生植物種を含めて比較ゲノム解析を行った結果、シオガマギク属のゲノムにおいても AM 共生に必須な遺伝子群のほとんどが保存されていないことが明らかになったことから、シオガマギク属も AM 共生関連遺伝子群の多くを喪失したことが示唆された (Kee Yee Jia et al., unpublished)。そのため、シオガマギク属における AM 菌の感染経路は多くの植物に共通する AM 共生機構のものとは異なる可能性が推定されたが、その詳細な感染機序や感染の分子機構は未解明である。

2-4. 本研究の概要

本研究では、ハマウツボ科シオガマギク属寄生植物における AM 菌の感染機構及び、感染の生理学的意義の解明を目的とする。様々な環境条件の設定下における AM 菌接種試験によって、AM 菌と共生している植物の共存条件下でシオガマギク属における AM 菌の感染が促進されることを明らかにした。また、顕微鏡を用いた AM 菌の感染機序の詳細な観察や、AM 菌感染時における遺伝子発現解析により、シオガマギク属における AM 菌感染様式の理解を深めた。さらに、AM 菌の接種がシオガマギク属の生長に及ぼす影響や AM 菌以外の内生真菌類との関連を調査し、AM 菌と内生真菌の共存がシオガマギク属の生長を促進することを発見した。本研究では、AM 共生の分子基盤をもたないシオガマギク属寄生植物が、宿主植物や植物内生真菌から成る多種共生系の中で AM 菌との相互作用を成立させる仕組みとその意義を明らかにした。

3. 材料と方法

3-1. 植物の根内生真菌類の菌叢解析

日本列島各地の自生地からシオガマギク属植物 3 種(ミヤマシオガマ (*P. apodochila*), ヨツバシオガマ (*P. chamissonis*), タカネシオガマ (*P. verticillata*)) 及び、シオガマギク属と同所的に自生する非寄生高山植物 2 種 (ハクサンイチゲ (*Anemone narcissiflora*), アキノキリンソウ (*Solidago virgaurea*)) を採取した (図 10、表 1)。これらの対象植物は日本列島の中部地方以北に広く分布し、高山の草原や岩礫地に自生する。植物の採取は、植物種の同定を確実にを行うため、各種の開花期に実施した。植物は後述する一部山域を除き、全草を採取して研究室へ持ち帰り、根の周囲の土壌を手で落とし、その後、水道水で綺麗に洗い流した。洗浄した根は、15 mL チューブに入れた 10 mL の 70% EtOH に浸し、-30 °C で保存した。なお、中部山岳国立公園内の槍ヶ岳 (YAR) では、全草ではなく根のみの採取許可であったため、植物の周囲の土壌を掘って根の一部 (4-5 cm) のみを 2-3 本採取し、現地でミネラルウォーターを用いて洗浄後、15 mL チューブ内の 70% EtOH に浸して研究室に持ち帰った。研究室内で新しい 70% EtOH に入れ替えてから、-30 °C 下で保存した。

採取した根は、Toju らの方法⁷⁶を参考に洗浄と破碎を行った後、DNA 抽出を実施した。まず、採取した根から、ハサミで細根を 2-3 cm 程切り取り、2 mL チューブに詰めた。この根を入れたチューブに、ジルコニアビーズ (1 mm) と、1 mL の 70% EtOH を加えて、TissueLyser II (Qiagen) を用いて、15 Hz で 2 分間、根の表面を洗浄した。次に、チューブのフタを開けて EtOH とジルコニアビーズを取り出し、風乾した。EtOH が残っていないことを確認後、ジルコニアビーズ (4 mm) を入れてチューブのフタを閉め、液体窒素に入れて凍結させた。その後、TissueLyser II を用いて、20 Hz で 3 分間、根を粉末状に破碎した。チューブからジルコニアビーズを取り除いた後、DNeasy Plant

Mini Kit (Qiagen) を用いてメーカーのプロトコルに従い、ゲノム DNA を抽出した。抽出は各サンプルについて 2 反復実施した。

抽出した DNA 溶液は Synergy LX (Bio Tek) と QuantiFluor dsDNA System (Promega) を用いて濃度測定を行った後、1st PCR に供して真菌の分類のための分子マーカーとして利用される *internal transcribed spacer (ITS)* 領域を増幅した。1st PCR は表 2 に示した組成とし、94 °C で 2 分の反応後、94 °C で 30 秒、50 °C で 30 秒、72 °C で 60 秒の反応を 30 サイクル行い、最後に 72 °C で 5 分反応させた。1st PCR の増幅産物は AMPure XP Beads (Beckman Coulter) を用いて精製処理した後、2nd PCR に供して増幅断片の Tail にシーケンス用のインデックス配列を付加した。2nd PCR は表 2 に示した組成とし、94 °C で 2 分の反応後、94 °C で 30 秒、50 °C で 30 秒、72 °C で 30 秒の反応を 12 サイクル行い、最後に 72 °C で 5 分反応させた。なお、1st PCR 及び 2nd PCR で用いたプライマーの配列は表 3 にまとめて示した。2nd PCR 増幅産物を AMPure XP Beads を用いて精製処理後、Synergy H1 (Bio Tek) と QuantiFluor dsDNA System を用いて作製したライブラリーの濃度測定を行った。さらに、Fragment Analyzer (Agilent Technologies) と dsDNA 915 Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies) を用いて、ライブラリーの品質を確認した。品質確認したライブラリーは濃度調整を行ってプールした後、Miseq (Illumina) と MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) を用いて 2x300 bp の条件でシーケンシングを行い、塩基配列情報を取得した。

FASTX-Toolkit ver. 0.0.14 (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) の fastx_barcode_splitter tool を用いて Miseq によって得られたリード配列の読み始めが使用したプライマー配列と完全に一致するリード配列のみを抽出した。プライマー配列に N-mix を含む場合、N の数 (フォワード側 6 種類 x リーバース側 6 種類 = 36 種類) を考慮して、この操作を繰り返した。抽出したリードからプライマー配列を FASTX-Toolkit の fastx_trimer で削除した後、sickle ver. 1.33 (<https://github.com/najoshi/sickle>)

を用いて品質値が 20 未満の配列と、40 bp 以下の長さとなった配列とそのペア配列を取り除いた。続いて、ペアエンドリード結合スクリプト FLASH ver. 1.2.11⁷⁷を用いて、結合後の配列長 320 bp、リードの結合長 280 bp、最低の重なりを 10 bp の条件でリードを結合した。結合できなかったリードを抽出し、両鎖とも 3' 側 50 bp を削除してから、再度結合を行った。同様の作業をさらに 2 回行った。計 4 回の結合の作業で得られた配列を統合し、以降の解析を行った。QIIME2 ver. 2021.8⁷⁸ の dada2 プラグインでキメラ配列とノイズ配列を除去した後、代表配列と operational taxonomic unit (OTU) の表を出力した。feature-classifier プラグインを用いて、取得した代表配列と UNITE ver. 8.2⁷⁹ の 97% OTU を比較して系統推定した。QIIME2 の tools export プラグインで qzv 形式のデータを閲覧可能なデータに変換した。なお、1st PCR 以降のライブラリーの調整の操作過程、シーケンス解析及び、QIIME2 によるデータ解析は株式会社生物技研のアンプリコンシーケンス解析サービスを利用して実施した。

植物の根から検出された真菌類の門レベルの分類学的組成を、サンプルレベルのマトリックスに基づいて棒グラフで各植物種について示した。さらに、各真菌 OTU の生態学的機能は、FUNGuild⁸⁰ を用いて推定し、同様に棒グラフで各植物種及び採取場所について示した。

3-2. 室内実験に用いた植物の発芽

本研究では、中国の青海省や雲南省、チベットなどの標高 1,800-4,600 m の高山の草地や砂礫地などに自生する一年草ないしは二年草であるシオガマギク属植物 *Pedicularis kansuensis* を実験室での研究材料として用いた (図 12a、表 4)。本研究で用いた種子は、中国科学院昆明植物研究所の Ai Rong Li 博士に提供していただいた。*P. kansuensis* の種子は、1.5 mL チューブ内で 1 mL の 70% EtOH によって 5 分間振盪後、1 mL の 25% キッチンハイター (Kao) (1.5% 次亜塩素酸水溶液) によって 5 分

間振盪することで、表面滅菌した。表面滅菌した種子は、滅菌水で 5 回洗浄した。シャーレ (Iwaki) にガラスファイバーフィルター (Whatman) を 1 枚敷き、0.05% Plant Preservation Mixture (Plant Cell Technology) 水溶液を 8 mL 滴下して濡らし、洗浄した種子をピンセットで並べて播種した。シャーレにフタしてシール後、明期 16 時間 (25 °C)・暗期 8 時間 (25 °C) に設定したグロースチャンバー Biotron (Nk System) に静置して発芽させた。

P. kansuensis と共栽培する植物として、イネ (*Oryza sativa* subsp. *japonica*) の 3 栽培品種 (コシヒカリ、日本晴、シオカリ)、タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*)、チャイブ (*Allium schoenoprasum*)、コシオガマ (*Phtheirospermum japonicum*) 及び、*Lindenbergia philippensis* を用いた (表 4)。イネの種子は種皮 (籾) を剥いた後、*P. kansuensis* の種子と同様にして表面滅菌、洗浄及び、播種を行った。タルウマゴヤシはサンドペーパーで種皮に傷をつけた後、*P. kansuensis* の種子と同様にして表面滅菌、洗浄及び、播種を行った。チャイブは種皮には傷を付けず、*P. kansuensis* と同様に表面滅菌、洗浄及び、播種を行った。コシオガマと *L. philippensis* の 2 種も *P. kansuensis* の種子と同様にして表面滅菌、洗浄及び、播種を行った。コシオガマは播種後 4 °C に一晩置き、その後 2–3 日間 25 °C の暗所に置いた後、明期 16 時間 (25 °C)・暗期 8 時間 (25 °C) に移して発芽させた。*L. philippensis* は播種後すぐに明期 16 時間 (25 °C)・暗期 8 時間 (25 °C) に置いて発芽させた。

3-3. 環境ストレス条件における AM 菌の接種試験

P. kansuensis における AM 菌接種試験の「基本条件」は次に記述するものとした。150 mL 程の栽培土壌をポットに入れ、発芽後 1 週間の植物の実生を植え付けた。栽培土壌は、赤玉土 (Akizawa) とバーミキュライト (Nittai) を体積比 1:1 で混合し、121 °C で 1 時間オートクレーブ滅菌したものを使用した。AM 菌は *Rhizophagus irregularis*

DAOM 197198 (Premier Tech) を用いた。AM 菌の孢子懸濁液を滅菌水で濃度調整し、1 ポットあたり 500 個の孢子を植え付け直後の植物の根元付近の土に接種した。AM 菌非接種区には等量の滅菌水を与えた。AM 菌を接種した植物は、明期 16 時間 (25 °C)・暗期 8 時間 (20 °C) に設定したグロースチャンバー Biotron (Nk System) に置き、1 週間に一回栄養として 1/10 Hoagland 溶液 (リン 100 μ M を含む、pH 6.0、表 5) をポットの下から溢れ出るくらいまで与えて栽培した。また、水やりは土壤の乾燥状態を観察しながら、1 週間に 3 回実施した。

AM 菌接種試験の「基本条件」から以降の点を変更することで、AM 菌の感染を促進する環境条件の検討を実施した。栽培土壤の組み合わせとして、園芸用培養土 Super mix (Sakata) とバーミキュライト、赤玉土とバーミキュライト、川砂とバーミキュライト、桐生砂 (Iwamoto) とバーミキュライト、それぞれ体積比 1:1 で混合し、121 °C で 1 時間オートクレーブ滅菌したものを使用して AM 菌接種試験を行い、AM 菌の感染率を比較した。なお、赤玉土は火山灰に由来する土壤で、粒の大きさは 2.0-7.0 mm である。桐生砂は火山礫に由来する硬い土砂で、粒の大きさは 3.0 mm 程度である。川砂は川の底や河川敷に堆積した砂で、粒の大きさは 0.25-2.0 mm と小さい。土壤 pH の検討は、pH 6.0 または pH 4.0 に調整した 1/10 Hoagland 溶液 (表 5) を与えた後、AM 菌接種試験を行った。気温条件は、グロースチャンバーを温暖条件 (明期 25 °C・暗期 20 °C) または、低温条件 (明期 25 °C・暗期 4 °C) に設定して AM 菌接種試験を行った。また、植物の栽培期間中に与える液肥のリン及び窒素の施肥量の変更を行い、リンや窒素の欠乏条件における AM 菌接種試験を行った。リンに関しては、十分条件: 1/2 Hoagland 溶液 (リン 500 μ M を含む、表 5) に対して、欠乏条件を 1/10 Hoagland 溶液 (リン 100 μ M を含む) とした。窒素に関しては、十分条件: 1/2 Hoagland 溶液 (窒素 1,000 μ M を含む、表 5) に対して、欠乏条件を 1/10 Hoagland 窒素欠乏溶液 (窒素源を含まない、表 5) とした。水分に関しては、1 週間に 1 回のみ水やりする処理区を乾燥区として

設定し比較条件に加えた。さらに、シオガマガク属の寄生相手である宿主植物を同じポットに植え付ける共栽培条件についても検討を行った。宿主植物なし、あるいは、イネ 3 品種（コシヒカリ、日本晴、シオカリ）、タルウマゴヤシ、チャイブ、コシオガマのいずれか 1 種類 1 個体を *P. kansuensis* 1 個体と同じポットに植え付け、AM 菌接種試験を実施した（表 4）。栽培期間の検討も行い、AM 菌接種後 30、60、90 日に植物根の採取を行って感染状況を観察した。

コシオガマ及び *L. philippensis* についても、1 ポットあたり 500 個の AM 菌の胞子を根元付近に接種して、上述の *P. kansuensis* における基本条件と同様にして栽培することで AM 菌接種試験を実施した。コシオガマは、単独条件あるいはイネ（コシヒカリ）との共栽培条件の 2 条件で、*L. philippensis* は単独条件のみで実験を行った。

3-4. 宿主植物由来の AM 菌感染促進因子を特定するための AM 菌感染実験

P. kansuensis と宿主植物・イネを目開き 30 μm 径のナイロン製メッシュ (Azone) によって分けした条件で AM 菌接種を行った。30 μm 径は、植物の根は透過できず、菌糸のみ透過できる大きさである。*P. kansuensis* と宿主植物・イネ（コシヒカリ）、各 1 個体と同じポットに植え付けて両個体の間にメッシュを設置し、AM 菌 500 胞子を *P. kansuensis* と宿主植物・イネのいずれかの側あるいは両側に接種した。栽培土壌や日長、気温は、3-3 の基本条件と同じ条件に設定して栽培した。

宿主植物の根滲出液処理試験において、宿主植物・イネ（コシヒカリ）を 3-2 と同様にして発芽させた後、川砂とパーミキュライトを体積比 1:1 で混合し、121 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間オートクレーブ滅菌した栽培土壌 150 mL に植え付け、1/10 Hoagland 溶液（リン 100 μM を含む、表 5）を与えながら明期 16 時間（22 $^{\circ}\text{C}$ ）・暗期 8 時間（22 $^{\circ}\text{C}$ ）条件下で生育させた。植え付け 40 日後に植物を土から掘り出して、15 mL チューブ内に入れた超純水 10 mL に根が完全に浸かるように設置し、明期 16 時間（22 $^{\circ}\text{C}$ ）・暗期

8 時間 (22 °C) 条件下に置いた。2 日後に植物根を浸していた水を回収して根滲出液とした。回収した根滲出液は、ガラスファイバーフィルター (Whatman) を用いてろ過して土砂を除去した。3-3 の AM 菌接種試験の基本条件において、AM 菌 500 胞子を接種した *P. kansuensis* の根元付近の土に、ろ過した根滲出液を 1 日おきに 1 ポットあたり 1 mL を与えながら栽培した。

宿主植物の根滲出液に含まれる SL 類の抽出は以下のようにおこなった。メタノールによって予めコンディショニングを行った固相抽出カラム Strata-X 60 mg (Phenomenex) に、上述のようにして集めたろ過済みの宿主植物・イネの根滲出液を滴下した。イオン交換水でカラムを洗浄後、根の新鮮重量 60 mg/mL となる量のアセトンで SL を抽出した。収集したアセトン画分は、滅菌水で 10% に希釈して絶対寄生植物 *Striga hermonthica* の種子発芽試験に供し、種子発芽誘導活性を有することを確認した。*S. hermonthica* の種子は 1 mL の 25% キッチンハイター (Kao) (1.5% 次亜塩素酸水溶液) によって 5 分間振盪することで、表面滅菌した。表面滅菌した種子は滅菌水で 5 回洗浄した。シャーレ (Iwaki) にガラスファイバーフィルター (Whatman) を 1 枚敷き、滅菌水 8 mL で濡らした後、洗浄した種子を置いた。シャーレにフタしてシールした状態で、25 °C の暗所に 10 日間静置した。*S. hermonthica* の種子を、10% 根滲出液アセトン画分溶液 (使用直前に根滲出液のアセトン画分 10 μ L を滅菌水 90 μ L に加えて混合した溶液) に浸し、24 時間後に発芽率を確認した。なお、陰性対照には 10% アセトン水溶液、陽生対照には 10 nM ストリゴール (SL の一種) をそれぞれ用いた。また、根滲出液の回収工程の操作が問題ないことを確認するため、イネと同様にして集めたミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の根滲出液のアセトン画分も種子発芽試験に供した (ミヤコグサの種子はタルウマゴヤシの種子と同様にして発芽させ、イネと同様にして生育させた後に根滲出液を回収した)。その後、3-3 の AM 菌接種試験の基本条件において、AM 菌 500 胞子を接種した *P. kansuensis* の根元付近の土

に、10% 根滲出液アセトン画分溶液を 1 日おきに 1 ポットあたり 1 mL を与えながら生育させた。また、同じ接種実験系で根滲出液アセトン画分溶液の代わりに 100 nM の人工合成 SL アナログ \pm GR24 を 1 日おきに 1 ポットあたり 1 mL を与えながら生育させる実験も実施した。

フラボノイドの一種であるケルセチン (quercetin) の接種下におけるシオガマギク属の AM 菌接種試験も実施した。3-3 の AM 菌接種試験の基本条件において、AM 菌 500 胞子を接種した *P. kansuensis* の根元付近の土に、10 mg/mL ケルセチンを 1 日おきに 1 ポットあたり 1 mL を与えながら生育させた。

イネの AM 共生関連遺伝子の変異体を、*P. kansuensis* と同じポットに植えて共栽培する AM 菌接種試験も実施した。本研究では、*ccamk*、*pollux*、*d10* の 3 変異体系統を用いた (表 4)。これらの変異体との共栽培試験における AM 菌接種及び植物栽培条件は、3-3 の基本条件と同様にして実施した。

3-5. 植物根内の AM 菌の染色及び顕微鏡観察

栽培した植物は土から掘り出し、根を水道水で洗って土を綺麗に落とした。採取した植物根は、トリパンブルー染色法によって根内の AM 菌を染色した⁸¹。まず、採取した根を 1.5 mL チューブに詰め、1 mL の 10% 水酸化カリウム水溶液を加え、90 °C で 15 分加熱した。次に、水酸化カリウム水溶液を取り除き、根を蒸留水で 3 回洗った後、1 mL の 5% 塩酸を加えて室温で 5 分間静置した。その後、塩酸を取り除き、乳酸で 0.05% に調整したトリパンブルー染色液 1 mL を加えて、90 °C で 15 分インキュベートした。最後に、トリパンブルー染色液を取り除き、1 mL のラクトグリセロール溶液 (表 6) を加えて、数日間静置して過剰な染色を脱色した。

染色した根は、実体顕微鏡 Stemi 2000-C (Carl Zeiss)、倒立光学顕微鏡 DMI3000 B (Leica) 及び、正立光学顕微鏡 ECLIPSE E800 (Nikon) を用いて AM 菌の感染状況を観

察した。AM 菌の感染量の比較は、根と格子の線との交差数をもとに図中の計算式により定義される「AM 菌の感染率」に基づいて実施した (図 12b)⁸¹。さらに、AM 菌が植物との共生時特異的に形成する器官である樹枝状体及びびのう状体が確認された場合は、それらも記録をした。処理区間の感染率の比較解析では、student's t-test または tukey's test により検定を行った。

植物根への AM 菌の感染経路や器官形成について、蛍光染色を用いて観察した。上述のトリパンブルー染色法と同様にして植物根を水酸化カリウム水溶液で透明化した後、根を phosphate-buffered saline (PBS、表 7) で 4 回洗浄し、PBS 中に一晚浸漬した。翌日、この根を PBS で 5 µg/mL に調整した wheat germ agglutinin (WGA)-Alexa Fluor 488 conjugate (Invitrogen) に浸し、回転させながら 6 時間染色した。PBS で根を 4 回洗浄した後、PBS で 5 µg/mL に調整した propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich) または Calcofluor white (CFW, Sigma-Aldrich) に浸し、回転させながら一晚染色した。その後、PBS で根を 4 回洗浄した。

高開口電動ズーム顕微鏡 Axio Zoom.V16 (Carl Zeiss) の観察下で蛍光染色した根から AM 菌感染部位を切り出した。切り出した根断片について、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV-3000 (Olympus) 及び、光シート型蛍光顕微鏡 Lightsheet Z.1 (Carl Zeiss) を用いて AM 菌の菌糸や共生器官の観察及び撮影を行った。

3-6. 植物根からの RNA 抽出

遺伝子発現解析に用いたシオガマギク属の *P. kansuensis* と宿主植物のイネ (コシヒカリ) は、3-2 と同様にして無菌発芽させた。

AM 菌との接触時の遺伝子発現解析のサンプルは次のようにして用意した。発芽した *P. kansuensis* の実生は 1/2 MS 培地 (表 8) に置いて 28 日間生育させた。続いて、生

育させた植物体を 0.8% 寒天培地に 7 日間置いて飢餓処理を行った。また、M 培地⁸² (表 8) 上でニンジン (*Daucus carota*) 毛状根 (T1 系統⁸³) を生育させておき、この毛状根の周囲の培地に AM 菌 (*Rhizophagus irregularis*) 100 胞子を滴下して接種し、25 °C の暗所で培養した。そして、ニンジン毛状根と共に 30 日間培養した AM 菌の菌糸と触れるように飢餓処理後の *P. kansuensis* の植物体を 1 プレートにつき 3 個体ずつ置いた。明期 16 時間 (25 °C) ・暗期 8 時間 (20 °C) の合計 24 時間の処理後、プレート毎に根を採取して速やかに液体窒素で凍結させた。本実験では、ニンジン毛状根のみ (AM 菌なし) 及び、AM 菌とニンジン毛状根 (AM 菌あり) の 2 処理区を設定した。

AM 菌の感染時の遺伝子発現解析のサンプルは次のようにして用意した。*P. kansuensis* と宿主植物のイネ (コシヒカリ) の実生を同じポットに植え付け (共栽培条件)、AM 菌 (*Rhizophagus irregularis*) を 500 胞子接種して生育させた。AM 菌接種後 60 日栽培した植物を土から掘り出し、根を水道水で洗って土を綺麗に落とした。採取した植物根は、速やかに液体窒素で凍結させた。AM 菌の接種及び植物の栽培は 3-3 に記載の基本条件で行った。本実験では、AM 菌の接種の有無の 2 処理区を設定した。

凍結させた植物根は、ジルコニアビーズ (4 mm) と共にチューブに入れ、TissueLyzer II (Qiagen) を 30 Hz で 1 分 30 秒に設定して粉末状になるまで破碎した。チューブからジルコニアビーズを取り除いた後、破碎した根から RNA 抽出キット RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いてメーカーのプロトコルに従い、total RNA を抽出した。RNA 溶液中のゲノム DNA は、RNase-Free DNase Set (Qiagen) を用いてメーカーのプロトコルに従い、分解した。抽出した RNA は分光光度計 Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度を測定し、以降の解析に用いるまで -80 °C 下に保管した。

3-7. 植物及び AM 菌の遺伝子発現解析

植物根から抽出した total RNA サンプルを鋳型として、ReverTra Ace qPCR RT kit

(Toyobo) を利用して complementary DNA (cDNA) を合成した。RT Enzyme Mix (Toyobo) 1.0 μ L、5x RT Buffer (Toyobo) 4.0 μ L、Primer Mix (Toyobo) 1.0 μ L 及び、RNase-free water (RNA 溶液の量により調整) の混合液に 100 ng の RNA を加えて計 20 μ L とし、30 $^{\circ}$ C で 15 分の反応後、98 $^{\circ}$ C で 5 分反応させた。反応終了後の cDNA サンプルは -20 $^{\circ}$ C 下で保存した。

続いて、10 倍希釈した cDNA サンプルを THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いた定量的 PCR (quantitative polymerase chain reaction: qPCR) 解析に供した。リアルタイム PCR 解析システム CFX connect (Bio-Rad) を用いて、表 9 に示した組成とし、98 $^{\circ}$ C で 1 分の反応後、98 $^{\circ}$ C で 5 秒、55 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 30 秒の反応を 40 サイクル行って増幅シグナルを検出し、最後に融解曲線分析を実施した。qPCR 解析は各サンプルにつき 3 反復実施した。標的遺伝子を相対定量するために、内在性コントロール遺伝子として *P. kansuensis* では *ACTIN* を、イネでは *CYCLOPHILIN2* をそれぞれ用いた。標的遺伝子及び内在性コントロール遺伝子のプライマーの塩基配列は表 3 にまとめて記載した。また、処理区間の遺伝子の相対的発現量の比較解析では、Student's t-test により検定を行った。

3-8. 植物体のバイオマスの測定

P. kansuensis と宿主植物・イネ (コシヒカリ) を、3-2 と同様にして無菌発芽させ、AM 菌 500 孢子接種下で 60 日間栽培した。AM 菌の接種及び植物の栽培は 3-3 に記載の基本条件 (リン欠乏条件)、酸性土壌条件、低温条件の下で行った。AM 菌及び宿主植物による生長に対する影響も評価するため、リン欠乏条件では 4 処理区 (1. AM 菌非接種かつイネ不在、2. AM 菌接種かつイネ不在、3. AM 菌非接種かつイネ共栽培、4. AM 菌接種かつイネ共栽培) を設定した。

AM 菌接種後 60 日に植物個体の乾燥重量を測定して、処理区ごとに比較を行った。

まず、植物の地上部（葉と茎）をハサミで切り取って水道水で洗浄後、キムワイプで拭いて汚れを綺麗に落とした。次に、70℃のインキュベーターに24時間静置して乾燥させ、電子天秤で各植物サンプルの重量を測定し、地上部の乾燥重量として記録した。

3-9. 植物体のリン含有量の測定

植物地上部の乾燥サンプルから湿式灰化法⁸⁴でリン酸を抽出した。まず、3-8で重量測定後の乾燥サンプルを耐熱試験管に入れて、5%硫酸を600μL加え、200℃のヒートブロック上で6時間程加熱した。その後、過酸化水素水を100μL加えて200℃で5分間加熱した。続いて、過酸化水素水を400μL加えて200℃で30分間加熱した。再度同量の過酸化水素水を加えて200℃で30分間加熱する工程を5回繰り返した。この操作の終了後、試験管の壁面に付着した過酸化水素水を蒸留水1mLで3回洗い流し、さらに200℃で30分間加熱した。そして、試験管をヒートブロックから降ろして室温で放冷した。一晩放冷した後、蒸留水500μLを加えてよく攪拌し、溶液をピペットで1.5mLチューブに回収する操作を2回繰り返した。

湿式灰化法で回収したサンプル溶液のリン酸の濃度はモリブデン青吸光光度法⁸⁴によって測定した。発色液（表10）900μLとサンプル溶液100μLとを混合し、室温で15分間静置した。その後、分光光度計Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific)を用いて710nmの吸光度を測定した。また、0、5、10、15、20、25、30mg/Lのリン酸標準液を調整し、同様に吸光度を測定して検量線を作成した。作成した検量線を基にサンプル溶液中のリン酸の量を求め、これより分子量 (P: 30.97, PO₄: 94.97) の比を用いて植物1個体の地上部に含まれるリン量を算出した。

3-10. 内生真菌類の単離と同定

奈良先端科学技術大学院大学の構内 (34° 43' N, 135° 44' E, 120 m a.s.l) の林縁土壌を

採取して、この土壌を 150 mL 容のポットに詰め、3-2 と同様にして無菌発芽させた *P. kansuensis* を 1 個体ずつ植え付けた。植え付け後 60 日の個体を土から掘り出し、水道水で根に付着していた土砂を丁寧に洗い流した。洗浄した根を 1.5 mL チューブに入れ、0.5% SDS-10 mM NaCl を適量加え、振盪しながら約 1 分間根の表面を洗浄した後、溶液を取り除いた。次に、70% EtOH を適量加え、振盪しながら約 5 分間根の表面を滅菌した。その後、溶液を取り除き、滅菌水を加え、激しく振盪しながら洗浄した。この滅菌水による洗浄作業を 2 回繰り返した。洗浄した根をピンセットで潰して Modified Melin-Norkrans (MMN) 培地 (表 8)⁸⁵ に置き、25 °C で培養した。

培養開始から 60 日以内に培地上に出現した真菌コロニーをチップで掬い取って、コロニー毎に新しい MMN 培地に移し、25 °C で培養した。移動先の培地で複数の真菌に由来するコロニーが出現した場合は、再度真菌コロニーをチップで掬い取って、新しい MMN 培地に移し、25 °C で培養した。こうして単離した真菌コロニーを、チップで掬い取って 50 µL の Tris-EDTA 溶液に懸濁し、90 °C で 10 分間インキュベートした。この培養液から 1 µL 取って、PCR に供して真菌 DNA の *ITS* 領域を増幅させた。PCR は高効率・高成功率 PCR 酵素 KOD FX Neo (Toyobo) を用いる表 11 に示した組成とし、94 °C で 2 分の反応後、98 °C で 10 秒、52 °C で 30 秒、68 °C で 60 秒の反応を 35 サイクル行い、最後に 68 °C で 5 分反応させた。なお、使用したプライマーは表 3 に示した。増幅産物を Tris-acetate-EDTA (TAE) アガロースゲルにて電気泳動に供し、目的 DNA 領域の断片が増幅できているか確認した。目的領域のサイズのバンドが現れたサンプルについて、PCR 増幅産物の 10 倍希釈液 1 µL を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) による反応を行って、ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてシーケンスを行い、各真菌サンプルの *ITS* 領域の塩基配列を取得した。得られた真菌 *ITS* 領域の塩基配列データを BLAST 検索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) に供し、真菌の種同定を行った。さらに、GenBank

(NCBI) から入手した同属の真菌類の塩基配列情報を加えてアライメントを行い、Kimura-2-parameter model に基づく最尤法を用いて系統樹を構築した⁸⁶。配列のアライメントは BioEdit の ClustalW Multiple Alignment tool を⁸⁷、系統樹の構築は MEGA7 を⁸⁸、それぞれ用いて実施した。

3-11. 内生真菌類の再接種試験

3-10 において、*P. kansuensis* の根から単離し、MMN 培地上で純粋培養した真菌コロニーをチップで掬い取って 30 mL の MMN 液体培地（表 8）に加え、振盪しながら 25 °C で培養した。7 日間培養した後、50 mL 遠沈管に移し、高速遠心機 MX-305 (Tomy) を用いて 7,000 rpm で 10 分間遠心した。その後、上清をデカンテーションで取り除き、滅菌水を 10 mL 加えて攪拌して懸濁した後、再度同じ条件で遠心した。上清を取り除き、滅菌水を 10 mL 加えて懸濁した。

P. kansuensis を 3-2 と同様にして無菌発芽させ、3-3 に記載の基本条件と同様の条件で栽培した。この際、上述の真菌懸濁液を 1 ポットあたり 1 mL を与えたポットと、真菌懸濁液 1 ポットあたり 1 mL と AM 菌 500 孢子とを同時に接種（共接種）したポットを作成した。真菌及び AM 菌接種後 60 日栽培した植物個体の地上部を、3-8 と同様にして採取して乾燥重量を測定して処理区間で比較した。また、3-9 と同様にして地上部の乾燥サンプルにおけるリン含有量も測定した。AM 菌共接種区の個体は、3-5 に記述したように根を採取してトリパンブルー染色後、AM 菌の感染率を確認した。なお、*P. kansuensis* の根に接種した内生真菌 P7 及び P17 が感染したことの確認は、文献で公表されている各内生真菌の系統特異的プライマーセットを用いた PCR 解析に供することで実施した。まず、採取した *P. kansuensis* の根（個体の根全量）から、3-1 と同様にして DNA を抽出した。この抽出した DNA のうち 1 µL を PCR に供した。PCR は高効率・高成功率 PCR 酵素 KOD FX Neo (Toyobo) を用いる表 11 に示した組

成とした。真菌 P7 の検出については、94 °C で 2 分の反応後、98 °C で 10 秒、64 °C で 30 秒、68 °C で 10 秒の反応を 40 サイクル行い、最後に 68 °C で 5 分反応させた。真菌 P17 の検出については、94 °C で 2 分の反応後、98 °C で 10 秒、60 °C で 30 秒、68 °C で 10 秒の反応を 40 サイクル行い、最後に 68 °C で 5 分反応させた。使用したプライマーは表 3 に示した。増幅産物を TAE アガロースゲルにて電気泳動に供し、目的 DNA 領域の断片が増幅できているか確認した。

4. 結果

4-1. 野外で採取したシオガマギク属植物の根内菌叢の網羅的解析

4-1-1. 野外で採取した植物の根内菌叢における真菌系統の組成

著者の修士論文研究において野外のシオガマギク属の根に AM 菌が感染することを確認したが、AM 菌が菌叢でどの程度占めるか、AM 菌以外のどのような真菌類が存在するかは明らかではなかった。そこで、真菌類の網羅的解析・メタゲノム解析を実施し、シオガマギク属の根に存在する真菌類の同定とその群集構造の解明を試みた。シオガマギク属植物 3 種（ミヤマシオガマ (*P. apodochila*, Pa)、ヨツバシオガマ (*P. chamissonis*, Pc)、タカネシオガマ (*P. verticillate*, Pv)) 及び、シオガマギク属と同所的に自生する非寄生高山植物 2 種（ハクサンイチゲ (*Anemone narcissiflora*, An)、アキノキリンソウ (*Solidago virgaurea*, Sv)) の根サンプル内の真菌 ITS 領域のシーケンス解析の結果、ペアエンドリードで合計 2,501,100 リードの塩基配列情報が取得できた (表 12)。このリードのうち、配列正確性 99.0% 以上であるリードの割合を示す Q20 の平均値は 92.4% で、配列正確性 99.9% 以上であるリードの割合を示す Q30 の平均値は 83.4% であった (表 12)。取得した塩基配列の品質確認、トリミング、結合を行った後、合計 2,014,692 の結合リードを Qiime 解析に供したところ、3,008 の真菌 OTU が得られた。検出された真菌 OTU を植物種別に見ると、ミヤマシオガマ (Pa) で 609 OTU、ヨツバシオガマ (Pc) で 1,157 OTU、タカネシオガマ (Pv) で 384 OTU、ハクサンイチゲ (An) で 683 OTU、アキノキリンソウ (Sv) で 741 OTU であった。

得られた OTU を真菌データベース UNITE⁷⁹ に照合して系統推定を行い、各植物の根の真菌群集の分類群の構成を確認した。植物種別に真菌類の分類学的組成を門レベルで調査したところ、いずれの植物種の真菌群集でも子囊菌門 (Ascomycota) が最も優占的であり (50-80%)、次いで担子菌門 (Basidiomycota) が豊富であった (5-25%)

(図 11a)。また、AM 菌であるグロムス門 (*Glomeromycota*) は各植物種の真菌群集に占める割合が 1-5% で、シオガマギク属のミヤマシオガマ (Pa) で 1%、ヨツバシオガマ (Pc) で 3% であった。また、非寄生植物のハクサンイチゲ (An) で 5%、アキノキリンソウ (Sv) で 1% であった。すなわち、菌叢に占める AM 菌の割合に関して、シオガマギク属と非寄生植物 2 種とで大きな差はなかった。ただし、タカネシオガマ (Pv) ではグロムス門 (*Glomeromycota*) の真菌、すなわち AM 菌は検出されなかった (図 11a)。この結果は、タカネシオガマの染色根の顕微鏡観察においても AM 菌の感染が確認できなかったという結果と一致していた (図 7、表 1)。シオガマギク属植物 2 種から検出された AM 菌は、*Glomerales* 目、*Archaeosporales* 目及び、*Diversisporales* 目であった。これらは AM 菌としてよく知られる分類群である。検出頻度が最も高かったのは *Glomerales* 目で、先行研究でも見つかった *Rhizophagus* 属及び *Glomus* 属の AM 菌が検出された。さらに、その他の門に属する真菌類 (*Mortierellomycota*、*Chytridiomycota*、*Mucoromycota*、Others (*Entorrhizomycota*、*Kickxellomycota*、*Monoblepharomycota*、*Olpidiomycota*、*Rozellomycota*、*Zoopagomycota*)) も割合が少ないながらも確認された (それぞれ数 % 未満)。真菌類の門レベルの組成という観点では、シオガマギク属 3 種 (ミヤマシオガマ (Pa)、ヨツバシオガマ (Pc)、タカネシオガマ (Pv)) と、非寄生植物 2 種 (ハクサンイチゲ (An)、アキノキリンソウ (Sv)) との間に一貫性のある明確な違いは検出できなかった。真菌の種レベルで見ると、シオガマギク属 3 種の根の真菌群集に占める割合が多かった上位 10 種は、子嚢菌に属するもので、*Chaetothyriales* 目の *Phialophora mustea*、ビョウダケ目 (*Helotiales*) に属する真菌 5 種、*Phacidiales* 目の *Gremmenia infestans*、詳細不明の子嚢菌 2 種、担子菌に属するもので、アンズタケ目 (*Cantharellales*) の *Ceratobasidiaceae* 科の 1 種であった。なお、文献調査の結果、*Phialophora mustea* は植物からしばしば単離される内生真菌で、植物病原菌の生育阻害

効果が報告されている⁸⁹。ビョウダケ目真菌も植物からしばしば単離されており、植物病原菌も存在するが、ツツジ科植物の窒素栄養の吸収を助けるエリコイド菌根菌などの植物共生菌も含まれていた⁹⁰。*Gremmenia infestans* は植物病原菌として報告されていた^{91,92}。Ceratobasidiaceae 科真菌は植物病原菌が多いが、ラン科菌根菌などの共生菌も含まれるとされていた⁹²。

4-1-2. 野外で採取した植物の根内菌叢における生態学的機能の組成

次に、検出された真菌類について、データベース FUNGuild⁸⁰ に照合して生態学的機能を推定し、それぞれの植物の根の真菌群集にどのような機能を持つ真菌が含まれているか調査した。植物種別に真菌類の生態学的機能の組成を調査した結果、いずれの植物種でも腐生菌 (Saprotroph) が最も多く、各植物種の真菌群集の 20-50% 程を占めていた (図 11b)。AM 菌 (Arbuscular Mycorrhizal) はタカネシオガマ (Pv) 以外で確認され、各植物種の真菌群集の 2-10% 程を占めていた (図 11b)。また、外生菌根菌 (Ectomycorrhizal) も各植物種で 2-10% 程確認され、AM 菌 (Arbuscular Mycorrhizal) がほとんど検出されなかったタカネシオガマ (Pv) の真菌群集に占める割合が最も多かった (図 10b)。さらに、シオガマギク属植物 3 種の真菌群集では、ラン科菌根菌 (Orchid Mycorrhizal) も 1-2% であるが、共通して確認された (図 11b)。その一方で、非寄生植物 2 種 (ハクサンイチゲ (An)、アキノキリンソウ (Sv)) では、外生菌根菌 (Ectomycorrhizal) やラン科菌根菌 (Orchid Mycorrhizal) はほとんど検出されなかった (図 11b)。

4-1-3. 野外で採取した植物の根内菌叢構造の植物種及び山域ごとの比較

続いて、同じ採取地点内でシオガマギク属とそれ以外の植物の真菌群集を比較するため、岐阜県の槍ヶ岳 (YAR) で採取されたシオガマギク属のヨツバシオガマ (Pc) 及び、同地点で採取した非寄生性の高山植物であるハクサンイチゲ (An) とアキノキリンソウ

ウ (Sv) の真菌群集の生態学的機能の組成を比較したところ、その他・機能未知 (Others/Unkown) を除くと、最も優占的であったのは腐生菌 (Saprotroph) で、次いで割合が多かったのが AM 菌 (Arbuscular Mycorrhizal) となり、この傾向は 3 種に共通していた (図 11c)。その一方、ラン科菌根菌 (Orchid Mycorrhizal) はシオガマギク属のヨツバシオガマ (Pc) のみで検出されており、シオガマギク属植物の根の真菌群集の特徴と言える (図 11c)。

最後に、シオガマギク属のヨツバシオガマ (Pc) に限定し、採取地点 (山城) ごとの真菌群集の生態学的機能の組成を比較したところ、植物種ごとの比較の場合よりも地点ごとに固有の構造を持つ傾向が見られた。まず、AM 菌 (Arbuscular Mycorrhizal) は北海道の大雪山 (TAI) 以外のすべての地点で検出され、特に山形県の月山 (GAS) で真菌群集に占める割合が最も多かった (図 11d)。そして、大雪山 (TAI) では、AM 菌 (Arbuscular Mycorrhizal) が検出されなかった代わりに、外生菌根菌 (Ectomycorrhizal) やラン科菌根菌 (Orchid Mycorrhizal) の真菌群集に占める割合が他の地点よりも多い傾向が見られた (図 10d)。また、群馬県の至仏山 (SHB) は、AM 菌 (Arbuscular Mycorrhizal) の真菌群集に占める割合が 2 番目に多かった一方、植物病原菌の割合が最も多かった (図 11d)。共生内生菌 (Symbiotic Endophyte) は、シオガマギク属の中ではヨツバシオガマ (Pc) のみで少数確認でき (図 11d)、北海道の礼文島 (REB) と至仏山 (SHB) のヨツバシオガマ (Pc) 個体で真菌群集のおよそ 2% が確認された。

菌叢解析の結果をまとめると、シオガマギク属の複数の植物種の根から同所的に生える他科の非寄生植物種と同程度の AM 菌が検出された。先行研究における顕微鏡観察の結果⁷³と合わせて考えると、野外のシオガマギク属植物が AM 菌と何らかの関係を構築している可能性を示す。また、シオガマギク属の根内菌叢には外生菌根菌やラン菌根菌など AM 菌以外の植物共生菌もある程度存在したことから、シオガマギク属は様々な植物共生菌と関係を有する可能性が示された。植物間及び山城間における菌叢構

造の比較からは、シオガマギク属特有の真菌系統も存在する一方で、全体的な傾向としては、植物種よりも地域ごとに菌叢構造が類似することが示唆された。

4-2.室内実験によるシオガマギク属の AM 菌の感染促進条件の探索

シオガマギク属の根に AM 菌が感染する条件を明らかにするため、実験室内でシオガマギク属に対する AM 菌の接種試験を行った。まず、シオガマギク属植物における AM 菌の感染条件を検討した。シオガマギク属は主に周北極・高山地域に自生することから、これらの地域においてしばしば見られる、リン欠乏、窒素欠乏、乾燥、酸性土壌、低温条件下における AM 菌感染率の差を比較検討した。これらの環境条件の設定下で AM 菌を接種した *P. kansuensis* の根を染色し顕微鏡観察をした結果、リン欠乏条件（川砂、桐生砂、赤玉土）と酸性土壌条件で AM 菌が感染している個体が一部観察されたが、AM 菌の感染が顕著に促進される条件は見つけられなかった（図 13）。次に、イネなどの寄生相手である宿主植物を *P. kansuensis* と同じポットに植え付ける共栽培条件を検討した。その結果、*P. kansuensis* の根における AM 菌感染率が上昇した（図 14a）。この宿主植物との共栽培による AM 菌感染の上昇は、イネを宿主として用いた場合に顕著に観察され、ヒガンバナ科のチャイブを宿主植物として用いた場合でも同様の傾向が観察できた（図 14a）。その一方で、マメ科のタルウマゴヤシを用いた場合の感染率の上昇傾向はあまり見られなかった（図 14a）。イネの品種間の比較では、コシヒカリを宿主植物として用いた場合に、*P. kansuensis* の根における AM 菌の感染率が顕著に上昇し（図 14b）、AM 菌接種後 60 日における *P. kansuensis* の根の感染率の平均値は 15% であった（図 14b）。ただし、宿主植物のイネ（コシヒカリ）個体の感染率の平均値は 52% であったので（図 14c）、これと比べると *P. kansuensis* における感染率は低いレベルである。*P. kansuensis* における感染率の高さは、宿主植物の感染率の高さの順番（植物種別ではチャイブ、イネ、タルウマゴヤシの順、イネ

の品種別ではコシヒカリ、シオカリ、日本晴の順) と一致していた (図 14a, b)。AM 菌が植物との共生時特異的に形成する器官である、樹枝状体及びのう状体は、単独栽培した個体では確認できなかったのに対して、イネと共栽培した個体では *P. kansuensis* の根においても確認された (図 14c)。イネと共栽培した *P. kansuensis* 12 個体のうち、のう状体は 12 個体全てで観察されたが、樹枝状体は 1 個体のみで観察された。*P. kansuensis* の AM 菌感染根は、AM 菌接種後 30 日ではほとんど観察できなかったが、接種後 60 日から 90 日にかけて増加し、それぞれ 15% と 22% の感染率 (平均値) であった (図 14d)。さらに、*P. kansuensis* の AM 菌の感染率は、宿主植物・イネの感染率とやや強い正の相関が見られた (図 14e, $r=0.54644$, $p<0.001$)。以上の結果は、宿主植物と共存することで、*P. kansuensis* への AM 菌の感染が促進されることを示す。また、宿主植物における AM 菌の感染率の上昇に伴って *P. kansuensis* の感染率も上昇すると言える。

次に、*P. kansuensis* 以外のハマウツボ科植物 2 種を AM 菌接種試験に供した。独立栄養植物で AM 菌の宿主となることが既に報告されている *L. philippensis* では、単独栽培条件下で全個体の根において多数の樹枝状体やのう状体が観察され、72% という高い感染率を示した (図 15)。その一方で、条件的寄生植物であるコシオガマでは宿主植物・イネの共存条件下で、2.5% 程度の非常に低いレベルで AM 菌の感染が見られ、ごく一部の個体においてのう状体が確認された (図 15)。樹枝状体については、*L. philippensis* ではタルウマゴヤシやイネなどと同じレベルで多数観察されたが、コシオガマでは全く観察できなかった (図 15)。これらの結果から、*P. kansuensis* とコシオガマは近縁な寄生植物種でありながら、AM 菌の感染量や樹枝状体形成の有無において差が見られることが明らかになった。

4-3. 室内実験においてシオガマギク属の根に感染した AM 菌の表現型の詳細な観察

シオガマギク属における AM 菌の感染率は低く、イネや他の植物と共存することで感染が促進されることがわかった。そこで、シオガマギク属の根への AM 菌の菌糸の侵入経路及び、AM 菌の共生器官の表現型を光学顕微鏡や共焦点顕微鏡を用いて詳細に観察した。その結果、*P. kansuensis* の根では、AM 菌の侵入様式について 3 つのパターンが見られた。1 つ目は、AM 菌の菌糸が根に取り付いて表皮細胞に侵入しているが、皮層までは進行しないというものである (図 16a)。2 つ目は、根の傷口に AM 菌の付着器が形成され、菌糸が傷口を通して根の中に侵入して皮層まで侵入していたものである (図 16b、17a-d)。3 つ目は、AM 菌が付着器を形成しながらも、菌糸が根の表面で分岐し、複数箇所まで根への侵入を試みていたものである (図 16c、17e-h)。この場合、菌糸が根の皮層にまで達していた場合とそうでない場合の両方が観察された。このような観察結果から、AM 菌はシオガマギク属の根にも付着器を形成する侵入方法に加えて、根の間隙から侵入する場合も存在することが明らかになった。

P. kansuensis の根の中に形成された AM 菌の共生器官の顕微鏡観察の結果、この状態は長辺 100-200 μm 程度の大きさの円柱または水滴状の形状のものが見られた (図 16d-f、17i-l)。また、樹枝状体の形成頻度は少なかったが、多くの植物種で観察されるアラム型様の樹枝状体の形成が観察された (図 16g-i、17m-p)。稀に、連続する複数の細胞に渡って樹枝状体が形成されている根も観察された (図 16h-i)。さらに、光シート型蛍光顕微鏡を用いた蛍光染色根の横断面の観察から、AM 菌の菌糸や共生器官 (この状態及び樹枝状体) が *P. kansuensis* の根の表皮より内側の表層に形成されていることが確認できた (図 17s-x)。 *P. kansuensis* の根で形成された上述のような共生器官の形態は、イネなど他の AM 共生する植物の根で見られる形態との間に明瞭な違いは確認できなかった (図 1d)。

4-4. 室内実験における宿主植物によるシオガマギク属の AM 菌感染促進機構の推定

4-4-1. 宿主植物によるシオガマギク属の AM 菌感染促進機構の仮説

これまでの AM 菌感染促進条件の検討によって、宿主植物の共存条件がシオガマギク属の根への AM 菌の感染を促進したため、宿主植物に由来する何らかの因子が AM 菌感染を促進する可能性を考え、この因子の特定を試みるための試験を行った。ここで、宿主植物による AM 菌感染促進機構として、次の 3 つの仮説が考えられた。1) シオガマギク属は寄生のために宿主植物の根と吸器を介して連結するため、吸器を通して、AM 菌が宿主植物の根からシオガマギク属へと侵入する可能性 (図 18a)、2) 植物は SL 類を根から分泌し、AM 菌の菌糸分岐を誘導することで AM 共生を促進することから、宿主植物から分泌された SL 類によってシオガマギク属の AM 菌感染が促進される可能性 (図 18b)、3) AM 菌は植物と共生している時に共生特異的な状態になる可能性があることから、宿主植物に感染した AM 菌がシオガマギク属の根にも感染しやすい状態になる可能性 (図 18c)。これらの仮説を検証するために以下の実験を行なった。

4-4-2. 仮説 (1) 宿主植物との根の連結を介した感染機構の検証

1 つ目の仮説を検証するために、シオガマギク属と宿主植物を目開き 30 μm 径のナイロン製メッシュによって区分けした条件で AM 菌接種実験を行った (図 19)。30 μm 径は、植物の根は透過できず、菌糸のみ透過できる大きさであることから、シオガマギク属と宿主植物の根同士の連結が生じない (つまり、寄生ができなくなる)。本実験の結果、メッシュの存在下でも *P. kansuensis* の根で AM 菌の感染が観察できた (図 19)。また、メッシュの有無の条件間で、AM 菌の感染率も有意な差が認められなかった (図 19)。すなわち、シオガマギク属と宿主植物との根の連結がなくても、AM 菌がシオガマギク属の根に感染し得ることが分かった。その一方で、メッシュを 2 枚使用して区切り、*P. kansuensis* と宿主植物・イネとの間に 1 cm 程の距離を確保した条件では、*P. kansuensis* の根における AM 菌の感染率は著しく低下した (図 19)。

4-4-3. 仮説 (2) 宿主植物の根滲出液の成分を介した感染機構の検証

上述の実験結果から AM 菌感染に宿主植物への寄生が必須ではないことが示されたため、続いて、宿主植物の SL が関与するという 2 つ目の仮説の検証を試みた。まず、宿主植物の根滲出液が AM 菌感染促進効果を持つか検証するため、宿主植物・イネの根滲出液を添加しながら AM 菌接種試験を行った。その際、根滲出液は AM 菌感染イネと非感染イネから単離した。その結果、イネの AM 菌感染の有無に関わらず、イネ根滲出液の添加区における *P. kansuensis* の AM 菌の感染率の増加傾向は確認できなかった (図 20a)。

上記試験では、根滲出液を使用したため SL 濃度が十分ではなかった可能性がある。そこで次に、イネの根滲出液のアセトン抽出により SL を濃縮し添加試験をおこなった。アセトン画分において SL が含まれていることを確かめるために、*S. hermonthica* の発芽誘導試験をおこなったところ、イネでは 30% 程度、ミヤコグサでは 80% ほどの発芽誘導率が確認できたので、この画分に SL 類が含まれていることが確かめられた (図 20b)。しかし、この SL 類を含むアセトン画分の添加による *P. kansuensis* の AM 菌の感染率の増加は見られなかった (図 20a)。同様に、人工合成 SL アナログ \pm GR24 の添加もおこなったが、*P. kansuensis* の AM 菌の感染を促進する傾向は見られなかった (図 20a)。そこで、SL 生合成に欠損を持つイネを同じポットに植えて、*P. kansuensis* の AM 菌の感染に対する影響も確認した。*DWARF 10 (D10)* は 9-cis- β -アポ-10'-カロテナールを SL の前駆体であるカーラクトンへと変換する SL 生合成経路中の中枢酵素をコードする遺伝子である⁹⁴。この遺伝子の変異体であるイネ *d10* 系統では、SL の分泌による AM 共生促進機構を欠損するために AM 菌の菌糸侵入の減少や感染進行の遅延が報告されている (図 20c)⁹⁴。イネの *d10* 変異体と共に栽培した *P. kansuensis* では、野生型のイネ (シオカリ) を用いた場合と同レベルの AM 菌の感染が見られ、感

感染率が減少するような傾向は確認できなかった (図 20d)。また、イネ *d10* 変異体は、野生型のイネ (シオカリ) と同程度の感染率を示したが、本実験は 60 日間の長期栽培をおこなっているため、AM 菌感染遅延の影響が観察できなかったためであると考えられる (図 20e)。以上の結果は、本研究の実験条件下では宿主植物の根滲出液及び SL による AM 菌の感染促進は検出できなかったことを示す。

宿主植物の根滲出液中の SL によるシオガマギク属の根への AM 菌感染促進効果が確認できなかったため、SL 以外の根滲出液中の AM 菌感染促進物質候補の探索も試みた。いくつかの植物種が根から分泌するフラボノイドの一種であるケルセチン (quercetin) は AM 菌の感染促進効果が報告されていることから¹⁸、ケルセチン添加時におけるシオガマギク属の AM 菌接種試験も実施した。しかし、本試験に供した *P. kansuensis* の根における AM 菌の感染率は非常に少ないレベルであり、ケルセチンによる感染促進効果は確認できなかった (図 20a)。そのため、ケルセチンもシオガマギク属における AM 菌感染機構に関与する可能性が低いと考えられる。

4-4-4. 仮説 (3) 宿主植物と共生状態にある AM 菌による感染機構の検証

最後に、宿主植物に感染した AM 菌が何らかの状態変化を起こし、シオガマギク属の根に感染しやすくなった可能性を検証した。宿主植物が存在しながら AM 共生が起きない状態を再現するために、AM 共生能を欠損するイネの変異体と *P. kansuensis* を同じポットに植えて栽培する試験を実施した。本実験では、イネの AM 共生変異体として *ccamk* と *pollux* の 2 系統を用いた (表 3)。*ccamk* 及び *pollux* は、それぞれタンパク質リン酸化酵素 (Calcium and calcium/calmodulin-dependent serine/threonine-protein kinase: CCaMK) 及び、カリウムイオンチャネル (Pollux) の遺伝子の変異体である。AM 菌との共生成立過程の初期において、Pollux は Ca^{2+} スパイキング (核周囲で起きるカルシウム濃度の振動) の誘導に、CCaMK は Ca^{2+} スパイキングの受容に、それぞれ関

与し、共生シグナルの伝達を担っている⁹⁵。CSSP の中枢を担うこれらの遺伝子の変異体イネでは、AM 菌の菌糸が根に取り付いた後、表皮細胞まで侵入することはあるものの、皮層までは進行しないという表現型が報告されている⁹⁶。これらイネの AM 共生変異体との共栽培実験に供したところ、*P. kansuensis* の根における AM 菌の感染率の平均値は、野生型の日本晴の場合 5.7% であったのに対し、*ccamk* 及び、*pollux* 変異体の場合でそれぞれ 0.3% 及び、0% であった (図 21a)。すなわち、AM 共生変異体の共存は *P. kansuensis* の AM 菌の感染率を増加させないことが示された。なお、イネの AM 菌感染率の平均値は、野生型の日本晴、*ccamk*、*pollux* の順にそれぞれ 18%、1.6%、0.7% であった (図 21b)。AM 菌の共生器官である樹枝状体やのう状体は、イネの AM 共生変異体では観察できず、それと同じポットに植えた *P. kansuensis* においても観察できなかった。本実験の結果は、*P. kansuensis* の AM 菌感染には、AM 共生可能な植物との共存が必要であることを示す。

また、*P. kansuensis* とコシオガマ (AM 菌の感染率が非常に低い) の共栽培条件でも、いずれの植物個体の根においても AM 菌の感染は観察できなかった。この結果も、*P. kansuensis* に AM 菌が感染するために、AM 菌と共生中の植物が必要であることを支持する。

4-5. 室内実験におけるシオガマガイク属と AM 菌の共生関連遺伝子群の発現動態

AM 菌感染時のシオガマガイク属植物において既知の AM 共生機構が機能しているか明らかにするため、AM 共生関連遺伝子の発現解析を試みた。*P. kansuensis* のゲノムは、ほとんどの AM 共生遺伝子を喪失しているが、一部の遺伝子は保存されている。そこで、*P. kansuensis* のゲノム中に保存されている AM 共生関連 4 遺伝子 (*CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 7 (CCD7)*、*CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8 (CCD8)*、*REDUCED ARBUSCULAR MYCORRHIZATION 2 (RAM2)* 及び

FATTY ACYL-ACYL CARRIER PROTEIN THIOESTERASE M (FatM) を対象に解析を実施した。また、AM 菌側の応答も確認するために AM 菌の共生関連 3 遺伝子（リン酸輸送体遺伝子 *PHOSPHATE TRANSPORTER (PT)*、アンモニウム輸送体遺伝子 *AMMONIUM TRANSPORTER 2 (AMT2)* 及び、単糖輸送体遺伝子 *MONOSACCHARIDE TRANSPORTER 4 (MST4)*）も解析対象とした。まず、AM 菌との接触に対する反応が起きているか確認するため、*CCD7* 及び *CCD8* の 2 遺伝子を対象に qRT-PCR 解析を行った。これら 2 つの遺伝子は、AM 菌に対するシグナル分子である SL の生合成酵素遺伝子であるが、AM 共生するトマト (*Solanum lycopersicum*) の根においては AM 菌と接触してから早い時期（接触後 24 時間頃）に発現上昇することが報告されている⁹⁷。ニンジン毛根と共生中の AM 菌の菌糸に 24 時間接触させた *P. kansuensis* では、*CCD7* の発現は検出限界以下であった（図 22a, b）。また、*CCD8* は発現を検出できたものの、AM 菌の菌糸と接触させた後に発現上昇する傾向は確認できなかった（図 22b）。次に、AM 菌感染時のシオガマギク属の共生関連遺伝子の発現を調べるため、顕微鏡観察の結果に基づいて、AM 菌が感染している状態と考えられる AM 菌接種後 60 日の *P. kansuensis* の *RAM2* 及び *FatM* の 2 遺伝子を対象に qRT-PCR 解析を実施した。イネの *RAM2* は AM 菌の接種条件で発現上昇する傾向が確認できたのに対し、*P. kansuensis* の *RAM2* は発現量が非常に少ない上、AM 菌接種区と非接種区との間で発現量の差は見られなかった（図 23b）。また、*FatM* も同様に発現量が非常に低いレベルで、処理区間で発現量の差は見られなかった（図 23b）。以上の結果は、ゲノムに保存されている AM 共生関連遺伝子は、シオガマギク属の AM 菌の感染機構に関与しないことを示唆する。

さらに、AM 菌側の感染時の応答を確認するため、*P. kansuensis* の根から抽出した RNA を対象とした AM 菌側の共生関連遺伝子の qRT-PCR 解析を行った。AM 菌のリボソーム RNA (*ribosomal RNA: rRNA*) は、*P. kansuensis* 及びイネの両方で AM 菌接種区での発現が確認され、顕微鏡で観察した *P. kansuensis* の根への AM 菌の感染を支持

した (図 24c, d)。また、*P. kansuensis* の根において、AM 菌のリン酸輸送体遺伝子 *PT* 及び、単糖輸送体遺伝子 *MST4* は AM 菌接種区で発現が見られた (図 24e, f)。その一方で、AM 菌のアンモニウム輸送体遺伝子 *AMT2* は一部の個体で高発現していたものの、多くの個体では検出できなかった (図 24g、10 個体中 3 個体のみで発現が見られた)。まとめると、AM 菌側の一部の共生関連遺伝子は、シオガマギク属の根に感染している際にも発現していることが明らかになった。なお、イネの根では、AM 菌の輸送体 3 遺伝子 (*PT*、*AMT2*、*MST4*) のいずれもが、AM 菌接種区で発現していることが確認された (図 24h-j)。

4-6. 室内実験におけるシオガマギク属の生育に対する AM 菌の接種効果

これまでの実験結果から、シオガマギク属における AM 菌感染は、周囲に AM 菌の宿主となる植物が存在する条件で促進されると考えられた。そして、植物において既知の AM 共生関連遺伝子が関与しない感染経路によって AM 菌がシオガマギク属の根に感染することが示唆された。そこで次に、シオガマギク属が他の AM 共生する植物と同様に、AM 菌と相利共生を行っているかどうかを検証した。AM 菌の感染がシオガマギク属の生長やリン吸収に与える影響を調査するため、AM 菌の接種効果 (生長やリン吸収の促進効果) が検出されやすいリン欠乏条件下で栽培した *P. kansuensis* のバイオマスやリン含有量を測定した。AM 菌の接種から 60 日後の *P. kansuensis* 地上部の乾燥重量を測定した結果、宿主植物が存在しない単独条件では、AM 菌の接種区及び非接種区の間で有意な差は認められなかった (図 25a)。宿主植物・イネとの共栽培条件では、*P. kansuensis* の地上部の乾燥重量は、AM 菌接種区において乾燥重量の平均値がやや大きい傾向が見られたが、接種区と非接種区との間で統計的に有意な差は認められなかった (図 25a)。また、AM 菌接種・非接種のいずれの処理区においても、宿主植物・イネとの共栽培条件において *P. kansuensis* 全個体の根に寄生器官で

ある吸器の形成が観察され（1 個体あたり平均 10 個）、その地上部の乾燥重量も大きかった（図 25a）。さらに、*P. kansuensis* の地上部のリン含有量の測定結果、単独条件および宿主植物との共栽培条件のいずれの場合においても、AM 菌の接種区と非接種区との間でリン含有量の差は検出できなかった（図 25c）。ただし、AM 菌接種・非接種のいずれの処理区においても、宿主植物・イネとの共栽培条件で *P. kansuensis* の地上部のリン含有量が大きい傾向が見られた（図 25c）。以上の結果は、宿主植物への寄生は *P. kansuensis* の地上部のバイオマスやリン吸収量を増加させるが、AM 菌の接種はバイオマスやリン吸収に対して影響を与えないことを示す。

酸性土壌及び低温条件における *P. kansuensis* の地上部の乾燥重量も測定したが、リン欠乏条件下と同様に、AM 菌の接種区と非接種区との間で差は見られなかった（図 26）。そのため、少なくとも今回検証することができたリン欠乏、酸性土壌、低温の 3 条件下では AM 菌の接種はシオガマグクの生長に影響を与えないことが示された。

リン欠乏条件下のイネの地上部の乾燥重量については、単独条件で栽培したイネでは AM 菌接種区で大きくなる傾向が見られたが（図 25b）、*P. kansuensis* との共栽培条件下のイネでは AM 菌接種区と非接種区との間で有意な差は見られなかった（図 25b）。その一方、*P. kansuensis* との共栽培条件及び単独条件の比較では、イネの地上部の乾燥重量は *P. kansuensis* との共栽培によって増加する傾向が見られ、特に AM 菌非接種条件下で顕著な差が見られた（図 25b）。リン含有量に関しても、単独条件下では AM 菌接種区で大きくなる傾向が見られたが（図 25d）、*P. kansuensis* との共栽培条件下では AM 菌接種区と非接種区との間で有意な差は見られなかった（図 25d）。しかし、*P. kansuensis* との共栽培条件及び単独条件の間で比較すると、イネの地上部のリン含有量は *P. kansuensis* との共栽培条件で明らかに大きくなる傾向が見られた（図 25d）。これらの結果は、単独で生える場合は AM 菌の感染がイネの地上部のバイオマスやリン含有量を増加させるが、共栽培条件の場合は *P. kansuensis* による

栄養吸収の影響を受けたために、イネにおける AM 菌の接種効果が十分に表れなかった可能性がある。

4-7. 野外の土壌を用いたシオガマギク属の内生真菌の単離と同定

前項の解析結果からは、シオガマギク属が AM 菌の感染により栄養吸収の利益を受ける通常の共生関係にあるとは考えられなかった。しかし、野外の植物個体の調査で AM 菌の感染が頻りに観察されたことから、シオガマギク属は栄養交換以外の面で AM 菌との関係を構築している可能性が考えられた。AM 菌は植物の病原菌への抵抗性を向上させることも知られていることから^{6,7,8}、シオガマギク属の AM 菌感染は病原菌などの真菌類から身を保護することに関係していることも考えられた。また、菌叢解析において AM 菌以外の内生真菌も多く検出されたので、AM 菌の感染がシオガマギク属と他の内生真菌との関係性に影響を及ぼすことも考えられた。そこで、AM 菌及び他の内生真菌の関係がシオガマギク属の生長に影響を与えるか検証するため、シオガマギク属の内生真菌の単離と同定を試みた。本学構内から採取した土壌に植え付けて栽培した *P. kansuensis* 25 個体の根を MMN 培地に置いて培養したところ、11 個体の根を置いた培地において真菌様のコロニーの増殖が観察された。これらの真菌コロニーについて、シーケンス解析を行って ITS 領域の塩基配列を取得し、BLAST 検索及び系統解析を実施した結果、6 系統の真菌 (*Cadophora orchidicola*、*Gibellulopsis* sp.、*Ceratobasidium* sp.、*Colletotrichum pisi*、*Paraphoma* sp.、*Ochroconis constricta*) が同定された (図 27-32、表 13)。文献調査の結果、これらの真菌のうち、*Ceratobasidium* sp. はラン科植物の共生菌であるラン菌根菌とする報告がある一方^{98,99,100}、バラ科やマメ科などの植物において根腐れなどの症状を引き起こす病原菌という報告も存在した^{101,102}。*Cadophora orchidicola* はラン科やリンドウ科 (*Gentianaceae*) などの植物内生菌として報告があった^{103,104}。また、*Ochroconis constricta* は土壌菌として報告があり

¹⁰⁵、それ以外の 3 系統 (*Gibellulopsis* sp.、*Colletotrichum pisi*、*Paraphoma* sp.) はアブラナ科やマメ科などの植物に根腐れや立ち枯れなどの症状を引き起こす病原菌として認識されていた^{106,107,108}。なお、単離された真菌のうち 4 系統 (*Cadophora orchidicola*、*Ceratobasidium* sp.、*Colletotrichum pisi*、*Paraphoma* sp.)に関しては、同属の真菌が 4-1 のメタゲノム解析において日本の野外に自生するシオガマギク属植物種からも検出された (表 1)。また、これら 4 系統の真菌のいずれかが検出されたミヤマシオガマ (Pa) 及びヨツバシオガマ (Pc) 個体の根からは同時に AM 菌も検出されていた (表 1)。

4-8. 室内実験におけるシオガマギク属に対する単離真菌の接種及び AM 菌との共接種の効果

菌叢解析においてシオガマギク属の根からラン菌根菌などの植物共生菌類が検出されたので、前項で単離された真菌類もシオガマギク属と関係を持つ可能性が考えられた。そこで、単離された真菌 6 系統について、*P. kansuensis* に接種を行ってその生長に与える影響を調べた。これらの真菌の接種後 60 日時点における *P. kansuensis* の生存率は、非接種区で 100% (n=15) であったのに対し、それぞれ真菌 P7 接種区で 56% (n=16)、P9 接種区で 100% (n=12)、P17 接種区で 81% (n=16)、P18/20 接種区で 42% (n=12)、P19 接種区で 67% (n=9)、P21 接種区で 35% (n=17) であった。このうち、真菌 P9、P18/20、P19 の接種区では接種後 60 日における *P. kansuensis* の地上部の乾燥重量が、対照区 (真菌非接種) 及び AM 菌接種区と比較して、増加する傾向が見られた (図 33)。一方、真菌 P17 接種区の *P. kansuensis* の地上部の乾燥重量は、対照区 (真菌非接種) 及び AM 菌接種区と比較して、著しく減少していた (図 33)。真菌 P7、P21 の接種区の *P. kansuensis* の地上部の乾燥重量は、対照区 (真菌非接種) 及び AM 菌接種区と比較して、統計的に有意な差は認められなかった (図 33)。

次に、植物内生菌として報告がある *Cadophora orchidicola* として同定され、生育に

影響がなかった真菌系統 P7、ラン菌根菌及び植物病原菌として報告がある *Ceratobasidium* sp. として同定されて顕著な生育阻害効果を示した真菌系統 P17 の 2 系統について、AM 菌と共接種し、内生真菌がシオガマギク属の AM 菌感染に及ぼす影響を検証した。AM 菌と真菌 P7 または P17 とを共接種した *P. kansuensis* を 60 日間栽培し、植物体の地上部の乾燥重量を測定した。比較解析の結果、共接種区で生育した植物は、真菌 P7 及び P17 の単独接種区のみならず、対照区や AM 菌の単独接種区と比べても大きい傾向が見られた (図 34a, b)。さらに、共接種がリン吸収に与える影響を評価するため、AM 菌と真菌 P7 または P17 の共接種区における *P. kansuensis* の地上部のリン含有量を測定した。その結果、*P. kansuensis* の地上部のリン含有量は、対照区 (内生真菌非接種) や各真菌の単独接種条件下と比べ、AM 菌と真菌 P7 または P17 の共接種区では大きくなる傾向が見られた (図 34c)。この結果は、AM 菌と真菌 P7 や P17 の共接種がシオガマギク属のリン吸収に正の効果を与えることを示す。その時点における *P. kansuensis* の AM 菌の感染率を測定した結果、真菌 P7 共接種区で平均 3.0%、真菌 P17 共接種区で平均 1.4% で、対照区 (内生真菌非接種かつ単独栽培の条件) とは統計的に有意な差は認められず、宿主植物 (イネ) との共栽培条件よりも低い感染率を示した (図 35a)。また、採取した *P. kansuensis* の根サンプルから抽出した DNA を内生真菌 P7 及び P17 の系統特異的プライマーセットを用いた PCR 解析に供し、接種した内生真菌が感染しているかどうか確認したところ、それぞれの内生真菌の単独接種時には検出できたものの、AM 菌との共接種時にはいずれの真菌も検出限界以下であった (図 35b, c)。これらの結果は、共接種試験は、AM 菌及び内生真菌 2 系統のいずれについても感染量を増加させないことを示す。すなわち、根の周囲の土壌環境中で起きる AM 菌と内生真菌の間の相互作用が、間接的にシオガマギク属の生長や栄養吸収に影響を与えている可能性を示す。

5. 考察

5-1. AM 菌と特定の真菌類によるシオガマギク属の生長促進

先行研究の顕微鏡観察⁷³及び本研究の網羅的な菌叢解析によって野外のシオガマギク属の複数の植物種の根に AM 菌の感染が確認され、シオガマギク属が AM 菌と何らかの関係を構築していることが示唆された。また、野外のシオガマギク属の根から、外生菌根菌やラン菌根菌などの AM 菌以外の菌根菌も検出されたことから、AM 菌だけでなく、様々な植物共生菌類と関係を持つ可能性も考えられた。そして、実際、室内実験において、シオガマギク属の根に感染させることでトラップした内生真菌類と AM 菌とを共接種する試験を実施したところ、シオガマギク属の生長が促進されるという興味深い結果が得られた。

AM 菌のみを単独接種したシオガマギク属の生育状態を調査した結果、少なくともリン欠乏、酸性土壌、低温の条件では、AM 菌の接種による生長やリン吸収の促進傾向は検出できなかった。感染率が低いために AM 菌の接種効果が十分に表れなかった可能性や、試験に供した以外の環境ストレス条件や複数ストレスの複合条件などにおいて AM 菌の接種がシオガマギク属の生長に影響を与える可能性は否定できないが、本研究で得られた結果からは、AM 菌単独でシオガマギク属の生長に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

本研究では、単独接種時にシオガマギク属の生育を抑制する真菌（真菌 P17: *Ceratobasidium* sp.）を見出した。この真菌 P17 は、単独で存在する場合、病原菌のようなシオガマギク属植物の生育に悪影響を及ぼす真菌類であると推定される。しかし、この真菌 P17 に AM 菌を加えた共接種条件下ではシオガマギク属の生長が促進される傾向が見られた。さらに、単独接種ではシオガマギク属の生長に影響を及ぼさなかったもう一つの真菌（真菌 P7: *Cadophora orchidicola*）と AM 菌との共接種で

も、同様の生長促進傾向が観察できた。AM 菌とこれら 2 系統の真菌の共接種がシオガマギク属の生長を促進したことは、AM 菌と特定の真菌が組み合わさることでシオガマギク属に対する生長促進効果が表れることを示す。AM 菌とこれらの真菌の共接種でリン吸収量の増加傾向が見られたことから、2 種類の真菌が根内あるいは根圏（植物根の影響を直接受ける土壌領域）に共存することで、いずれかの真菌がシオガマギク属へリン栄養を供給するようになるか、あるいは両者が協調的に土壌中のリンを吸収しやすい様態に変化させているなど、何らかの植物の栄養吸収を支援する仕組みの存在が示唆される。これまでにも、AM 菌と内生真菌類の共接種によって、植物の生長が促進されるという現象自体は報告されている。例えば、植物内生真菌 *Trichoderma viride* との共接種はタマネギ (*Allium cepa*) の生長を促進すること¹⁰⁹、また腐生菌 *Fusarium oxysporum* との共接種がエンドウ (*Pisum sativum*) の生長やリン・窒素の吸収量を向上させることが報告されている¹¹⁰。これらの事例の場合、共接種下で AM 菌の感染量の増加も同時に観察されていることから^{109,110}、AM 菌から受け取る栄養の量が増えて植物の生長が促進されたことが考えられる。しかし、シオガマギク属では、内生真菌との共接種下でも AM 菌の感染率が非常に低いレベルであったため、内生真菌の存在が AM 菌の感染を促し、感染した AM 菌が栄養を直接シオガマギク属に供給している可能性は低いと考えられる。また、内生真菌の単独接種時にも生長促進効果は見られなかったことや、AM 菌との共接種時に内生真菌の感染量が低下する傾向が見られたことから、内生真菌も直接的に栄養供給しているとも考えにくい。その一方、AM 菌や外生菌根菌は土壌中に伸ばした菌糸から酸性ホスファターゼを分泌していることが明らかになっており^{111,112}、これらの真菌類は、ホスファターゼを分泌して土壌中の有機態リン酸を無機リン酸へと変化させて吸収していることが示唆されている¹¹³。このような知見を考慮すると、AM 菌や内生真菌の菌糸が土壌中のリンを植物根が吸収可能な状態へと変化させる現象が起き得ることが考えられる。単

独接種時には根圏のホスファターゼ活性は不十分であるが、2種の真菌が存在することでホスファターゼ活性が上昇し、シオガマギク属のリン吸収量にも影響が及んだ可能性は考えられる。このように、AM菌と特定の真菌の共存が根圏土壌の化学性質を変化させてシオガマギク属の栄養吸収をサポートしている仮説が考えられる。今後、AM菌と真菌 P7 や P17 との共接種条件下の栽培土壌において、ホスファターゼ活性の測定や、可給態リン量など植物が吸収可能な様態の栄養素の定量分析が必要である。これらの解析によって、根圏のホスファターゼ活性や植物が吸収可能な様態の栄養素が共接種条件下で増加することが示されれば、上述の仮説を支持する証拠が得られると考えられる。一方、異なるメカニズムも考えられ、土壌中で栄養や生育空間をめぐる AM菌と他の真菌の間で競合が起きており、この真菌間で起きる競争が間接的に植物に利益を提供している可能性も考え得る。具体的には、AM菌の存在によって他の真菌類の菌糸伸長や増殖が抑制された結果、内生真菌の生育阻害効果が減少したことなどが考えられる。培地上で AM菌と単離された真菌を共培養してそれぞれの菌体の生育状況を観察し、真菌間の競合が起き得るか確認が必要である。根圏環境の詳細な解析や培地上での真菌間の相互作用の解析によって、AM菌及び特定の真菌によるシオガマギク属の生長促進メカニズムの解明が期待される。なお、本研究のポットでの栽培条件では、栽培期間全般を通じて完全無菌の状態を維持することはできないため、栽培した植物は接種した真菌以外の微生物の混入の影響を受けている可能性にも留意する必要がある。また、本研究では、*P. kansuensis* の本来の自生地とは異なる土壌に由来する真菌を単離したため、実際の自然界における生命現象を正確に捉えているわけではないことに留意する必要がある。しかしながら、菌叢解析において野外のシオガマギク属の同一個体の根から AM菌と共に真菌 2 系統（真菌 P7: *Cadophora orchidicola*、真菌 P17: *Ceratobasidium* sp.）と同属の真菌類が検出されたことを踏まえると、自然界においても今回発見されたような AM菌と他の真菌類との相

相互作用がシオガマギク属の生長に影響を及ぼしていることが示唆される。自生地に実験区を設け、真菌類の共接種試験を行うことで、シオガマギク属の生育における AM 菌及び特定の真菌類の共存の重要性が明らかにできると考えられる。

5-2. 宿主植物によるシオガマギク属の AM 菌感染促進機構

イネなどの宿主植物の共存条件下でシオガマギク属の根における AM 菌の感染量が増加したことは、非生物的環境ストレス以上に宿主植物が AM 菌の感染促進において重要な役割を担っていることを示唆する。シオガマギク属の宿主植物の AM 菌感染率が高いほど、共栽培したシオガマギク属の AM 菌も高い傾向が見られたことから、宿主植物における AM 菌の感染量がシオガマギク属の AM 菌感染にも影響を与えていることが考えられる。宿主植物による AM 菌感染促進機構として、1) 吸器を介した根同士の連結を通して AM 菌がシオガマギク属へ侵入する可能性 (図 18a)、2) 宿主植物から分泌された SL 類によってシオガマギク属の AM 菌感染が促進される可能性 (図 18b)、3) 宿主植物に感染することで共生特異的な状態にある AM 菌がシオガマギク属の根にも感染しやすい状態になる可能性 (図 18c) の 3つの仮説が考えられた。本研究での様々な条件検討の結果、3つ目の仮説を示唆する結果が得られた。

メッシュを置いて根の連結が生じないようにした実験で、シオガマギク属の根で AM 菌の感染が確認されたことから、宿主植物との根の連結が必須ではないことが示された。また、AM 菌が付着器を形成して、あるいは根の間隙を通して侵入する様子が観察されたことも、AM 菌が宿主植物との根の連結を介さず、直接的にシオガマギク属の根に侵入することを支持する。ただし、これまでに吸器を経由して宿主植物の根からシオガマギク属の根へと AM 菌が感染する様子を観察しているため⁷³、吸器を介した感染経路は存在するが、宿主植物の共存による感染促進の主要因ではないと考えられる。

宿主植物の根滲出液や SL、フラボノイドの添加実験の結果から、宿主植物の根滲出

液または SL が感染促進に関与する可能性は低いと考えられる。ただし、根滲出液などの添加実験に関しては、本研究の実験環境下で可能な方法や条件を複数試したが、添加濃度が不十分であったなど、実験要因によって AM 菌感染促進効果が十分に確認できなかった可能性にも留意する必要がある。しかし、イネ *d10* 変異体を用いた実験の結果、シオガマギク属の根において、野生型イネと共に生育させた場合と同程度の AM 菌感染が確認されたことは、シオガマギク属の AM 菌感染において、少なくとも宿主植物の SL は影響しないことを示唆する。なお、本研究では、AM 菌接種後 60 日間という長期に及ぶ実験の結果、イネ *d10* 変異体の根においても野生型イネと同程度の感染率で AM 菌の感染が見られた。先行研究におけるイネ *d10* 変異体の AM 菌感染機序の観察では、感染の遅延や減少は付着器の形成率の減少、すなわち、根への菌糸侵入の減少に起因することが推定されている⁹⁴。そのため、SL は AM 菌の菌糸分岐を促し、菌糸が植物根に接触する確率を上げるという点で感染に重要な役割を果たすものの、菌糸が植物根に接触して侵入することができれば、SL 生合成変異体でも通常通り共生できるようになる。長期間の栽培では AM 菌が成長して土壌中の菌糸密度が増加するため、SL が存在しなくても菌糸が植物根に接触でき、*d10* 変異体でも野生型イネと差がないレベルの感染率になると考えられる。

イネの AM 共生変異体 (*ccamk* 及び *pollux*) との共栽培条件下の AM 菌感染実験において、シオガマギク属の AM 菌の感染率が減少するという結果が得られたことから、シオガマギク属の AM 菌感染には AM 菌と共生している宿主植物が近接して存在することが重要であると考えられる。AM 菌は絶対共生菌であり、孢子形成には宿主植物との共生が必須であることが知られている。すなわち、共生状態の AM 菌と非共生状態の AM 菌は少なくとも孢子形成能力の面で性質が異なることが示唆される。シオガマギク属への感染においても、共生状態の菌は感染しやすい性質を持つ可能性が考えられる。また、近年の研究により、培地に脂肪酸を添加することによって宿主植物が存

在しない条件においても孢子形成が起こることが明らかとなった^{114,115}。このことは、宿主植物が供給する脂肪酸またはその分解産物が AM 菌の性質を変化させることを示唆しており、宿主植物が AM 菌に供給する物質がシオガマギク属への感染に影響を与える可能性もある。植物根と共生状態の AM 菌と非共生状態の AM 菌との間で RNA-sequencing (RNA-seq) 解析を行って遺伝子発現動態を比較した研究において、糖類などの炭素栄養を感知するシグナル伝達経路 (Sucrose Non-Fermenting 1 protein kinase (SNF1) や cAMP-dependent Protein Kinase A (cAMP-PKA)) に含まれる遺伝子群の発現が植物根との共生時に発現上昇することが明らかにされている¹¹⁶。さらに、植物根と共生させた AM 菌の qRT-PCR 解析において、上述の経路に関連する遺伝子群 (*SNF1*、*SNF4*、*CYR1*、*PDE2*、*BCY1*、*TPK1*、*TPK3* など) が共生初期に高発現していたことから、炭素栄養の感知が付着器形成や菌糸侵入の調節にも関与することが示唆されている¹¹⁶。AM 菌が共生相手の宿主植物から栄養素を受け取ったことで、付着器形成や菌糸侵入を促進する遺伝子プログラムが駆動し、シオガマギク属への菌糸侵入も促進された可能性も考えられる。2 枚のメッシュを用いて宿主植物と 1 cm 程間隔を開けた感染実験では、シオガマギク属の根における AM 菌感染率が著しく低下した。この結果から、シオガマギク属への AM 菌感染には、シオガマギク属と宿主植物の根同士が近接する必要があり、共生特異的な生理状態の AM 菌と宿主植物根からの分泌物質の両者が必要な可能性も考えられる。

5-3. シオガマギク属の根における AM 菌の菌糸侵入の様式

シオガマギク属に感染する AM 菌の表現型の顕微鏡観察から、マメ科やイネ科などの植物で観察されてきた AM 菌の感染経路とは異なる経路の存在が示唆された。これまでに植物において知られてきた感染経路では、AM 菌が根の表面に付着器を形成し、菌糸が根の表皮細胞を貫通した後、次いで皮層の細胞間隙に進行しつつ、皮層の細胞に

分岐した菌糸を侵入させて樹枝状体を形成する感染様式が観察されてきた。シオガマギク属の根においてもこの感染様式は観察されたが、多くはなかった。イネにおいて、AM 共生成立過程の CSSP に関する遺伝子 (*CASTOR*、*POLLUX*、*CCaMK*、*CYCLOPS*) の各変異体では、菌糸が表皮細胞には侵入しても皮層まで進行しない様子や、根の表面や表皮細胞内において菌糸が分岐したり、腫れたように膨れ上がったたりする様子が観察されている⁹⁶。また、周囲に植えた植物（生きている植物）と共生する AM 菌をトウモロコシの根断片（死んでいる植物の根）に感染させることを試みた実験では、トウモロコシの根断片に AM 菌が感染し、樹枝状体は形成しないが、多量ののう状体を形成したことが報告されている¹¹⁷。シオガマギク属の根でも、イネ変異体やトウモロコシの根断片での観察結果と似た AM 菌の表現型を確認した。CSSP 遺伝子を含む共生関連遺伝子の多くを持たないシオガマギク属では、AM 共生関連遺伝子が機能しない変異体と同様に、通常の方式による AM 菌の感染が起きにくい状態であることが予測される。シオガマギク属の根の AM 菌の感染率が、同一環境下で栽培したイネや *L. philippensis* などの通常に AM 菌と関係をもつ植物と比べて低いことも、AM 菌の感染の頻度の低さを裏付けている。また、シオガマギク属の根では、菌糸が根に侵入する直前で分岐し、複数箇所から表皮への侵入を試みている例や、菌糸が根の傷口から侵入を試みている例がしばしば観察されたため、表皮に存在する何らかの間隙を通じた菌糸の侵入が多い可能性が考えられる。菌糸の侵入口として利用される間隙としては、本研究で観察されたような根の表面に生じた傷口などが想定される。さらに、この菌糸の侵入方法は、マメ科植物とその共生細菌・根粒菌の共生成立過程において観察される *crack entry* と呼ばれる侵入方法に似た様式とも考えられる。根粒菌の侵入機構として、感染糸を利用する方法と *crack entry* による方法の 2 種類あることが知られている。前者は、マメ科植物が根毛先端からチューブ状の通路である感染糸 (*Infection Thread*) を形成し、その中で根粒菌が細胞分裂をしながら進行して先端に達するとエンドサイトーシスによって植

物細胞内に取り込まれることで侵入する方法で、ミヤコグサやタルウマゴヤシなどで観察される^{96,118}。後者は、側根基部の割れ目や表皮細胞間の隙間から侵入する方法で、クサネム属 (*Aeschynomene*) やラッカセイ属 (*Arachis*) において観察され、マメ科植物の25% 程がこの方法を用いているとの推計もある^{118,119}。本研究で確認された AM 菌の菌糸がシオガマギク属の根の傷口から侵入を試みている例は、根の表皮に存在する間隙から侵入するという点で、後者の根粒菌の crack entry と共通している。そのため、シオガマギク属の AM 菌の侵入過程においても crack entry に似た仕組みが利用されていることが推察される。

5-4. シオガマギク属への AM 菌感染の分子機構

遺伝子発現解析の結果から、シオガマギク属のゲノムに残存する AM 共生関連遺伝子は機能していないことが示唆された。AM 共生する植物において AM 菌との接触後早期に発現上昇する *CCD7* と *CCD8* の 2 遺伝子は、AM 菌に対するシグナル分子である SL の生合成酵素遺伝子であり、植物が AM 菌と共生を開始する段階において重要な役割を果たす。AM 菌のシグナルに応答して SL 生合成酵素の発現量が上昇し、SL 生合成を加速することによって SL 分泌量が増加し、結果的に AM 菌の菌糸分岐がより促進されて、菌糸との接触頻度が上がると考えられる。しかし、シオガマギク属では、このような AM 菌との接触によって誘導される SL 生合成酵素遺伝子 (*CCD7*, *CCD8*) の発現上昇傾向が見られなかった。すなわち、シオガマギク属では AM 菌と接触しても SL 生合成は活性化されないと考えられる。また、同じくゲノムに保存されている共生関連 2 遺伝子 (*RAM2* 及び *FatM*) も、AM 菌が感染していることが確かめられた接種後 60 日のシオガマギク属において発現量が上昇する傾向は見られなかった。イネの *RAM2* の発現データでも示されているように、通常 AM 共生をする植物で、これらの遺伝子は AM 菌が感染している時期に高発現している。そして、*RAM2* 及び

FatM はいずれも AM 菌に供給する脂質の生合成に関与する酵素で³⁸、AM 菌の脂質獲得に重要な役割を果たす。タルウマゴヤシの変異体では、AM 菌の付着器や樹枝状体の形成異常を誘発するので^{40,120}、RAM2 や FatM は AM 菌の菌糸侵入や共生器官形成にも関与していると考えられている。しかし、本研究の実験条件の解析結果からは、シオガマギク属と AM 菌との関係においてこれら共生関連 2 遺伝子は機能しておらず、シオガマギク属における AM 菌感染機構に関係しない可能性が高いと推定される。シオガマギク属の AM 菌感染機構には、既知の植物の AM 共生関連遺伝子が関与しない特殊な仕組みによって生じている可能性が高く、シオガマギク属固有の遺伝子が樹枝状体などの器官形成に関与していると考えられる。今後は、網羅的な遺伝子発現解析によって AM 菌の感染時特異的に発現する遺伝子を見出して機能解析を行い、シオガマギク属の AM 菌感染に関連する候補遺伝子の探索が必要である。

一方、感染している AM 菌側の共生関連遺伝子は一部機能している可能性も考えられた。AM 菌のリン酸輸送体遺伝子 *PT* や単糖輸送体遺伝子 *MST4* はシオガマギク属の根に感染している時にも発現する傾向が見られたため、シオガマギク属と AM 菌との間で少ないながらもリンや糖の輸送が起きていることが示唆された。また、アンモニア輸送体遺伝子 *AMT2* も AM 菌感染時の一部個体の根で発現が見られたので、窒素栄養の輸送が行われている可能性も否定できない。しかし、リン欠乏条件下で AM 菌の接種時におけるシオガマギク属のバイオマスや生体内リン含有量が増加も減少もしなかったという結果からは、仮に栄養の輸送は機能していても、その輸送能力は低く、シオガマギク属植物の生長に影響を与える程ではないと考えられる。リンや窒素などの栄養素が AM 菌からシオガマギク属に移行しているか確認する追跡実験の実施により、シオガマギク属と AM 菌と間の栄養輸送の実態の解明が期待される。加えて、植物と AM 菌の間ではリンや窒素、炭素栄養以外の栄養素が輸送されている可能性もある。現在は AM 菌の他の栄養素の輸送体に関する知見が不十分なために実施できなかった

が、その他の物質輸送についても確認する必要がある。

5-5. シオガマギク属の AM 菌感染機構の特徴

AM 菌と共生する植物と共に育てることで本来 AM 共生しない植物に AM 菌が感染し得るという現象は、これまでも報告されている。AM 菌と共生しているマメ科のタルウマゴヤシと同じポットに植えて栽培することで、アブラナ科のシロイヌナズナでも AM 菌の感染がわずかに生じることが報告されている^{41,43}。この現象は、宿主植物によるシオガマギク属の AM 菌感染促進機構と類似しているようにも見える。シロイヌナズナの根で AM 菌の樹枝状体が形成されると述べる文献も存在するが⁴²、詳細な顕微鏡観察や遺伝子発現解析を行った研究では樹枝状体形成が全く確認できなかったと報告されている^{41,43}。野外で採取した植物個体及び、実験室内で栽培した植物個体の観察において、シオガマギク属の根では少ないながらも AM 菌の樹枝状体が見られたことから、シオガマギク属の根ではシロイヌナズナよりも樹枝状体が形成されやすい状態にあると考えられる。また、シロイヌナズナの場合、感染した AM 菌の共生関連遺伝子 (*PT*、*AMT2*、*MST4*) の発現がいずれもほとんど検出できなかったと報告されているが⁴³、シオガマギク属の場合は発現上昇する傾向のある遺伝子も存在したため、栄養輸送の実態に関してもシオガマギク属とシロイヌナズナでは少し異なる状態の可能性がある。今回解析対象とした輸送体は樹枝状体の生体膜上に存在することから (図 23b)、樹枝状体の形成の有無が栄養素の輸送体の発現に関係していることも推測される。

条件的寄生植物であるコシオガマ (コシオガマ属) は、シオガマギク属に系統的に最も近縁な属と推定されているが⁵⁸、AM 菌の感染状況に関してシオガマギク属とは差が見られた。具体的には、コシオガマでは AM 菌の感染率が非常に低く、樹枝状体の形成も全く見られないという点である。先行研究の比較ゲノム解析において、この 2 属のゲノムは、通常の植物が有する AM 共生特異的遺伝子群のほとんどを喪失している

ことが確認されている (Kee Yee Jia et al., unpublished)。さらに、2 属のゲノムに保存されている共生関連遺伝子も共通しており (*RAM2* 及び *FatM* の 2 遺伝子)、ゲノムの比較では大きな差が見られない (Kee Yee Jia et al., unpublished)。しかし、野外調査や実験室内での接種試験の結果からは、この 2 属間では AM 菌との関係性がやや異なると推測され、シオガマギク属はコシオガマ属よりも AM 菌の感染を誘導しやすく、樹枝状体の形成をも可能とするような特異的な仕組みを有していることが推察される。シオガマギク属において、樹枝状体の形成が可能となる遺伝・生理的な要因に関して、今後解明を進める必要がある。

5-6. シオガマギク属における AM 菌感染と環境ストレスとの関係

室内実験において、高山環境で頻繁に起こり得る土壌性質や気候などの非生物的環境ストレスは、シオガマギク属の AM 菌感染にはほとんど影響を及ぼさなかったが、リン欠乏及び酸性土壌に置いた一部の個体では AM 菌の感染がわずかに見られた。リン欠乏や酸性土壌は植物にとって重大なストレスである。リンは核酸や細胞壁などの構成成分であり、エネルギー代謝やタンパク質の合成、遺伝情報の伝達などにおいても重要な役割を担っている。植物におけるリンの欠乏は、葉の変色や、葉や個体そのものの矮小化、開花や結実の減少などを引き起こす。また、酸性土壌も間接的に植物のリン吸収に影響を与えることで、植物のリン欠乏を誘導することが明らかにされている。強酸性状態（特に pH 5 以下）は土壌中の鉱物からの Al^{3+} の溶出量を増加させ、この溶出した Al^{3+} がリン酸イオンを捕捉してしまうために、植物が吸収できるリン酸イオンの濃度は極端に低下してしまう¹²¹。また、同時に Al^{3+} は生長の活発な根端に集積することで根の伸長を著しく阻害してしまう¹²¹。つまり、強酸性土壌で植物はリン欠乏状態に陥るが、根を伸長させてリン酸の吸収が可能な場所へ根域を広げることもできなくなる。通常、こうしたリン欠乏状態に陥った植物は、SL などのシグナル分子を分泌すること

で AM 共生を促進し、リンを獲得している。リン欠乏及び酸性土壌条件の一部個体において AM 菌の感染が見られたことから、シオガマギク属の AM 菌感染機構にもリン欠乏が関連する可能性が考えられる。本研究では限られた環境条件の試験しか行えず、環境ストレスによる統計的な感染促進を捉えることはできなかったが、生息地において起こり得る極限環境条件がシオガマギク属の AM 菌感染に影響を及ぼす可能性があるため、さらなる感染条件の検証が必要である。例えば、有害元素などを含む通常の植物が生育しにくい特殊な土壌条件である蛇紋岩土壌や石灰岩土壌に生える植物の適応メカニズムに AM 菌が関与していることも示唆されており^{122,123,124}、こうした特殊土壌環境における AM 菌接種効果についても検証する必要があると考えられる。

5-7. 高山環境におけるシオガマギク属と菌根菌

植物根の真菌群集のメタゲノム解析では、シオガマギク属と同所的に生える非寄生性高山植物との間で真菌群集構造に異なる部分も発見された。具体的には、真菌群集に占める AM 菌の割合は両者で明確な差異がないが、シオガマギク属の根の真菌群集に外生菌根菌やラン菌根菌などの AM 菌以外の菌根菌がある程度含まれることである。特に、AM 菌が感染していないタカネシオガマや、根の真菌群集における AM 菌の割合が少なかった北海道の大雪山の植物個体では、外生菌根菌が多く検出される傾向が見られた。本来、外生菌根菌やラン菌根菌は特定の宿主植物種と共生する傾向にあると言われており、例えば、外生菌根菌はブナ科やヤナギ科、マツ科の植物などと、ラン菌根菌はラン科植物と、それぞれ共生関係を築くことが知られる³。その一方で、これまでも野外のシオガマギク属植物の根の形態観察で、外生菌根菌の感染が報告されている¹²⁵。こうしたことから、シオガマギク属植物は、AM 菌だけでなく外生菌根菌やラン菌根菌とも深い関係を持つ可能性が考えられる。マツ科の植物は外生菌根菌と共生し、AM 菌とは共生しないため、AM 共生特異的遺伝子のほとんどを喪

失していることが報告されている¹²⁶。しかし、AM 共生に関わることが知られる遺伝子 *RAM2* のみはマツ科植物でも保存されており¹²⁶、この現象はシオガマギク属のゲノムで *RAM2* が保存されているという解析結果と類似している。さらに、タルウマゴヤシの *ram2* 変異体で病原菌の感染が増加することから、*RAM2* は AM 菌だけでなく様々な真菌類の感染に関与することが示唆されている^{120,127}。これらの知見から、*RAM2* は外生菌根共生にも必須な遺伝子であるとも予想されている¹²⁶。AM 菌感染時にシオガマギク属で発現上昇が確認されなかったことを考慮すると、ゲノムに保存されている *RAM2* などの一部の AM 共生関連遺伝子は、シオガマギク属が外生菌根菌やラン菌根菌との関係を構築する際に活用されている可能性も考えられる。

山岳地帯では、標高が高くなるにつれて植生が貧弱になり、それに伴って土壤中の AM 菌の孢子数や植物根の AM 菌感染量が減少する傾向が報告されている^{44,128}。この傾向に対し、植物の根の真菌群集に占める外生菌根菌やその他の内生真菌の割合は、標高の上昇によってむしろ多くなる現象も報告されている¹²⁸。さらに、緯度の上昇に伴い、土壤中の AM 菌の存在量や多様性が減少するとの推定もある¹²⁹。本研究の結果と上述の知見を統合して考えると、シオガマギク属植物は AM 菌が豊富に存在する地域では生存戦略として AM 菌や外生菌根菌、ラン菌根菌などの複数の植物共生菌を組み合わせて利用することで栄養を効率的に獲得している可能性がある。一方で、高山の山頂付近や超高緯度地域のような土壤中の AM 菌の存在量が少ない地域に生えるシオガマギク属植物は、AM 菌以外の真菌類（外生菌根菌やラン菌根菌など）を主に利用している可能性が考えられる。実際、野外で AM 菌感染が見られないタカネシオガマは高山の山頂部の岩礫地に自生しているので、存在量が少ない AM 菌と出会うことが難しく、代わりに他の共生真菌を利用せざるを得ないことが推測される。今後、実際の自生地 of 土壌微生物を用いた栽培実験を行うことで、寄生性高山植物の環境適応に関連する有用な真菌類の発見が期待される。

6. 総括

6-1. 本研究で得られた成果

本研究では、野外の自生地における AM 菌の感染が頻繁に観察される特殊な寄生植物・シオガマギク属において、AM 菌の感染条件や感染機構の解明を試みた。シオガマギク属における AM 菌の感染は、非生物的環境条件には大きく影響されず、周囲の AM 菌と共生している植物によって促進されることが明らかになった。この AM 菌と共生している植物による AM 菌の感染促進機構では、AM 菌が共生している植物によって共生特異的な生理状態へと変化した結果、シオガマギク属への感染能力を向上させるモデルが考えられた。ただし、AM 菌を活性化させる植物由来の因子は、植物の根から土壤中へ分泌される物質（特に SL）の可能性は低く、植物から AM 菌に直接輸送される物質である可能性が推測される。また、AM 菌は損傷箇所など根表面の間隙からシオガマギク属の組織内へ侵入するという新たな感染経路の存在も示唆された。

AM 菌の感染は、シオガマギク属の生育には通常ほとんど影響しないが、他の特定の真菌類との共接種が生長促進効果をもたらすことが明らかになった。さらに、AM 菌は他の特定の真菌類との相互作用を通じてリンなどの栄養吸収を促進することも示唆され、このことがシオガマギク属の生長促進に貢献しているのかもしれない。

本研究で得られた知見から、シオガマギク属の AM 菌感染機構について、図 36 のようなシナリオが考えられる。シオガマギク属の周辺に生える AM 菌と共生している植物が、AM 菌を共生特異的な生理状態へと性質を変化させた結果、AM 菌の植物への感染能力が上昇する可能性がある。AM 菌は根表面に付着器を形成したり、根表面の間隙等を通じて侵入したりすることでシオガマギク属にも感染する。また、根内や根圏に存在する AM 菌は、ラン菌根菌や病原菌など他の真菌類との相互作用を通じてシオガ

マギク属の生長を促進する場合がある。このような真菌間の相互作用による生長促進効果は、シオガマギク属の高山環境での生存率の向上に貢献している可能性が考えられる。

6-2. 今後の課題

本研究では、周辺に生える AM 菌と共生している植物が、シオガマギク属への感染を促進する現象が明らかになったが、AM 菌と共生している植物が具体的にどのような方法で AM 菌の共生システムを活性化しているのかの解明には至らなかった。今後は、植物が共生相手の AM 菌の状態をどのように変化させているのか明らかにしていく必要があると考えられる。

また、本研究では AM 菌及び内生真菌の共接種がシオガマギク属の生長を促進することが示されたが、こちらも具体的なメカニズムの解明には至らなかった。今後は、AM 菌と他の真菌類がどのようにしてシオガマギク属の生長を促進するのか、各真菌類の栄養供給活性や真菌間の相互作用という観点からさらなる調査が必要である。

6-3. 本研究の意義

本研究の学術的な意義として、従来知られてきた菌根共生のメカニズムとは異なる、周囲の他の植物が関与する感染推進機構を活用した新たな菌根菌の感染様式を報告するものである。また、寄生植物・宿主植物・複数の真菌類という多種を含むネットワークを対象とした複雑系の研究の先駆けとなることが期待される。

社会的な意義として、菌根菌と本研究で単離した真菌類の両方を寄生植物の栽培に活用することで、本研究の成果は寄生植物の商業的増殖といった園芸などの産業への応用が期待できる。また、シオガマギク属の中には、環境省レッドリストにおいて絶滅が危惧されている寄生植物種が存在する。希少寄生植物種の保全のために、本研究の成果を応用して、真菌類との相互作用を活用した保護・増殖方法が構築できると期待される。

7. 図表

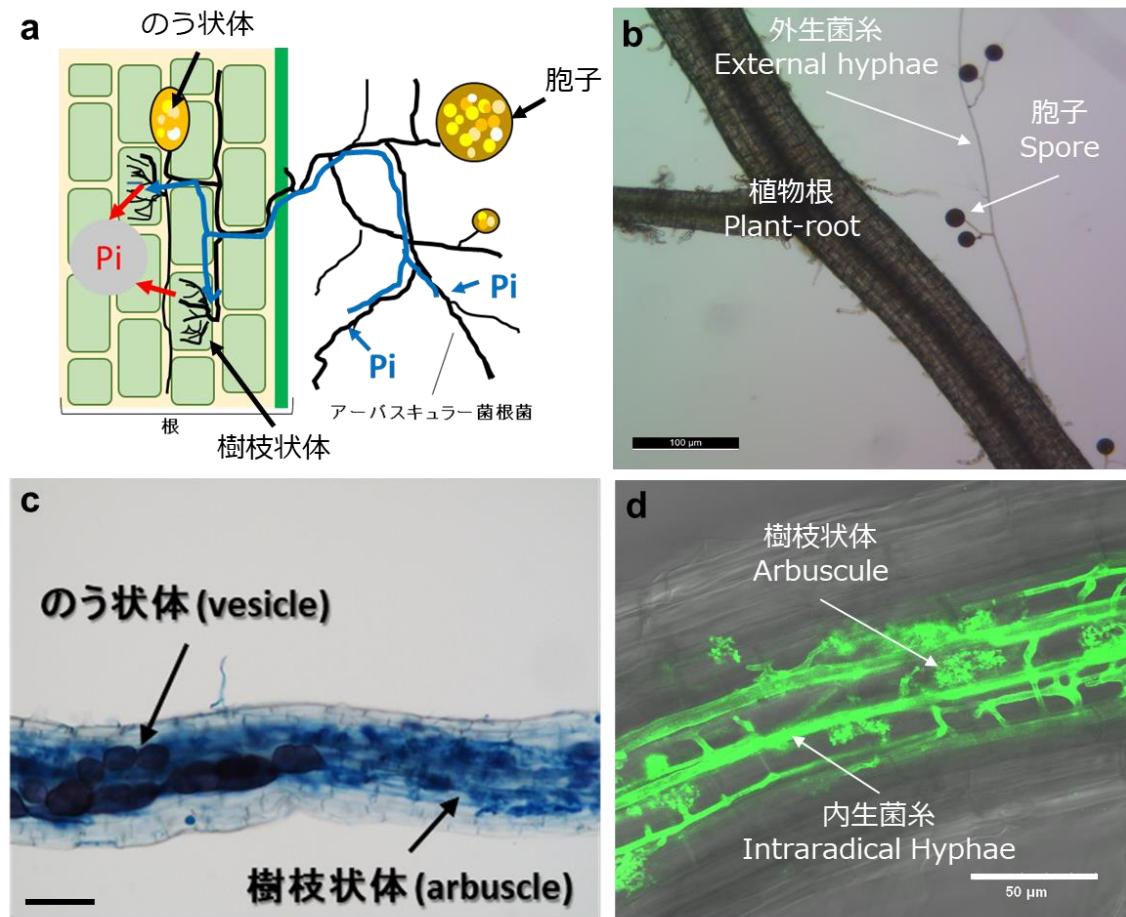


図 1. 植物と AM 菌の共生機構

a) 植物根と共生する AM 菌の模式図を示した。AM 菌は土壌中で発芽し、植物に菌糸を伸ばして植物根に接触し、植物根内に侵入し、樹枝状体 (arbuscule) を介して植物と栄養交換を行う。また、のう状体 (vesicle) には脂質などの栄養が貯蓄されている。Pi はリン酸を、青色の線は土壌から吸収されたリン酸の流れをそれぞれ示す。b) ニンジン (*Daucus carota*) の毛状根と共生する AM 菌の写真を示した。AM 菌は外生菌糸 (external hyphae) を伸ばして土壌中から栄養を吸収する。胞子 (spore) は植物と共生している時に形成される。Bar = 100μm。c) トリパンプルー染色を行ったイネ (*Oryza sativa*) の根において観察された AM 菌の写真を示した。樹枝状体 (arbuscule) 及び、のう状体 (vesicle) は AM 菌特有の共生器官であり、AM 菌同定時の重要な指標である。Bar = 100μm。d) 蛍光染色 (WGA) を行ったイネ (*Oryza sativa*) の根において観察された AM 菌の写真を示した。細胞内で菌糸が細かく分岐する構造を持つ樹枝状体 (arbuscule) の形成が確認できる。Bar = 50μm。

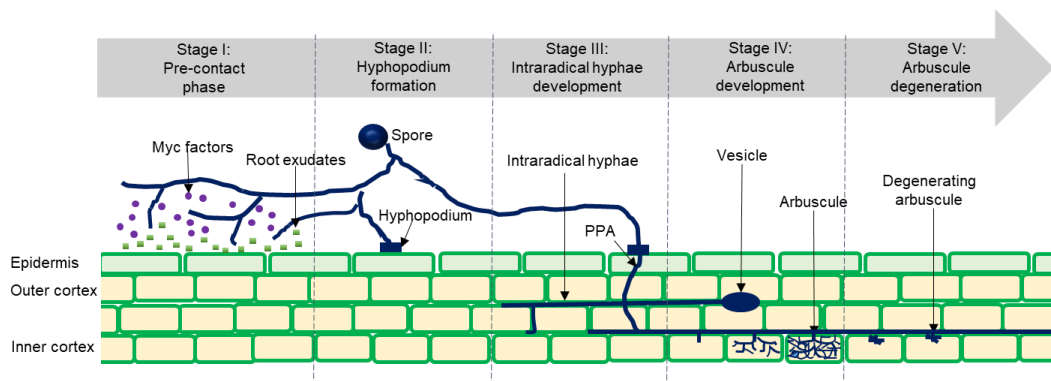


図 2. 植物と AM 菌の共生の成立過程

これまでに明らかにされてきた植物と AM 菌の共生の成立過程について示した。まず、植物は栄養欠乏条件に置かれた際にストリゴラクトン (SL) などのシグナル分子を根から分泌し (Stage I)、AM 菌の菌糸分岐を促進する。また、AM 菌はシグナル分子である Myc-factor を分泌し、植物の共生プログラムをオンにする (Stage I)。菌糸分岐した AM 菌は植物根に触れるとその表面に付着器 (hyphopodium) を形成する (Stage II)。植物は表皮細胞に菌糸の通り道である prepenetration apparatus (PPA) を形成し、AM 菌菌糸は PPA を経由して皮層へと進入する (Stage III)。菌糸は皮層細胞内に侵入し、共生器官である樹枝状体 (arbuscule) を形成し (Stage IV)、植物との栄養交換を成立させる。なお、AM 菌の研究で対象植物としてしばしば用いられるマメ科のミヤコグサ (*Lotus japonicus*) やイネ科のイネ (*Oryza sativa*) の場合、AM 菌の接種後 2-3 週間程度で多数の樹枝状体が根の中に見られるようになる。老化あるいは死亡した植物の根では、樹枝状体の崩壊が起きて共生関係が解消される (Stage V)。

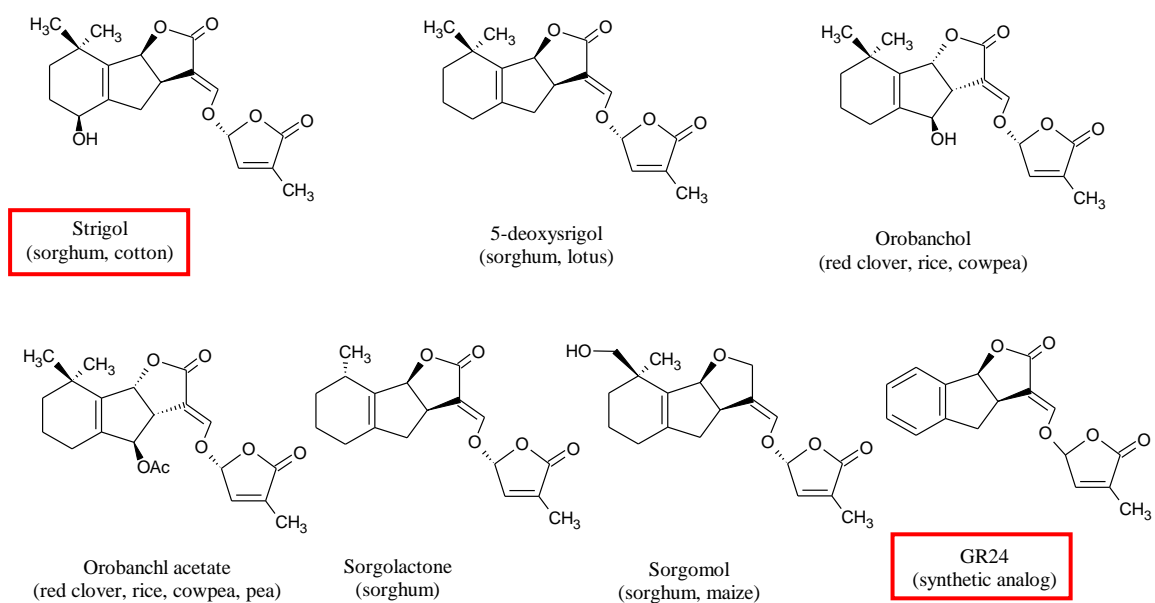


図 3. 代表的なストリゴラクトン類

既知のストリゴラクトン (SL) 類のうち、7 種類を取り上げてそれらの構造を示した。それぞれの SL の名前の中の () 内には、その SL を分泌する代表的な植物種を記した。本研究で使用した SL は赤枠で示した。

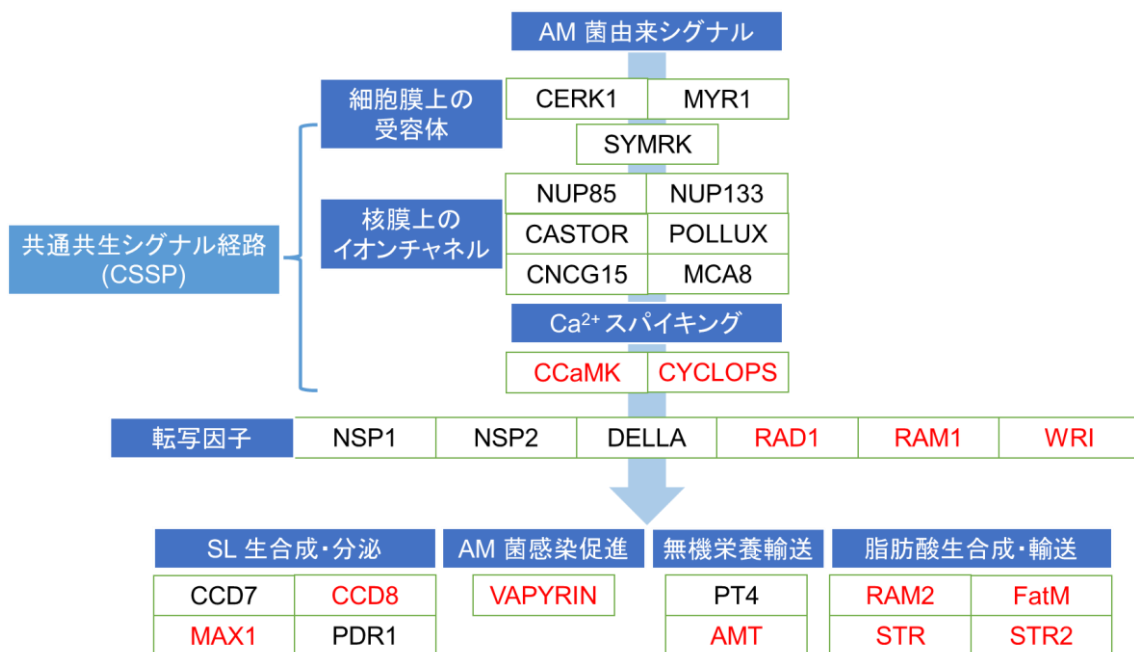


図 4. 陸上維管束植物の AM 共生に関与する主要な遺伝子群

AM 菌由来のシグナル (Myc-LCO や short-chain CO) は植物の細胞膜に存在する共受容体 CERK1 及び MYR1 や、受容体 SYMRK によって認識され、共生シグナルが伝達される。シグナルの伝達を受けた核膜に存在するイオンチャネルの働きによって、Ca²⁺スパイキングが誘導される。CCaMK 及び CYCLOPS の複合体は、共生応答特異的な Ca²⁺スパイキングを認識すると、AM 共生関連遺伝子の発現制御を行っている転写因子群の発現を誘導する。発現した転写因子群によって、SL 生合成や、AM 菌感染、AM 菌との間の栄養輸送などが制御される。SYMRK から CCaMK/CYCLOPS に至る経路は AM 共生と根粒共生で共通しており、共通共生シグナル経路 (CSSP) と呼ばれる。遺伝子は緑色の枠で示したものである。赤字で示した遺伝子は、コケ植物であるフタバネゼニゴケ (*Marchantia paleacea*) のゲノムにも存在することが報告されている。

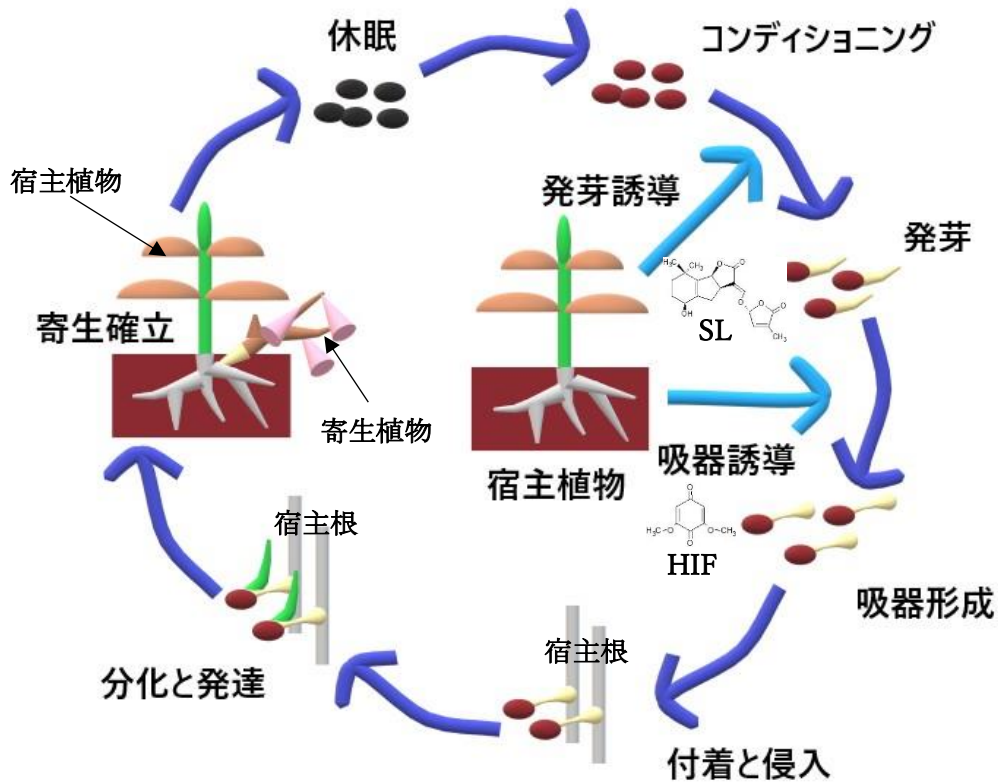


図 5. 根寄生植物の生活環と発芽や吸器形成の誘導機構

典型的な根寄生植物の生活環を示した。寄生植物の種子は、発芽に適した環境下に置かれると発芽するための準備を始める（コンディショニング）。発芽する準備が整った種子は、宿主植物由来の発芽誘導物質であるストリゴラクトン (SL) を認識することで発芽する。発芽した実生は、宿主植物由来の吸器形成誘導物質 (HIF) を認識することで吸器の形成を始め、最終的に宿主植物の根に付着することで寄生が確立する。寄生が完了した植物は宿主植物から栄養や水を奪いながら生長する。ただし、条件的寄生植物は宿主植物由来の SL は必要とせず、他の植物と同様に気温や水分条件といった各種環境条件に反応して発芽する。



植物の属	<i>Lindenbergia</i>	<i>Pedicularis</i>	<i>Phtheirospermum</i>	<i>Striga</i>	<i>Orobanche</i>
栄養の獲得様式	独立栄養	半寄生	半寄生	半寄生	半寄生
宿主への依存度	独立栄養	条件的寄生	条件的寄生	絶対寄生	絶対寄生
光合成能	○	○	○	○	×
菌根共生能	○	△	×	×	×

図 6. 代表的なハマウツボ科寄生植物とその特徴

ハマウツボ科の *Lindenbergia* 属、シオガマギク属 (*Pedicularis*)、コシオガマ属 (*Phtheirospermum*)、ストライガ属 (*Striga*)、ハマウツボ属 (*Orobanche*) の 5 属を取り上げ、各属の代表的な種の写真とその形質の特徴を示した。下段の表中において、○は当該形質を持つことを、×は持たないことを、△は中間的形質が観察されることを、それぞれ示す。



図 7. 日本列島に自生するシオガマギク属植物

日本列島に自生するシオガマギク属植物 15 種のうち 6 種を取り上げ、野生個体の写真を掲載した。a) タカネシオガマ (*P. verticillata*) (長野県・塩見岳にて撮影)、b) ヨツバシオガマ (*P. chamissonis*) (長野県・木曽駒ヶ岳にて撮影)、c) キバナシオガマ (*P. oederi*) (北海道・大雪山にて撮影)、d) ミヤマシオガマ (*P. apodochila*) (北海道・ピロパイロ岳にて撮影)、e) シオガマギク (*P. resupinata*) (長野県・塩見岳にて撮影)、f) エゾシオガマ (*P. yezoensis*) (長野県・燕岳にて撮影)。

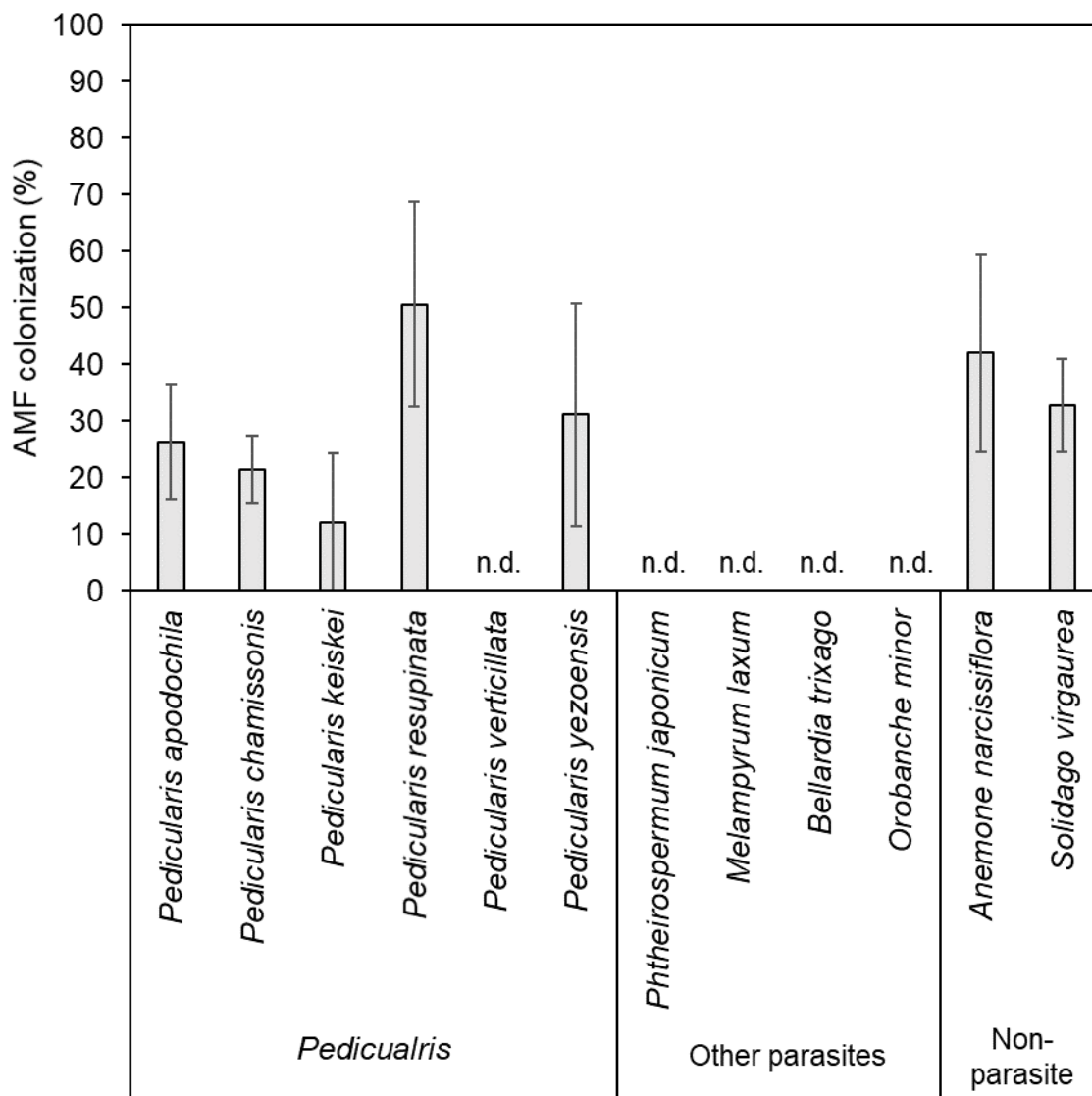


図 8. 日本の自生地におけるシオガマギク属及びその他の寄生植物種の AM 菌感染量
 日本列島の自生地から採取した植物の根について、トリパンブルー染色を行って光学顕微鏡下で AM 菌の感染状況を観察し、図 11b の方法で算出した AM 菌感染率（平均値 ± 標準誤差 (standard error: SE)/n=5-22）をグラフで示した。シオガマギク属植物は、調査対象種の内、日本国内に広域分布する 6 種の根における感染率のデータを代表として示した。また、非寄生植物種は、シオガマギク属植物と同所で採取した高山植物 2 種の根における感染率のデータを示した。n.d. は AM 菌の感染が全く観察できなかったことを示す。野外の植物根の観察の結果、日本のシオガマギク属植物種の多く（調査した 11 種の内 9 種）において、AM 菌の感染が見られた。その一方で、シオガマギク属以外のハマウツボ科寄生植物種では、AM 菌の感染は確認できなかった。

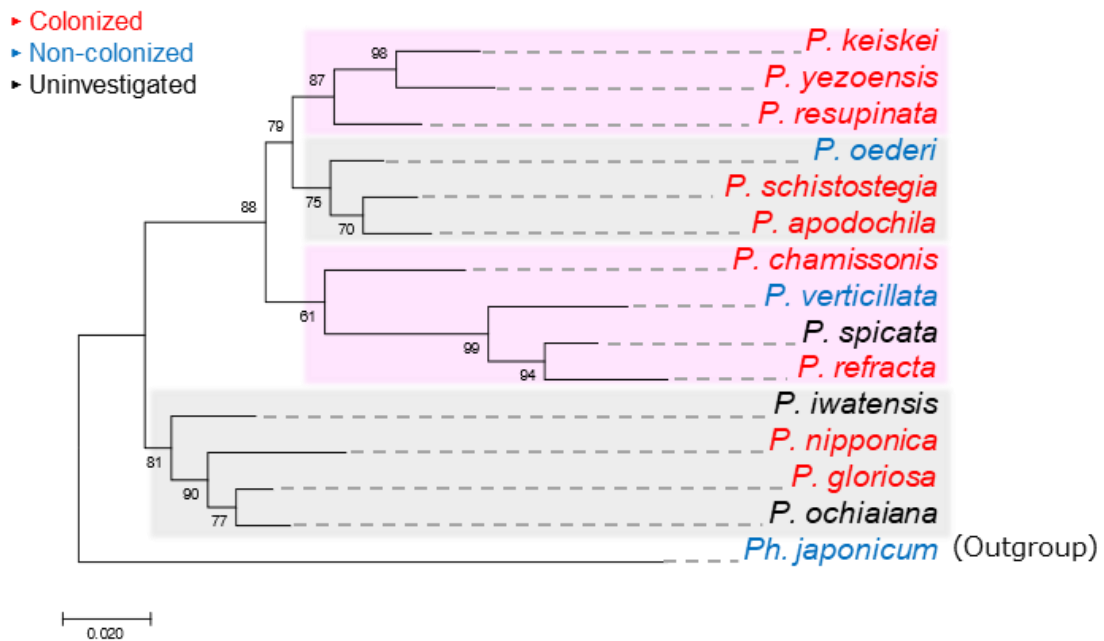


図 9. 日本のシオガマガイク属植物の系統と AM 菌感染の関係

系統樹は日本に自生するシオガマガイク属植物 14 種の分子系統樹で、*ITS* 領域の塩基配列を基に最尤法を用いて構築した。コシオガマ (*Ph. japonicum*) は外群として含めた。系統樹の枝上の数値は bootstrap 値 (1,000 回試行時) である。野外で採取した植物の根を染色して光学顕微鏡下で観察した結果、AM 菌の感染が確認された植物種は赤色で、感染が確認できなかった植物種は青色でそれぞれ示した。黒色の植物種はこれまでに調査ができていないものである。AM 菌の感染が見られた植物 9 種はいずれの主要クレード (系統樹の背景に色分け: 概ね分類階級の節に対応) にも存在し、AM 菌感染の系統特異性は見られず、シオガマガイク属全般に広くみられる現象であると考えられた。

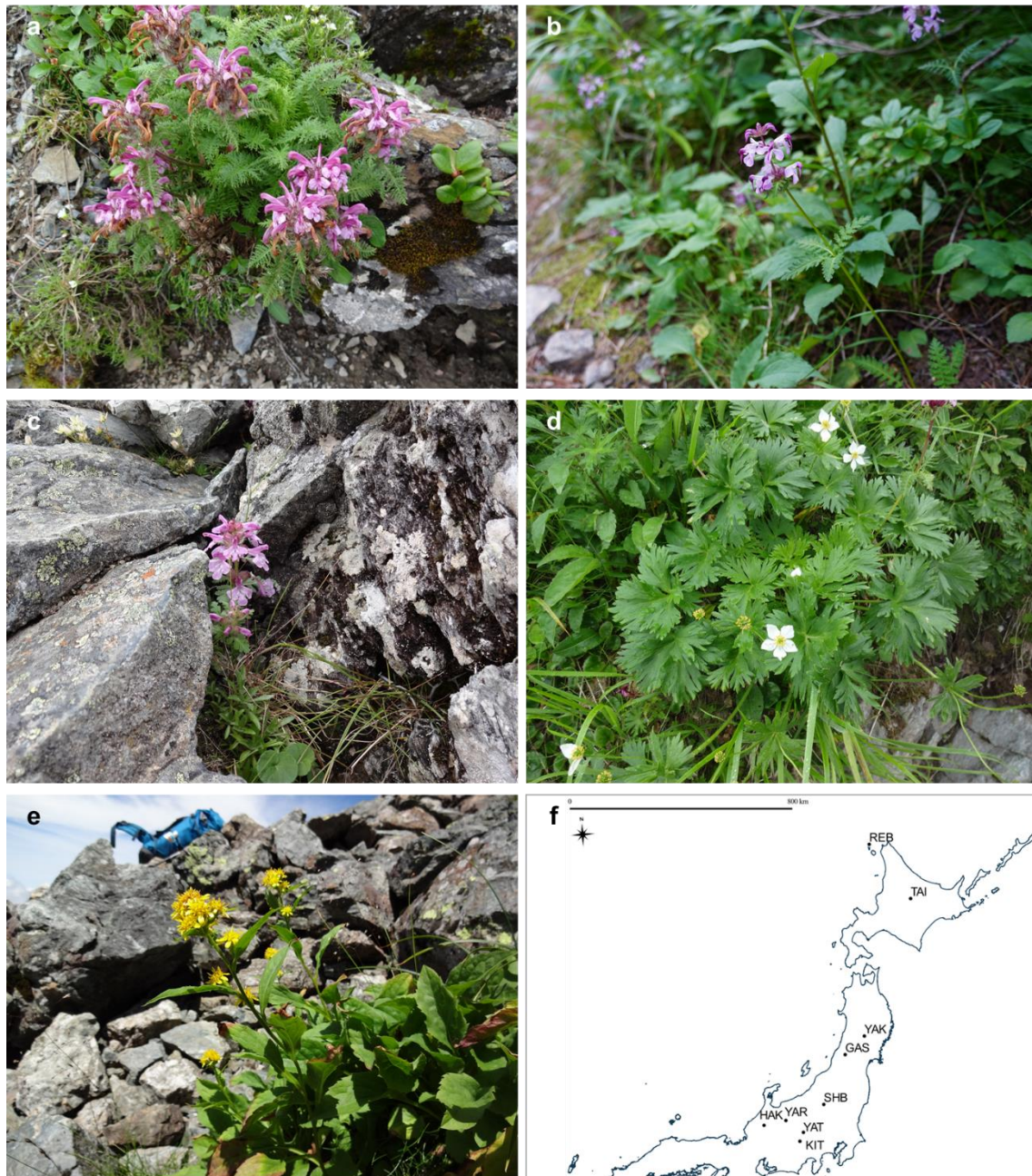


図 10. 菌叢解析の対象植物種と採取地点

a-e) 対象植物の野生個体の写真。a-c はシオガマグク属の寄生性高山植物、d 及び e は同所的に自生する他科の非寄生の高山植物である。a) Pa: ミヤマシオガマ (*Pedicularis apodochila*)、b) Pc: ヨツバシオガマ (*Pedicularis chamissonis*)、c) Pv: タカネシオガマ (*Pedicularis verticilata*)、d) An: ハクサンイチゲ (*Anemone narcissiflora*)、e) Sv: アキノキリンソウ (*Solidago virgaurea*)。f) 植物の採取地点の地図。採取場所の略記—REB: 北海道・礼文島、TAI: 北海道・大雪山、YAK: 岩手県・焼石岳、GAS: 山形県・月山、SHB: 群馬県・至仏山、YAT: 山梨県・八ヶ岳、KIT: 山梨県・北岳、YAR: 岐阜県・槍ヶ岳、HAK: 石川県・白山。

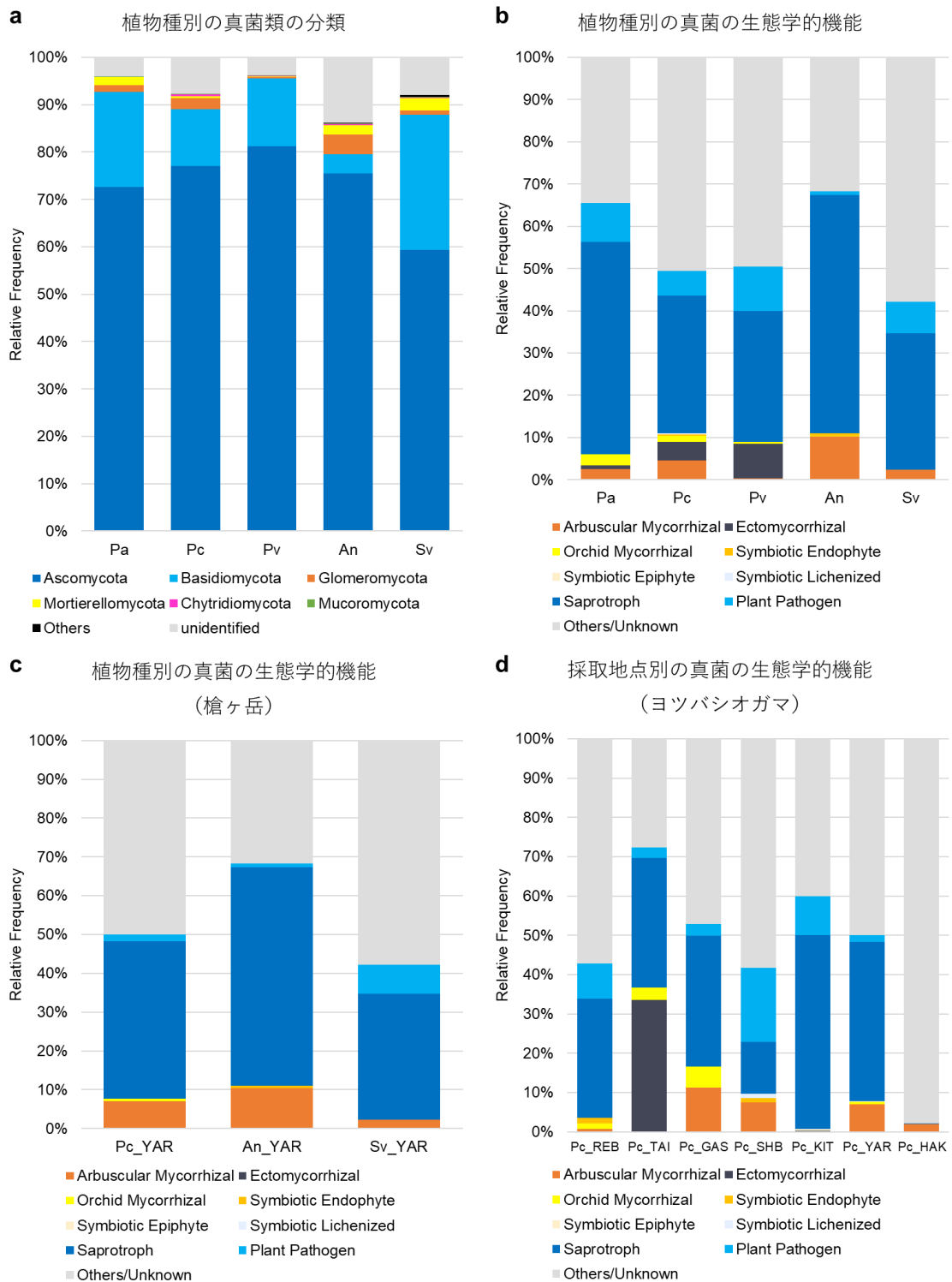


図 11. 野外で採取した日本産シオガマギク属植物の根の真菌類群集

a) 植物の根から検出された真菌類の門レベルの分類学的組成を各植物種について示した。b-d) 植物の根から検出された真菌類の生態学的機能を FUNGuild⁸⁰ を用いて推定し、b) 各植物種及び、c) 檜ヶ岳で採取した各植物種、d) ヨツバシオガマの採取地点につい

て示した。植物の略記—Pa: ミヤマシオガマ、Pc: ヨツバシオガマ、Pv: タカネシオガマ、An: ハクサンイチゲ、Sv: アキノキリンソウ。採取場所の略記—REB: 北海道・礼文島、TAI: 北海道・大雪山、GAS: 山形県・月山、SHB: 群馬県・至仏山、KIT: 山梨県・北岳、YAR: 岐阜県・槍ヶ岳、HAK: 石川県・白山。



b

【感染率の算出法】

$$\text{感染率 (\%)} = \frac{\text{AM 菌の交差数}}{\text{根の全交差数}} \times 100$$

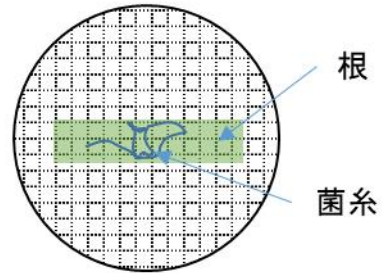


図 12. 研究対象植物と AM 菌の感染率の算出方法

a) 研究対象植物である *P. kansuensis* 全体の写真。b) AM 菌の感染率の算出方法。AM 菌の感染率は、格子の線との交差数に基づいて計算する Phillips et al. 1970⁸¹ の方法で算出した。根及び AM 菌の感染部分が交差する格子の線の数のカウントし、観察した根の全交差数に対する AM 菌感染部分の交差数の割合を感染率と定義する。

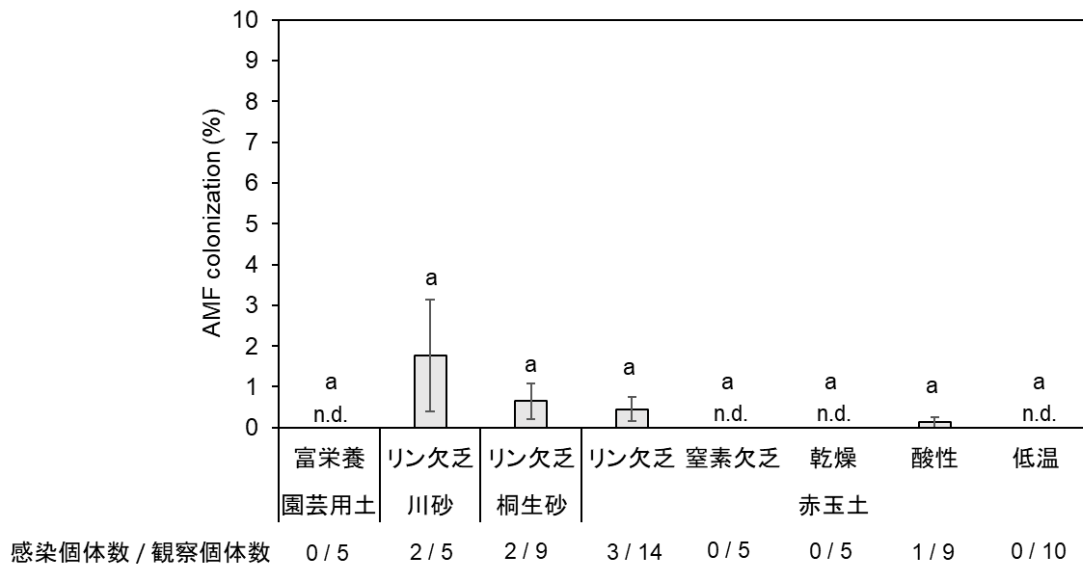


図 13. *P. kansuensis* における AM 菌感染率の環境条件間比較

各種環境条件設定下で AM 菌接種後 60 日間単独で栽培した *P. kansuensis* の根における AM 菌感染率 (平均値 \pm SE / n=5-14) を示した。図の横軸の処理区は、富栄養土壌、リン欠乏土壌 (川砂 (小粒))、リン欠乏土壌 (桐生砂 (中粒))、リン欠乏土壌 (赤玉土 (大粒))、窒素欠乏土壌、乾燥土壌、酸性土壌、低温気候の条件下でそれぞれ栽培したことを示す。グラフの下の数字は、観察個体数と、そのうち AM 菌の感染が確認された個体数を示した (感染個体数 / 観察個体数)。n.d. は AM 菌感染が全く観察できなかったことを示す。図中のアルファベットは、tukey's test によって検定を行い、異符号間で統計的に有意な差が見られたことを示す。

a

AM fungal colonization

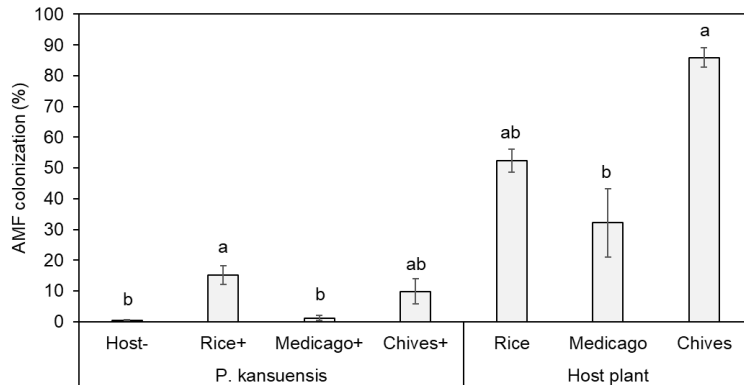
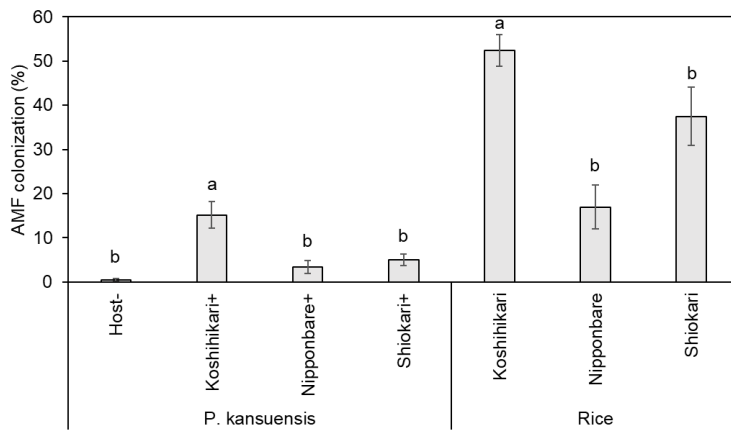
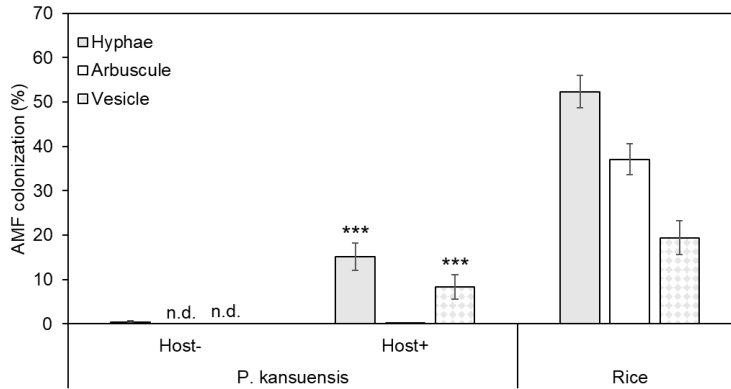
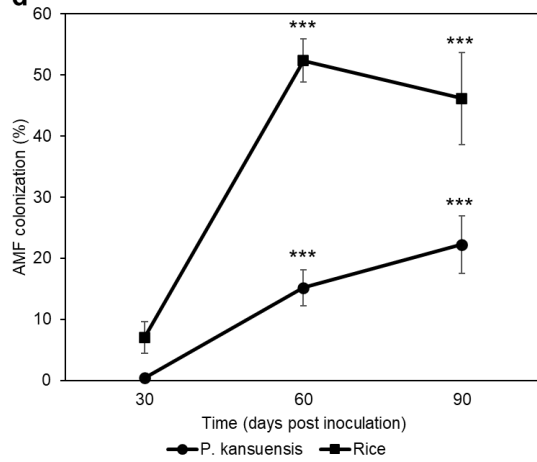
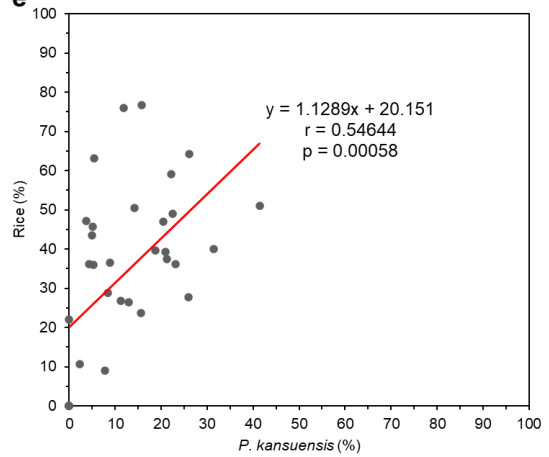
**b****c****d****e**

図 14. 宿主植物による *P. kansuensis* における AM 菌感染の促進

宿主植物との共栽培条件において、*P. kansuensis* の根における AM 菌感染率を示した。

a) AM 菌接種後 60 日における宿主植物の植物種差による AM 菌感染率 (平均値 \pm SE / n=5-12) の比較。植物種として、Rice: イネ (コシヒカリ)、Medicago: タルウマゴヤシ、Chaives: チャイブの 3 種を用いた。b) AM 菌接種後 60 日における宿主植物のイネ品種差による AM 菌感染率 (平均値 \pm SE / n=5-12) の比較。イネの品種として、Koshihikari: コシヒカリ、Nipponbare: 日本晴、Shiokari: シオカリの 3 品種を用いた。

c) イネ・コシヒカリとの共栽培条件下で AM 菌接種後 60 日における、AM 菌の菌糸、樹枝状体、のう状体の器官別形成率 (平均値 \pm SE / n=7-12) を示した。a-c) 左側に *P. kansuensis* の感染率のデータを、右側に宿主植物の感染率のデータを、それぞれ示した。図の横軸の処理区は、AMF-: AM 菌非接種、AMF+: AM 菌接種、Host-: 宿主植物不在、種名+: 当該宿主植物存在の条件下で、それぞれ栽培したことを示す。n.d. は、AM 菌感染が全く観察できなかったことを示す。a 及び b の図中のアルファベットは、*P. kansuensis* と宿主植物、各々で tukey's test によって検定を行い、異符号間で統計的に有意な差が見られたことを示す ($p < 0.05$)。c の図中のアスタリスクは宿主植物なしの条件 (Host-) と比較して有意な差が見られたことを示す (student's t-test, *: $p < 0.1$, **: $p < 0.05$, ***: $p < 0.01$)。d) AM 菌接種後 30、60、90 日の *P. kansuensis* (イネ・コシヒカリとの共栽培) 及び、イネ・コシヒカリ (*P. kansuensis* との共栽培) における感染率 (平均値 \pm SE / n=5-12) の時系列データを示した。●は *P. kansuensis* の、▲はイネの、感染率のデータをそれぞれ示す。アスタリスクは接種後 30 日と比較して有意な差が見られたことを示す (student's t-test, *: $p < 0.1$, **: $p < 0.05$, ***: $p < 0.01$)。e) 同一ポットの個体の組み合わせで *P. kansuensis* 及びイネの接種後 60 日における AM 菌の感染率 (n = 34) をプロットして示した。横軸が *P. kansuensis*、縦軸がイネ (コシヒカリ) の感染率をそれぞれ表す。

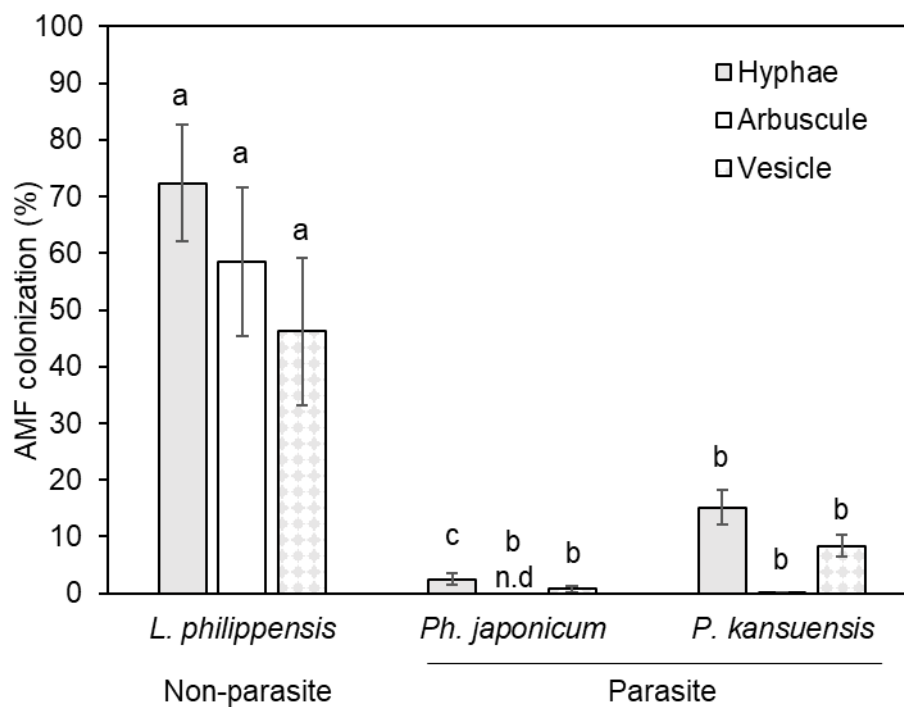


図 15. ハマウツボ科植物における AM 菌感染率の種間比較

AM 菌接種後 60 日におけるハマウツボ科植物 3 種の根における AM 菌感染率（平均値 ± SE / n=5-16）を示した。*L. philippensis* は独立栄養植物のため、単独栽培条件のデータを、それ以外の条件的寄生植物 2 種は宿主植物・イネと共に栽培した条件のデータを示した。n.d. は、AM 菌感染が全く観察できなかったことを示す。図中のアルファベットは、器官ごとに tukey's test で検定を行い、異符号間で統計的に有意な差が見られたことを示す ($p < 0.05$)。

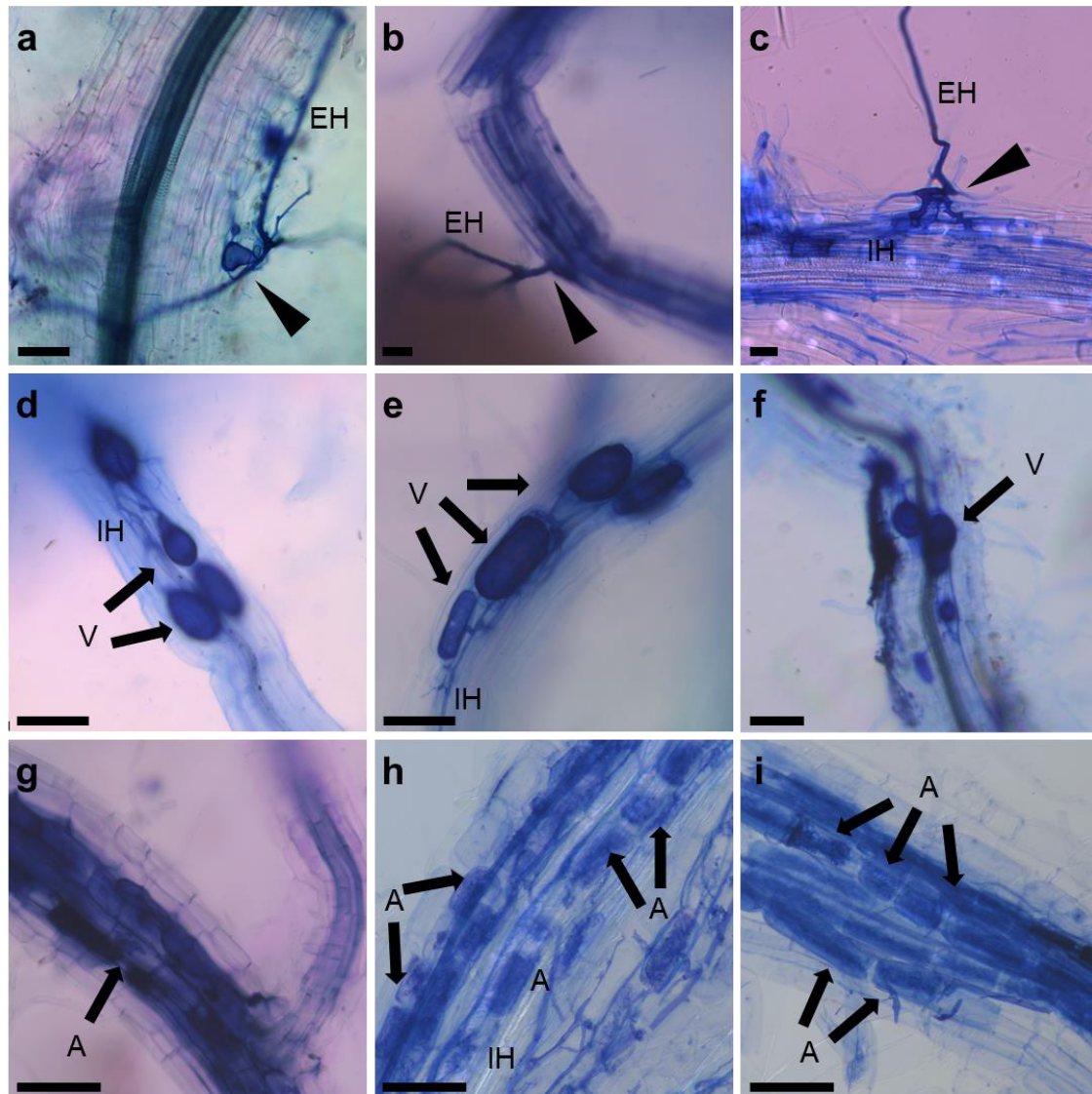


図 16. *P. kansuensis* の根に感染する AM 菌の表現型

宿主植物・イネと共に栽培した条件において、AM 菌接種後 60 日の *P. kansuensis* を採取して根のトリパンブルー染色を行い、根に感染する AM 菌を光学顕微鏡観察下で撮影した。a-c) AM 菌の付着器。a) 菌糸が根に取り付いて表皮細胞に侵入しているが、皮層までは進行していなかった。b) 根の傷口に付着器が形成されており、菌糸が皮層まで侵入して細胞間隙を進行していた。c) 菌糸が根の表面で分岐し、複数箇所での根への侵入を試みていた。d-f) AM 菌のう状体。根の中で円柱または水滴状の形状のう状体が形成されていた。g-i) AM 菌の樹枝状体。Arum 型様の樹枝状体が多数の細胞で形成されていた。ただし、A: 樹枝状体、EH: 外生菌糸、IH: 内生菌糸、V: のう状体、矢尻: 付着器、Bar = 100 μm 。

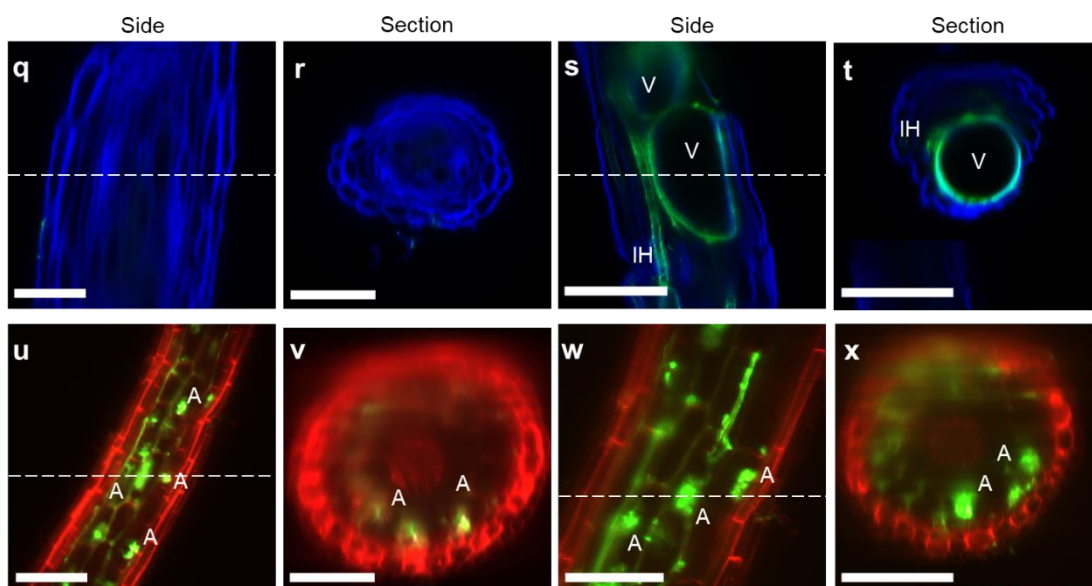
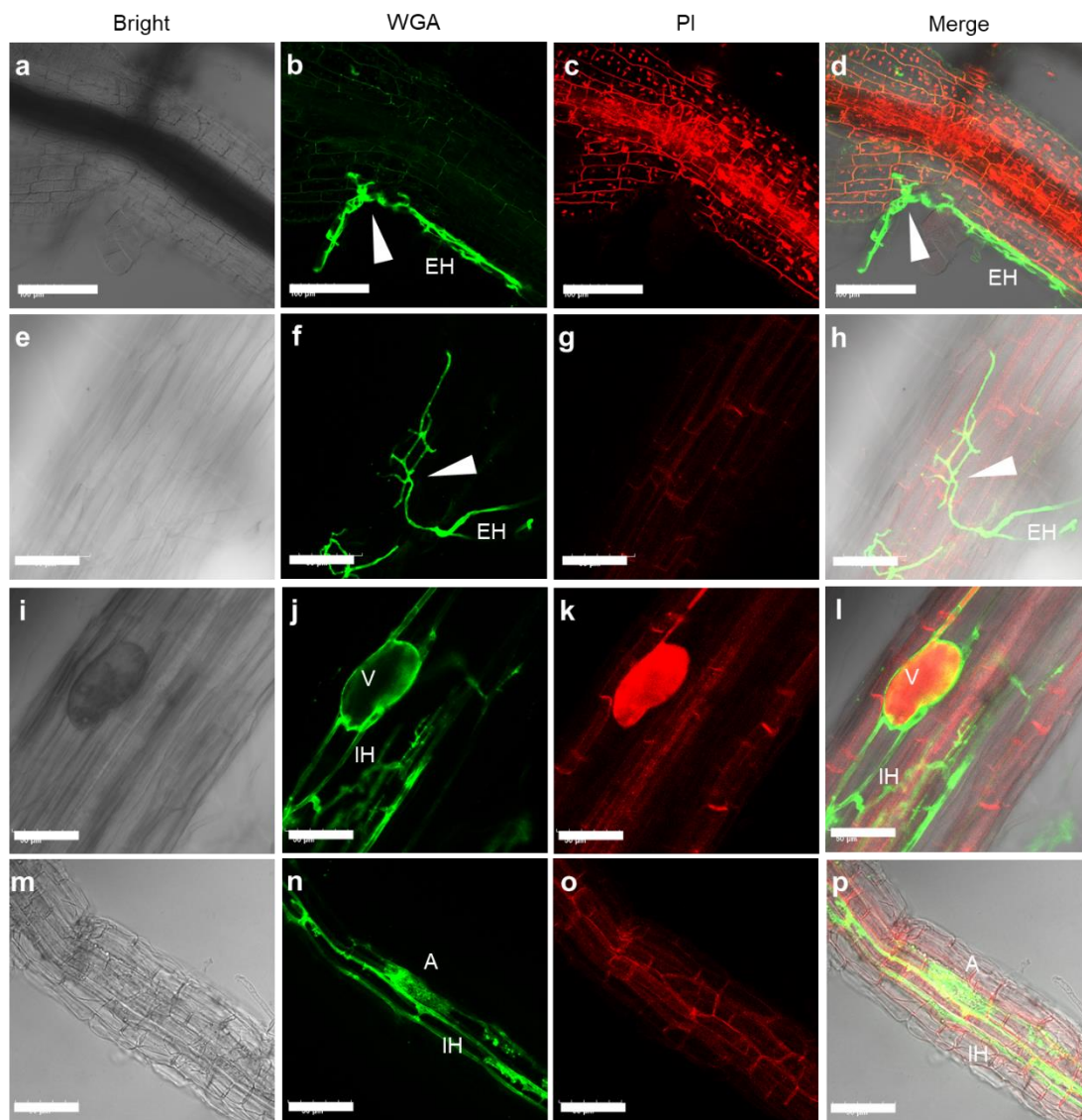


図 17. *P. kansuensis* の根に感染する AM 菌の表現型

宿主植物・イネと共に栽培した条件下において、AM 菌接種後 60 日の *P. kansuensis* を採取して根の蛍光染色 (WGA+PI または WGA+CFW) を行い、根に感染する AM 菌を共焦点顕微鏡観察下で撮影した。a-h) AM 菌の付着器。a-d) 菌糸が根の傷口から侵入を試みていた。e-h) 菌糸が根の表面で分岐し、複数箇所でも根への侵入を試みていた。i-l) AM 菌ののう状体。細胞間隙を菌糸が進行しており、のう状体が形成されていた。m-p) AM 菌の樹枝状体。皮層の細胞内に菌糸が侵入し、一部の細胞内で樹枝状体を形成していた。a, e, i, m) bright、b, f, j, n) WGA (緑色：菌糸マーカー)、c, g, k, o) PI (赤色：細胞壁マーカー)、d, h, l, p) merge。q-x) 光シート型蛍光顕微鏡を用いて撮影した、AM 菌非感染根 (q, r)、感染根ののう状体 (s, t) 及び、感染根の樹枝状体 (u-x) の WGA (緑色：菌糸マーカー) と CFW (青色：細胞壁マーカー) または PI (赤色：細胞壁マーカー) の merge 画像。q) AM 菌非感染根。r) 図 q の点線部分の横断面の画像。s) AM 菌感染根で観察されたのう状体。t) 図 s の点線部分の横断面の画像。u, w) AM 菌感染根で観察された樹枝状体。v, x) v は図 u の、x は図 w の、それぞれ点線部分の横断面の画像。光シート型蛍光顕微鏡を用いた観察により、AM 菌の菌糸、のう状体、樹枝状体が根の内部に形成されていることが確認できた。A: 樹枝状体、EH: 外生菌糸、IH: 内生菌糸、V: のう状体、矢尻: 付着器、Bar = 100 μm 。

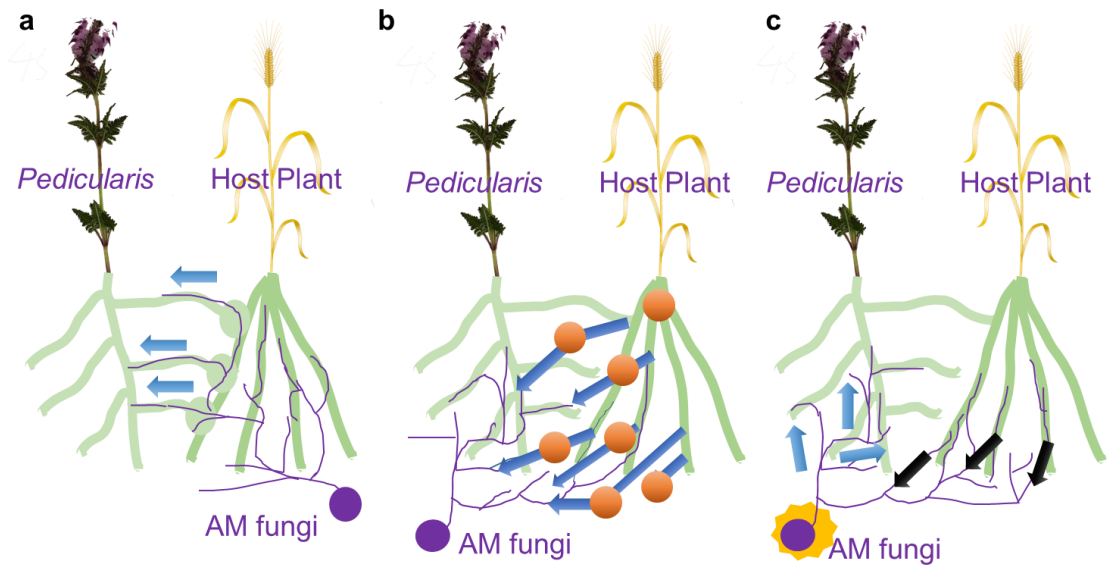


図 18. 宿主植物によるシオガマギク属植物の AM 菌感染促進機構の仮説

a) 宿主植物及びシオガマギク属の吸器を介した根同士の連結を通して、AM 菌が宿主植物の根からシオガマギク属のへと侵入する可能性。b) 宿主植物が土壌中に分泌する SL 類によって、土壌中の AM 菌の菌糸分岐を誘導した結果、シオガマギク属の根にも AM 菌の感染が促進される可能性。c) 宿主植物に感染することで共生特異的な状態にある AM 菌が、シオガマギク属の根にも感染しやすい様態になる可能性。

AM fungal colonization (*P. kansuensis*)

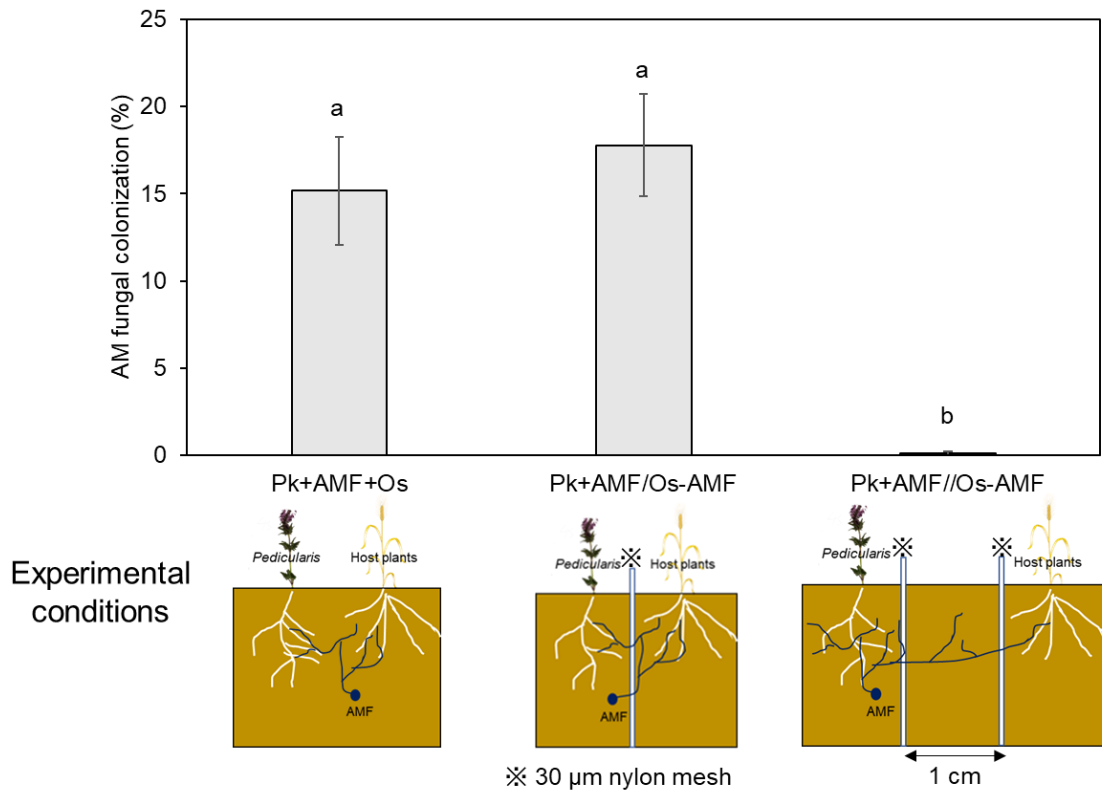


図 19. 宿主植物による AM 菌の感染促進条件の検討

上段のグラフには、宿主植物・イネとの間に、30 μm 径のナイロン製メッシュを設置した栽培システムにおいて、AM 菌接種後 60 日栽培した *P. kansuensis* の根における AM 菌の感染率 (平均値 \pm SE/n=5-12) を示した。図中のアルファベットは、tukey's test によって検定を行い、異符号間で統計的に有意な差が見られたことを示す ($p < 0.05$)。下段には各処理区の実験系を図示した。左はメッシュなしの条件、中央はメッシュを 1 枚使用した条件、右はメッシュを 2 枚使用してメッシュ間に 1 cm の間隔を設けた条件。中央及び右の処理区では、*P. kansuensis* を植えた側のみに AM 菌を接種した。

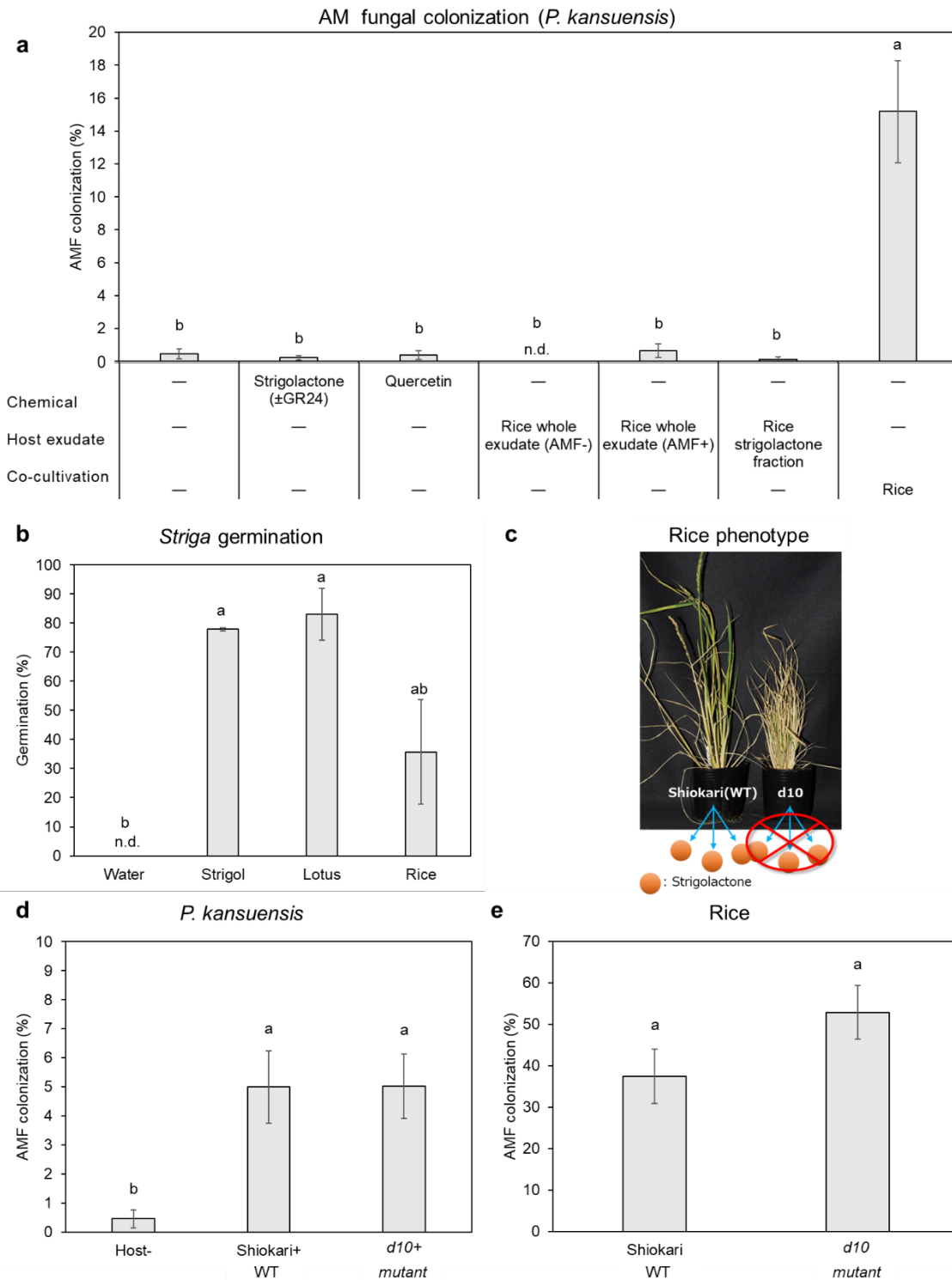


図 20. 宿主植物の根滲出液がシオガマギク属の AM 菌感染に与える影響

a) AM 菌接種後、化合物または宿主植物・イネの根滲出液を添加しながら 60 日栽培した *P. kansuensis* の根における AM 菌の感染率 (平均値 \pm SE / n=7-12) を示した。Strigolactone (\pm GR24): 人工合成 SL \pm GR24, Quercetin: フラボノイドの一種・ケルセ

チン、Rice whole exudate: AM 菌非接種 (AMF-) または接種 (AMF+) 条件下で育てたイネの根滲出液全体、Rice strigolactone fraction: イネの根滲出液のアセトン画分。b) 根滲出液のアセトン画分を添加後 24 時間におけるストライガ種子の発芽率を示した。各処理区ストライガ種子 20 粒程度を用いた発芽試験を 3 反復行った。Water: 陰性対照、Strigol: 陽性対照、Lotus: ミヤコグサ (*Lotus japonicus*) 根滲出液、Rice: イネ (コシヒカリ) 根滲出液。c) イネ野生型 (シオカリ) と、SL 生合成変異体 *d10* (シオカリ背景)。*d10* 変異体は SL を生合成できないため、土壤中に SL を分泌することができない。また、地上部では過剰な分げつが生じる。d) 宿主植物としてイネ野生型または SL 生合成変異体 *d10* を用いたときの *P. kansuensis* の根における接種後 60 日の AM 菌感染率 (平均値 \pm SE / n=7-8) の比較を示した。横軸の処理区は、Shiokari+: シオカリ、*d10*+: *d10* 変異体をそれぞれ宿主植物として用いたことを示す。e) AM 菌接種後 60 日のイネ野生型 (Shiokari) 及び SL 生合成変異体 *d10* との間の AM 菌感染率 (平均値 \pm SE / n=8-11) の比較を示した。n.d. は、AM 菌感染が全く観察できなかったことを示す。図中のアルファベットは、tukey's test (図 a, b, d) または student's t-test (図 e) によって検定を行い、異符号間で統計的に有意な差が見られたことを示す ($p < 0.05$)。

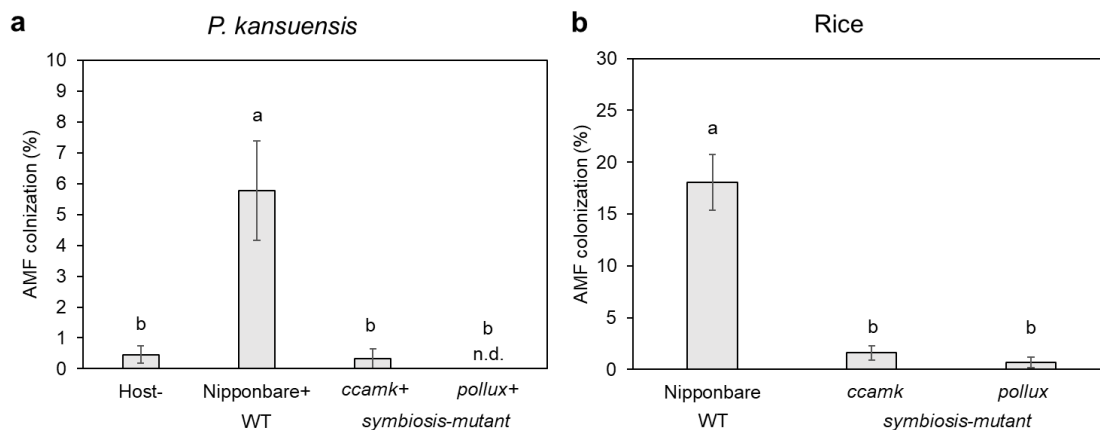


図 21. イネ AM 共生変異体と共栽培した *P. kansuensis* の AM 菌感染率

a) イネの AM 共生変異体を宿主植物として共栽培した *P. kansuensis* の根における接種後 60 日時点の AM 菌感染率 (平均値 \pm SE / n=9-12) の比較。b) 宿主植物のイネの野生型及び変異体の根における接種後 60 日時点の AM 菌感染率 (平均値 \pm SE / n=9-12) の比較。図の横軸の処理区は、Host-: 宿主植物不在、品種または変異体名+: 当該宿主植物存在の条件下で、それぞれ栽培したことを示す。n.d. は、AM 菌感染が全く観察できなかったことを示す。図中のアルファベットは、tukey's test によって検定を行い、異符号間で統計的に有意な差が見られたことを示す ($p < 0.05$)。

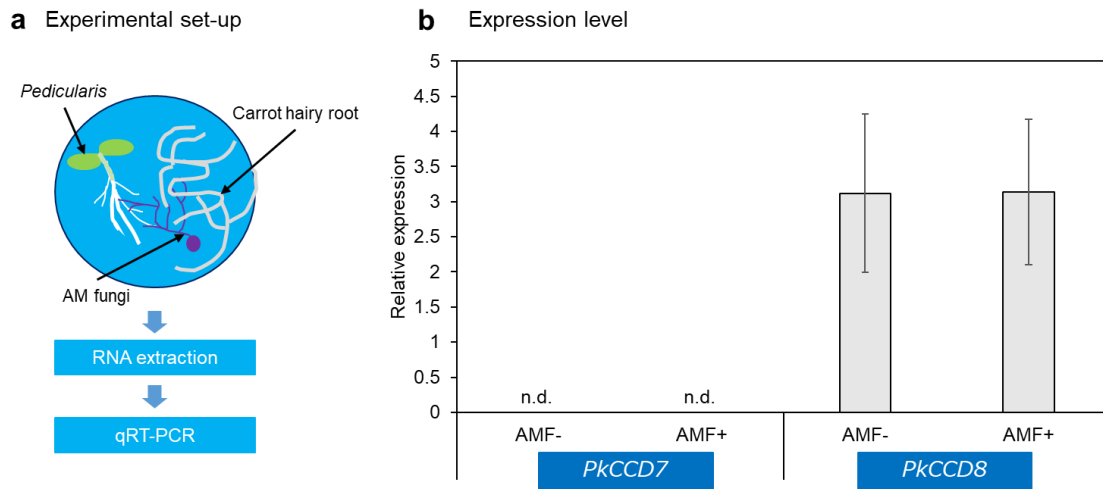


図 22. AM 菌と接触させた *P. kansuensis* の初期の遺伝子発現

a) AM 菌の菌糸と接触させた植物の遺伝子発現解析の実験系の概略図を示した。*P. kansuensis* の植物体をニンジン毛状根 (carrot hairy root) と共生させた AM 菌の菌糸と触れるように置いて 24 時間処理した後、植物の根を採取して total RNA を抽出し、qRT-PCR 解析を実施した。b) *P. kansuensis* の根における AM 共生関連遺伝子の発現量の処理区間比較。左から順に、*CCD7* (*PkCCD7*) 及び *CCD8* (*PkCCD8*) のデータを示した。グラフは、内在性コントロール遺伝子として *P. kansuensis* では *ACTIN* を用いて算出した各遺伝子の相対的発現量 (平均値 \pm SE / n=3) を示す。横軸の処理区は、AMF-: AM 菌不在、AMF+: AM 菌存在の条件でそれぞれ培養したことを示す。n.d. は、遺伝子の発現が検出限界以下であったことを示す。アスタリスクは student's t-test によって処理区間で統計的に有意な差が見られたことを示す (*: $p < 0.1$, **: $p < 0.05$, ***: $p < 0.01$)。

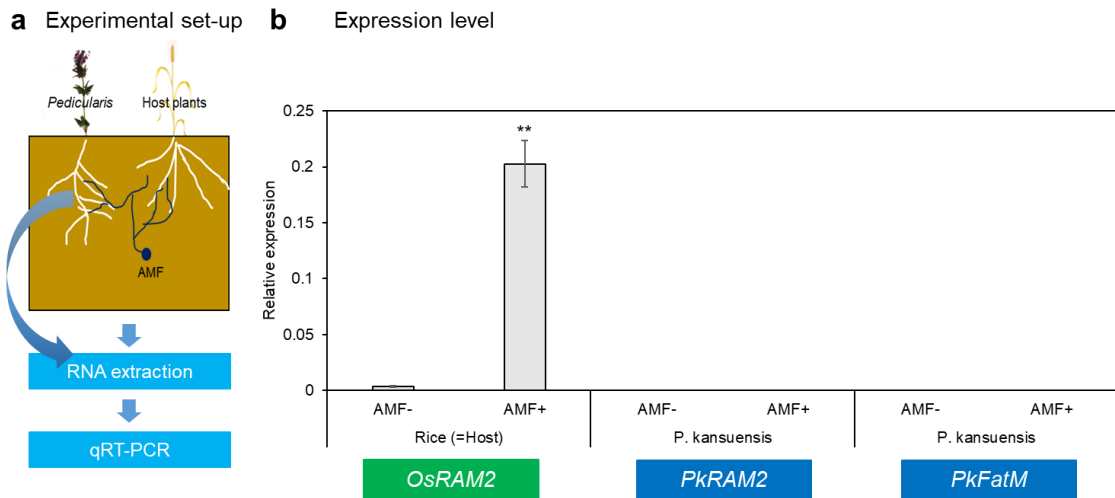


図 23. AM 菌感染時における *P. kansuensis* の共生関連遺伝子の発現

a) AM 菌感染時の植物の遺伝子発現解析の実験系の概略図を示した。*P. kansuensis* と宿主植物・イネ（コシヒカリ）を AM 菌接種下で 60 日間栽培した後、各植物の根を採取して total RNA を抽出し、qRT-PCR 解析を実施した。b) *P. kansuensis* 及び宿主植物・イネの根における AM 共生関連遺伝子の発現量の処理区間比較。左から順に、イネの *RAM2* (*OsRAM2*)、*P. kansuensis* の *RAM2* (*PkRAM2*) 及び *FatM* (*PkFatM*) のデータを示した。グラフは、内在性コントロール遺伝子として *P. kansuensis* では *ACTIN* を、イネでは *CYCLOPHILIN2* を、それぞれ用いて算出した各遺伝子の相対的発現量（平均値 ± SE/n=11）を示す。横軸の処理区は、AMF-: AM 菌非接種、AMF+: AM 菌接種の条件でそれぞれ栽培したことを示す。アスタリスクは student's t-test によって処理区間で統計的に有意な差が見られたことを示す (*: p<0.1, **: p<0.05, ***: p<0.01)。

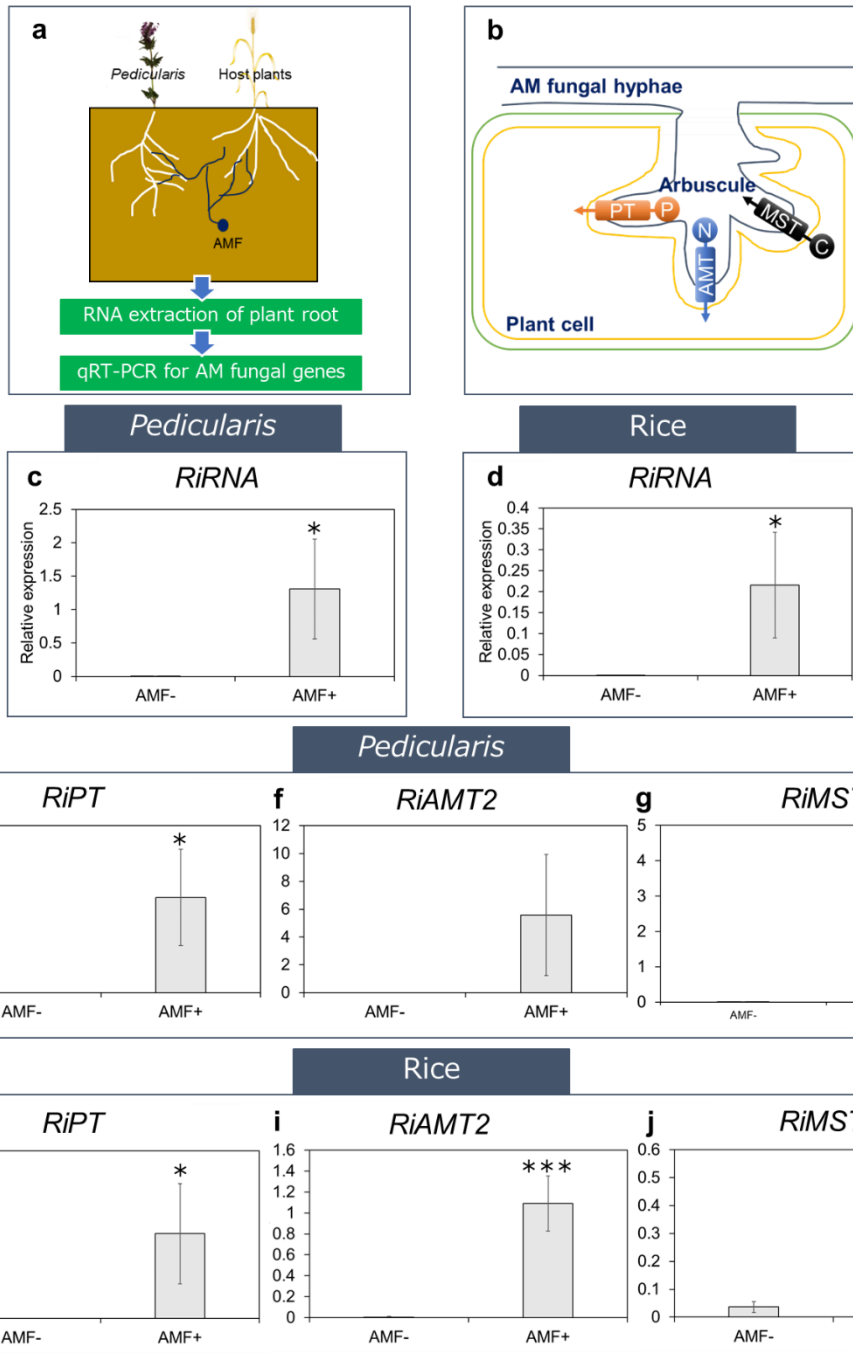


図 24. 植物感染時における AM 菌の共生関連遺伝子の発現

a) 植物に感染する AM 菌の遺伝子発現解析の実験系の概略図を示した。 *P. kansuensis* と宿主植物・イネ (コシヒカリ) を AM 菌接種下で 60 日間栽培した後、各植物の根 (AM 菌感染根含む) を採取して total RNA を抽出し、AM 菌の遺伝子を対象とする qRT-PCR 解析を実施した。 b) 解析対象の輸送体の組織内における配置図を示した。解析対象の AM 菌側の栄養輸送体は、植物細胞内に形成された AM 菌の樹枝状体の AM 菌側の細胞膜上に存在する。 PT: phosphate transporter (リン酸輸送体)、AMT:

ammonium transporter (アンモニウム輸送体)、MST: monosaccharide transporter (単糖輸送体)、P: リン栄養(リン酸)、N: 窒素栄養(アンモニア)。C: 炭素栄養(糖)。c) *P. kansuensis* の根における AM 菌のリボソーム RNA (*RirRNA*) の発現量の処理区間比較。d) 宿主植物・イネの根における AM 菌の *RirRNA* の発現量の処理区間比較。e-g) *P. kansuensis* の根における AM 菌の 3 輸送体遺伝子 (e: *RiPT*、f: *RiAMT2*、g: *RiMST4*) の発現量の処理区間比較。h-j) 宿主植物・イネの根における AM 菌の 3 輸送体遺伝子 (h: *RiPT*、i: *RiAMT2*、j: *RiMST4*) の発現量の処理区間比較。c-j) グラフは、内在性コントロール遺伝子として *P. kansuensis* では *ACTIN* を、イネでは *CYCLOPHILIN2* を、それぞれ用いて算出した各遺伝子の相対的発現量 (平均値 \pm SE / n=10) を示す。横軸の処理区は、AMF-: AM 菌非接種、AMF+: AM 菌接種の条件でそれぞれ栽培したことを示す。アスタリスクは student's t-test によって処理区間で統計的に有意な差が見られたことを示す (*: p<0.1, **: p<0.05, ***: p<0.01)。

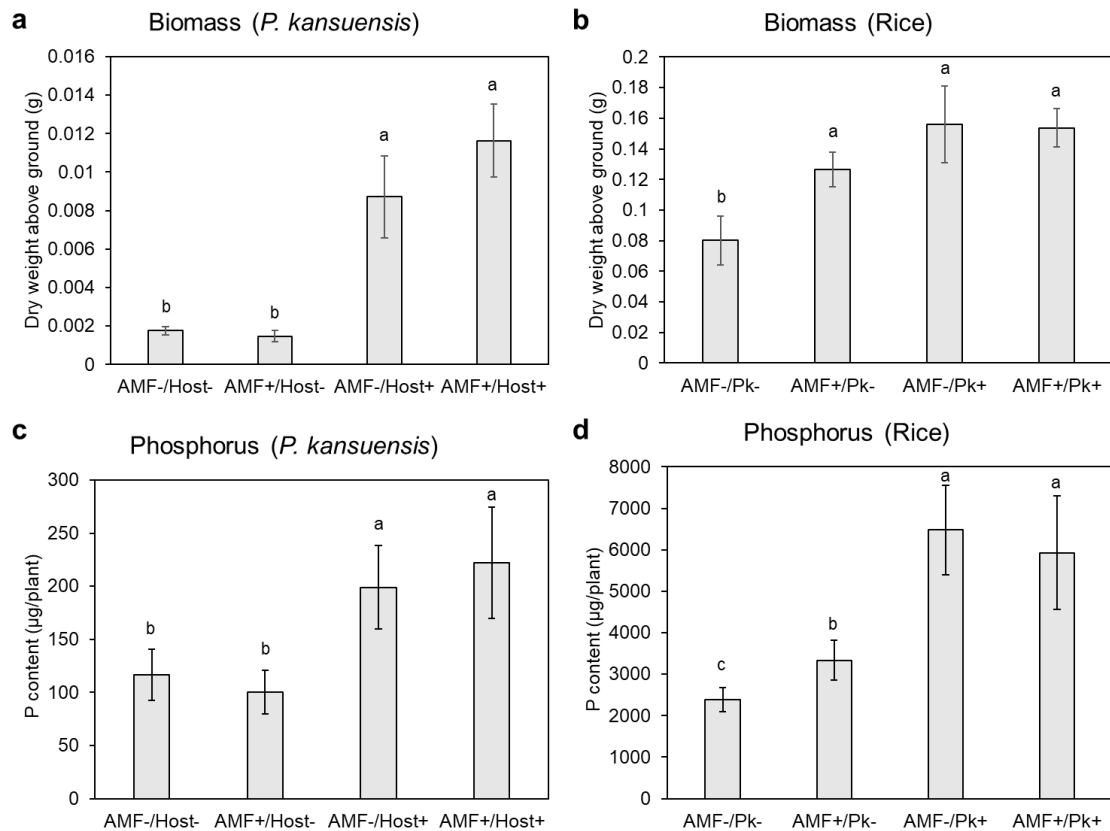


図 25. リン欠乏条件下において AM 菌の接種が *P. kansasensis* 及びイネの生長とリン吸収に与える影響

a) リン欠乏条件下で AM 菌接種後 60 日栽培した *P. kansasensis* の地上部の乾燥重量 (平均値 \pm SE / n=15-25) の比較。b) リン欠乏条件下で AM 菌接種後 60 日栽培した宿主植物・イネ (コシヒカリ) の地上部の乾燥重量 (平均値 \pm SE / n=17-28) の比較。c) リン欠乏条件下で AM 菌接種後 60 日栽培した *P. kansasensis* の地上部のリン含有量 (平均値 \pm SE / n=12) の比較。d) リン欠乏条件下で AM 菌接種後 60 日栽培した宿主植物・イネ (コシヒカリ) の地上部のリン含有量 (平均値 \pm SE / n=12) の比較。図の横軸は処理区を示し、AMF-: AM 菌非接種、AMF+: AM 菌接種、Host-: 宿主植物 (イネ) 不在、Host+: 宿主植物 (イネ) 存在、Pk-: *P. kansasensis* 不在、Pk+: *P. kansasensis* 存在の条件下で、それぞれ栽培したことを示す。図中のアルファベットは、tukey's test によって検定を行い、異符号間で統計的に有意な差が見られたことを示す (p<0.05)。

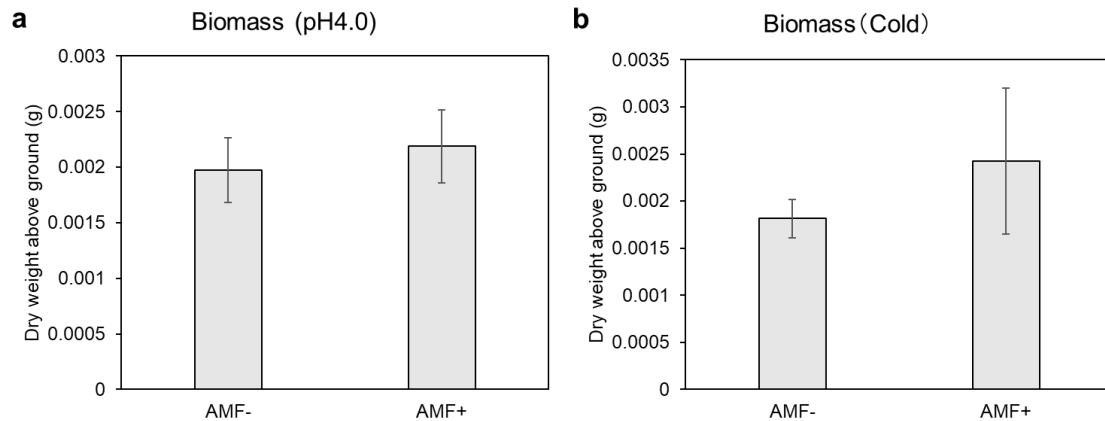


図 26. 非生物的環境ストレス条件下において AM 菌の接種が *P. kansuensis* の生長に与える影響

a) 酸性土壌条件で AM 菌接種後 60 日単独栽培した *P. kansuensis* の地上部の乾燥重量 (平均値 \pm SE / n=10) の比較。b) 低温条件で AM 菌接種後 60 日単独栽培した *P. kansuensis* の地上部の乾燥重量 (平均値 \pm SE / n=6) の比較。図の横軸は処理区を示し、AMF-: AM 菌非接種、AMF+: AM 菌接種の条件下で、それぞれ栽培したことを示す。アスタリスクは student's t-test によって処理区間で統計的に有意な差が見られたことを示す (*: $p < 0.1$, **: $p < 0.05$, ***: $p < 0.01$)。

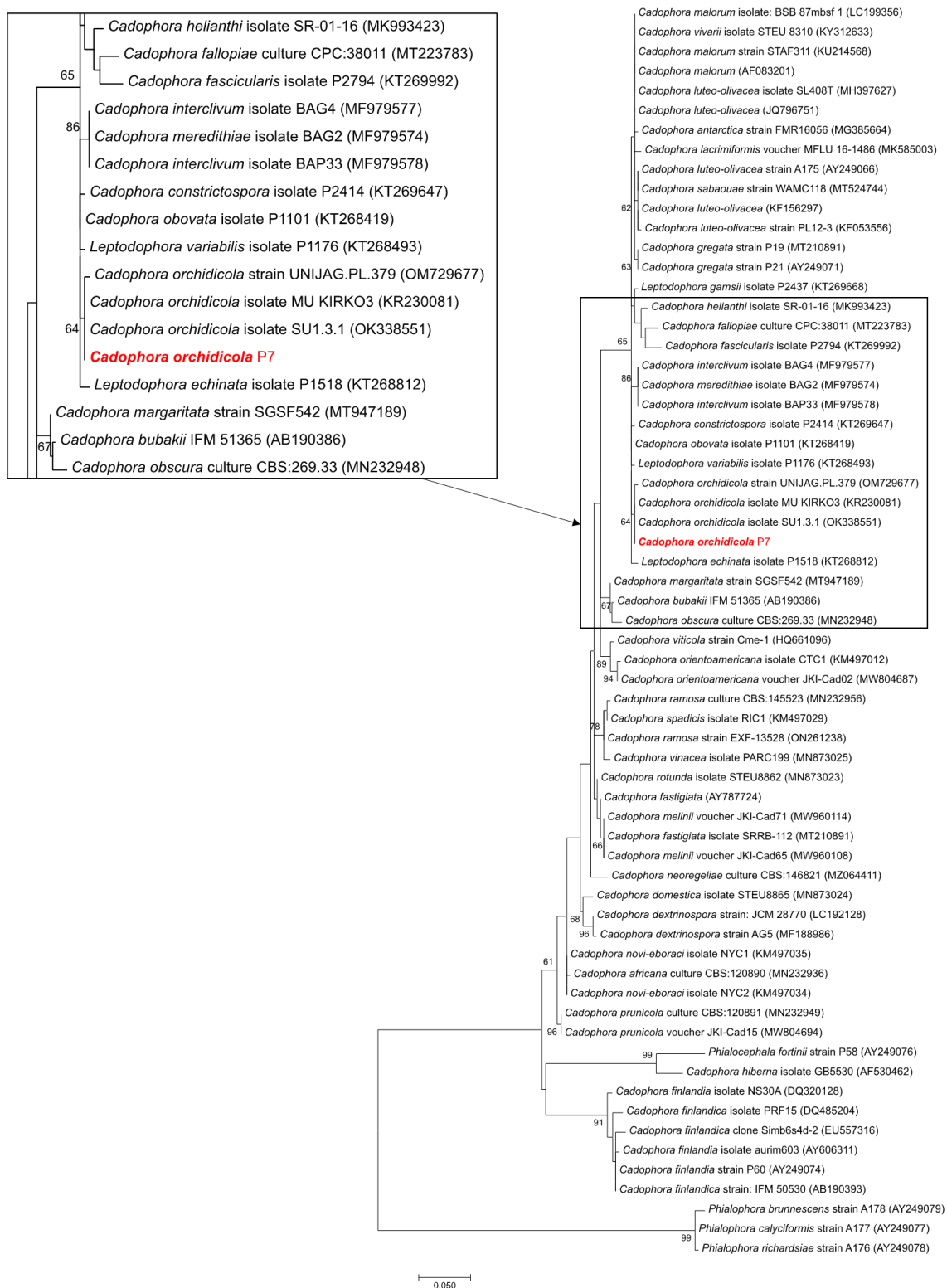


図 27. *Cadophora* 属真菌の系統樹

真菌の *ITS1-5.8S rRNA-ITS2* 領域の塩基配列を基に最尤法を用いて構築した。系統樹の枝上の数値は bootstrap 値 (1,000 回試行時) で、50 以上の数値のみ示した。本研究にお

いて単離された真菌系統 P7 は赤字で示した。真菌 P7 以外の塩基配列情報は GenBank (NCBI) から入手し、各真菌の種名の後の () 内にアクセッション番号を記載した。

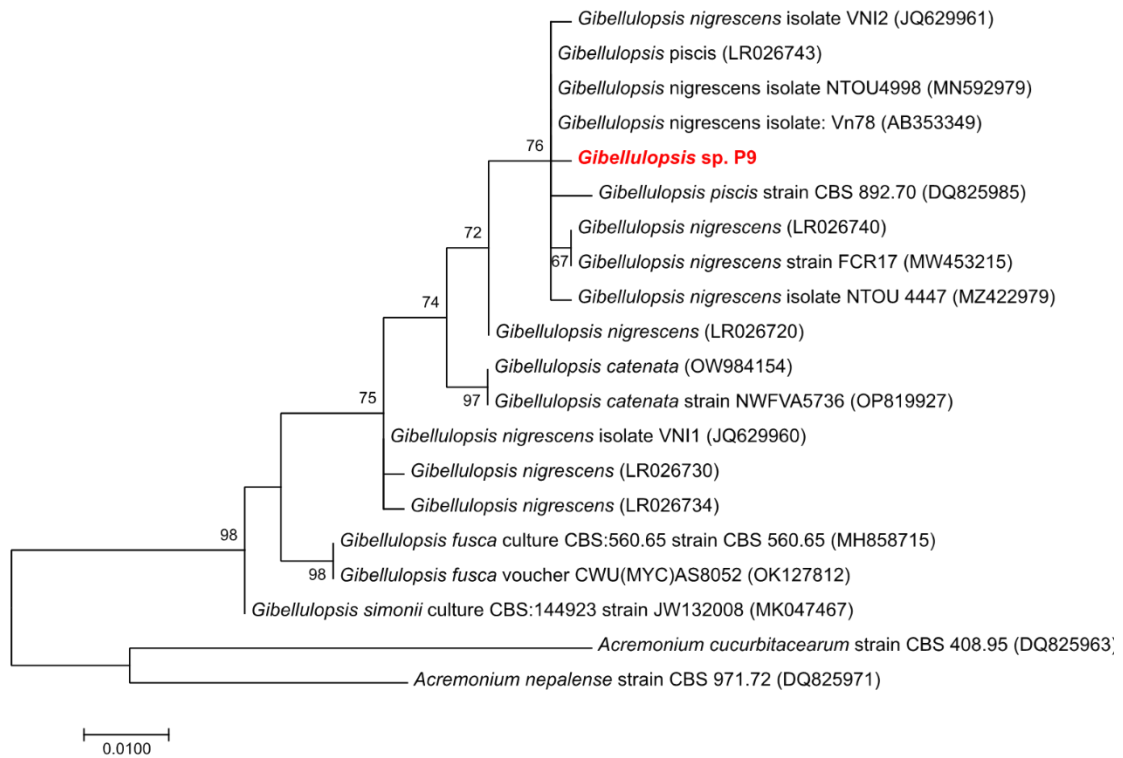


図 28. *Gibellulopsis* 属真菌の系統樹

真菌の *ITS1-5.8S rRNA-ITS2* 領域の塩基配列を基に最尤法を用いて構築した。系統樹の枝上の数値は bootstrap 値 (1,000 回試行時) で、50 以上の数値のみ示した。本研究において単離された真菌系統 P9 は赤字で示した。真菌 P9 以外の塩基配列情報は GenBank (NCBI) から入手し、各真菌の種名の後の () 内にアクセッション番号を記載した。

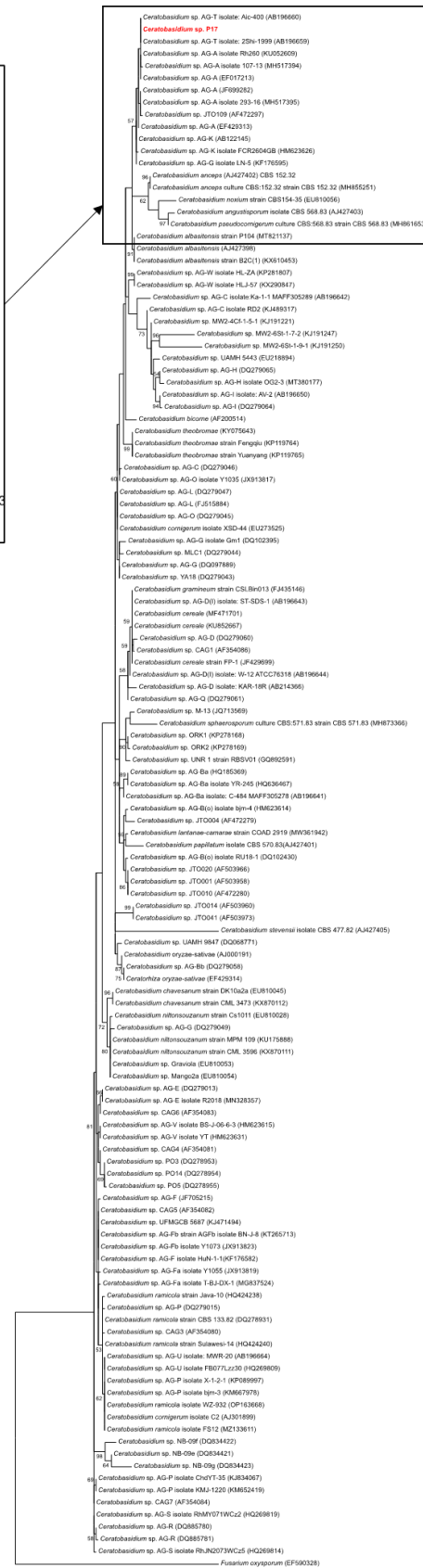
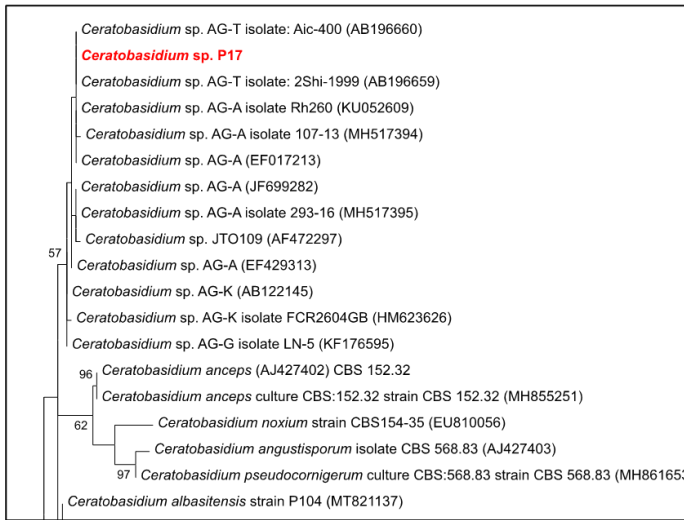


図 29. *Ceratobasidium* 属真菌の系統樹

真菌の *ITS1-5.8S rRNA-ITS2* 領域の塩基配列を基に最尤法を用いて構築した。系統樹の枝上の数値は bootstrap 値 (1,000 回試行時) で、50 以上の数値のみ示した。本研究において単離された真菌系統 P17 は赤字で示した。真菌 P17 以外の塩基配列情報は GenBank (NCBI) から入手し、各真菌の種名の後の () 内にアクセッション番号を記載した。

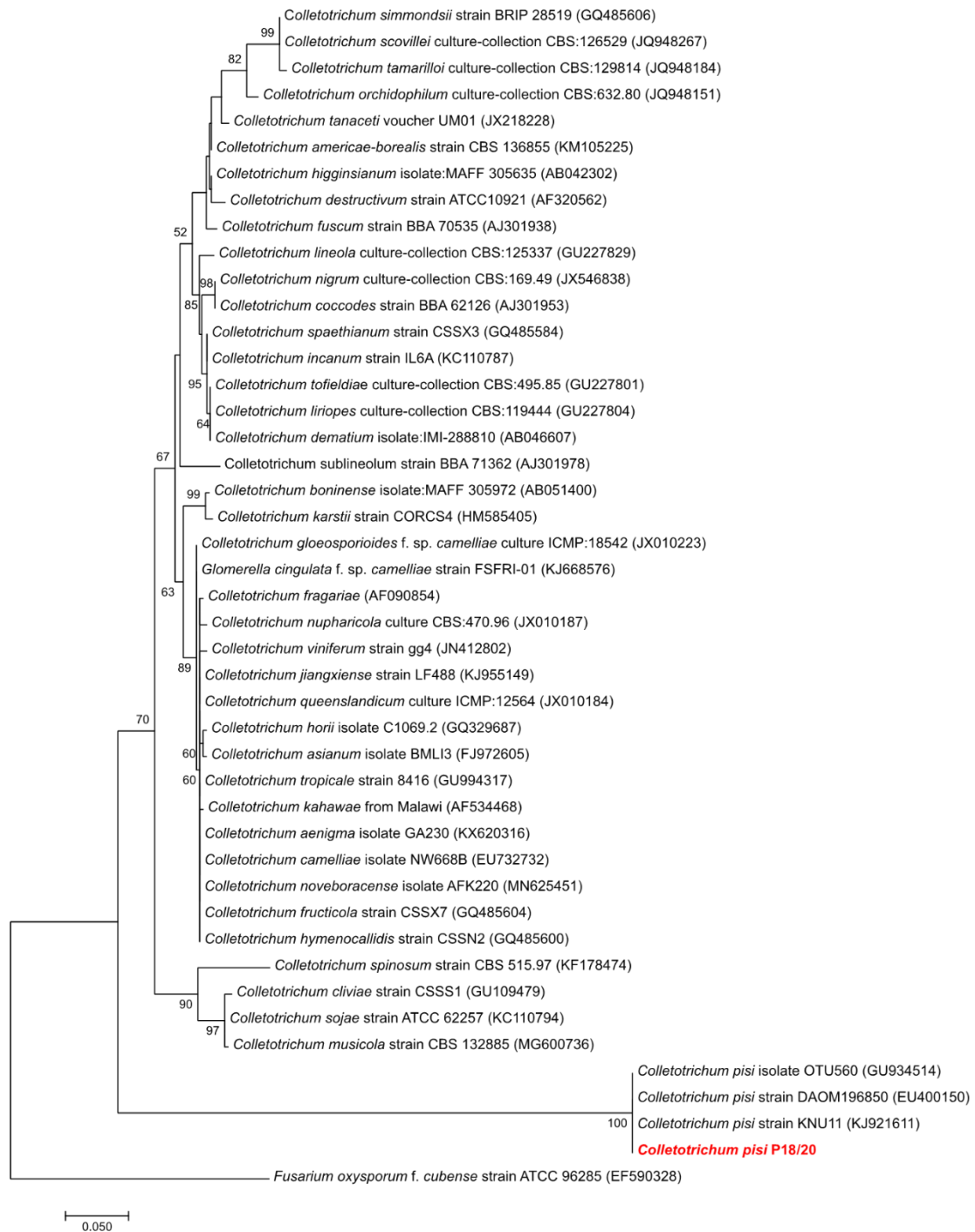


図 30. *Colletotrichum* 属真菌の系統樹

真菌の *ITS1-5.8S rRNA-ITS2* 領域の塩基配列を基に最尤法を用いて構築した。系統樹の枝上の数値は bootstrap 値 (1,000 回試行時) で、50 以上の数値のみ示した。本研究において単離された真菌系統 P18/20 は赤字で示した。真菌 P18/20 以外の塩基配列情報は GenBank (NCBI) から入手し、各真菌の種名の後の () 内にアクセッション番号を記載した。

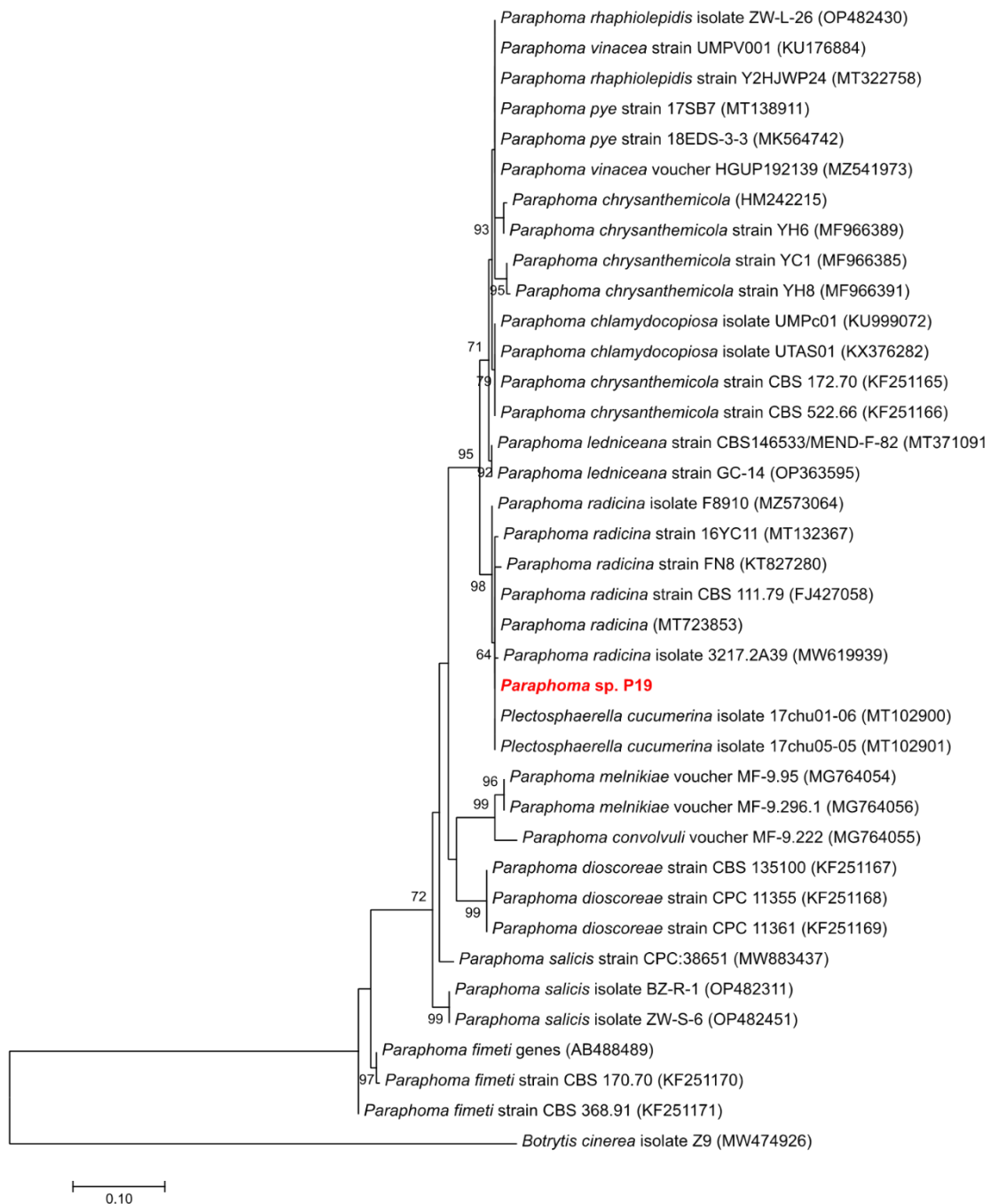


図 31. *Paraphoma* 属真菌の系統樹

真菌の *ITS1-5.8S rRNA-ITS2* 領域の塩基配列を基に最尤法を用いて構築した。系統樹の枝上の数値は bootstrap 値 (1,000 回試行時) で、50 以上の数値のみ示した。本研究において単離された真菌系統 P19 は赤字で示した。真菌 P19 以外の塩基配列情報は GenBank (NCBI) から入手し、各真菌の種名の後の () 内にアクセッション番号を記載した。

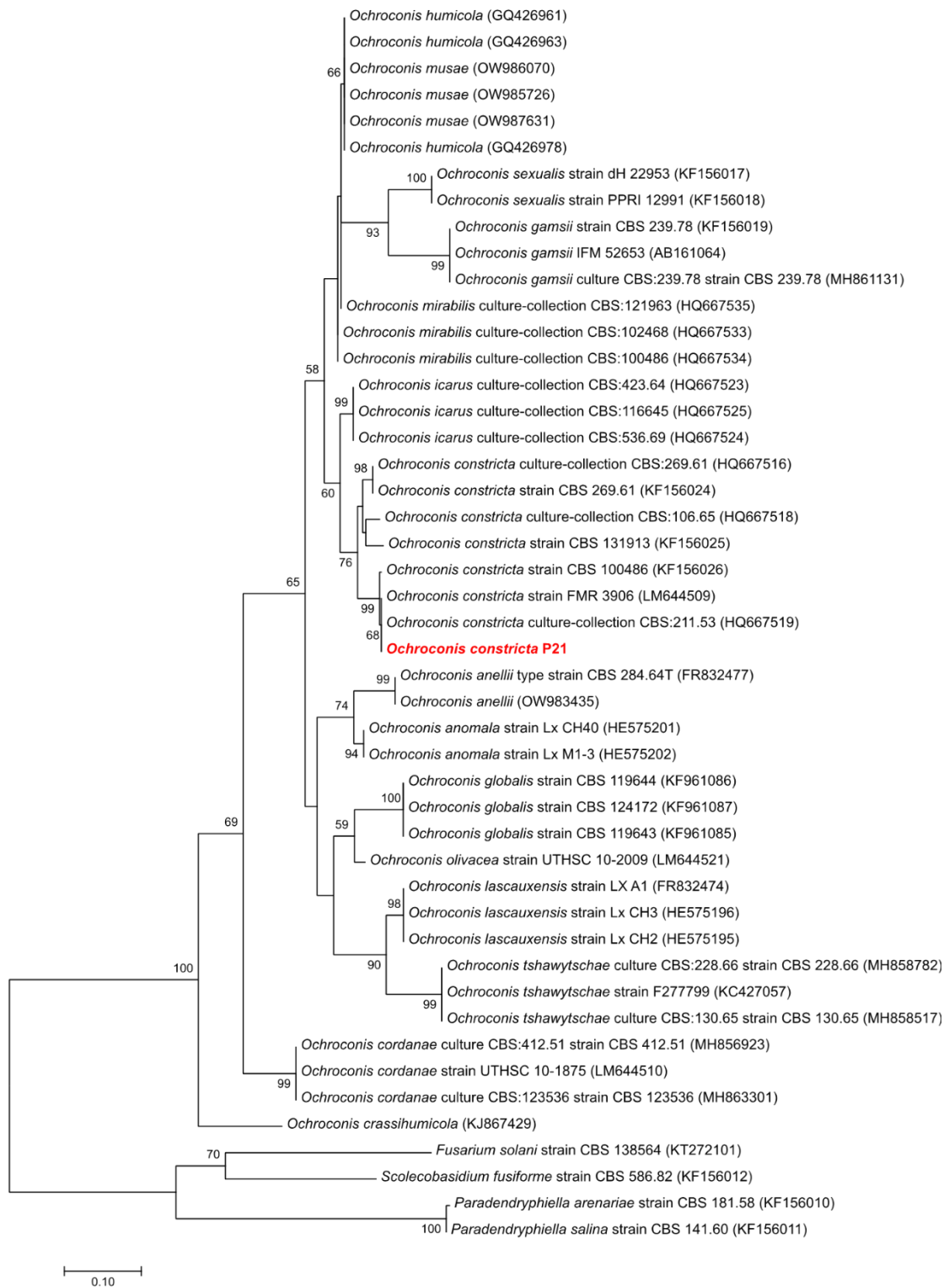


図 32. *Ochroconis* 属真菌の系統樹

真菌の *ITS1-5.8S rRNA-ITS2* 領域の塩基配列を基に最尤法を用いて構築した。系統樹の枝上の数値は bootstrap 値 (1,000 回試行時) で、50 以上の数値のみ示した。本研究にお

いて単離された真菌系統 P21 は赤字で示した。真菌 P21 以外の塩基配列情報は GenBank (NCBI) から入手し、各真菌の種名の後の () 内にアクセッション番号を記載した。

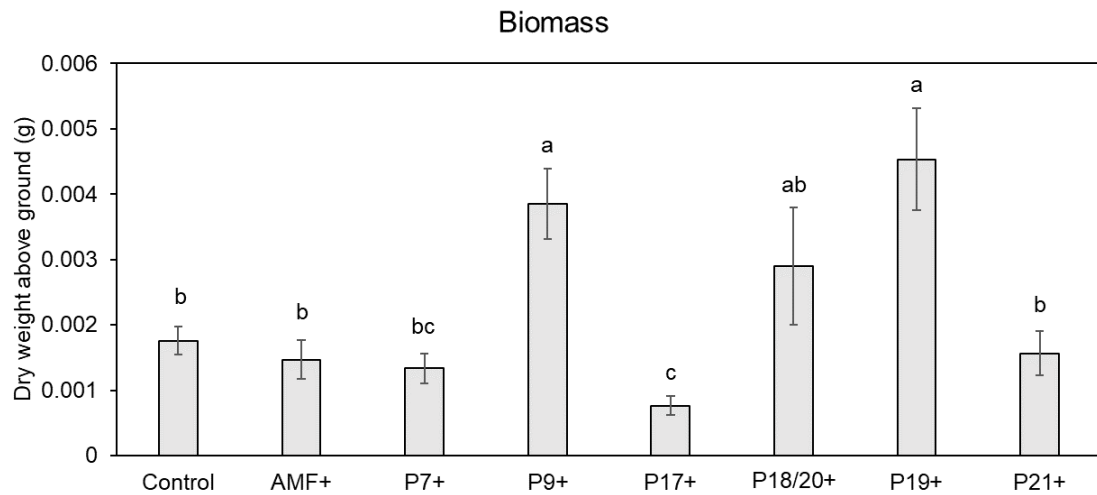


図 3. *P. kansuensis* の生育に対する単離された内生真菌の接種効果

AM 菌や内生真菌の接種後 60 日における *P. kansuensis* の地上部の乾燥重量（平均値 \pm SE / n=9-16）の比較。横軸は処理区を示し、Control: 真菌非接種、AMF+: AM 菌接種、P7+、P9+、P17+、P18/20+、P19、P21+: 各内生真菌接種の条件下で、それぞれ栽培したことを示す。各図中のアルファベットは、tukey's test によって検定を行い、異符号間で統計的に有意な差が見られたことを示す ($p < 0.05$)。

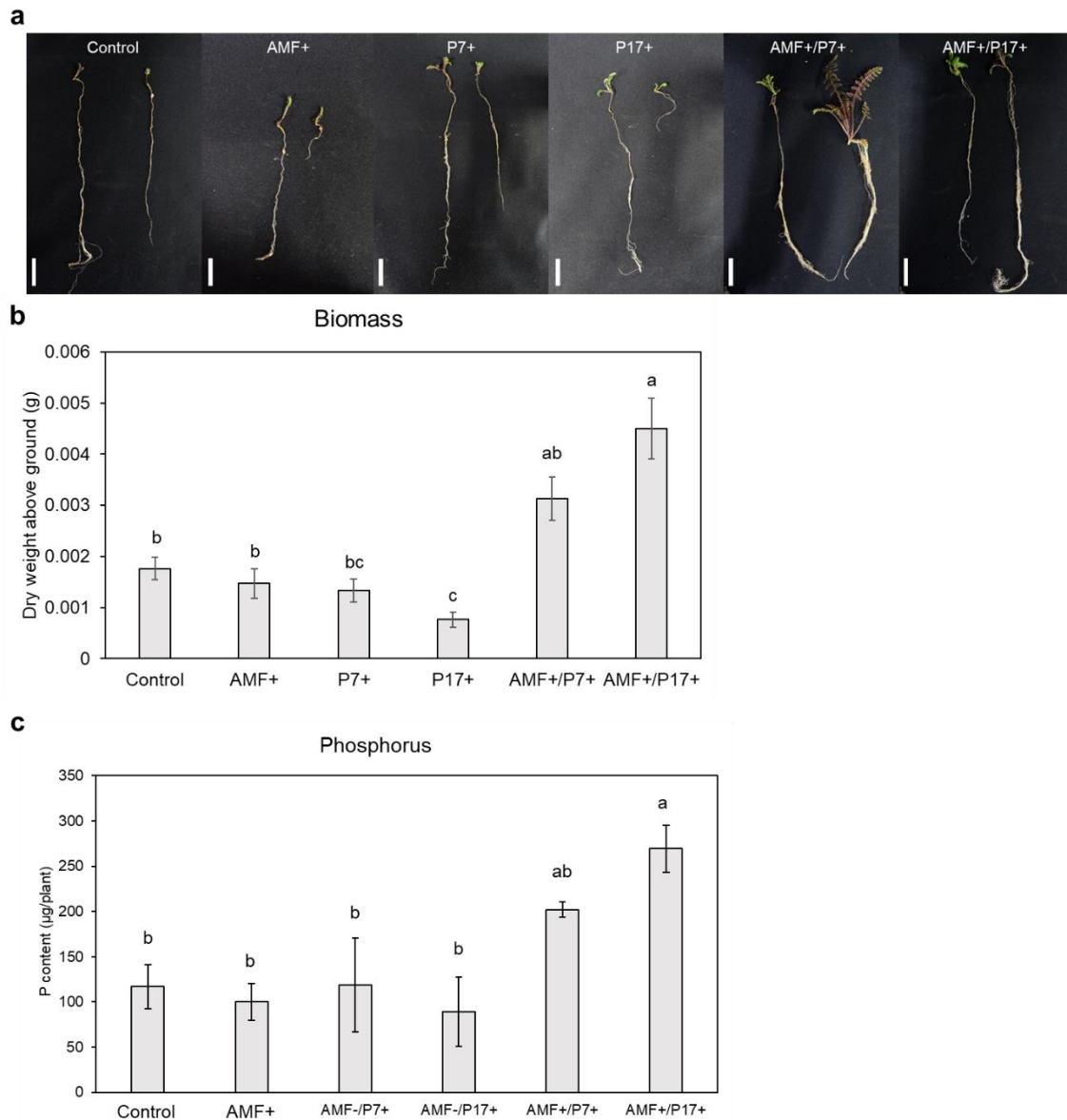


図 34. AM 菌及び内生真菌の共接種が *P. kansuensis* の生長に与える影響

a) AM 菌や内生真菌の接種後 60 日における *P. kansuensis* の表現型。図中のバーは 1 cm を示す。c) AM 菌や内生真菌の接種後 60 日における *P. kansuensis* の地上部の乾燥重量 (平均値 \pm SE / n=9-20) の比較。c) AM 菌や内生真菌の接種後 60 日における *P. kansuensis* の地上部のリン含有量 (平均値 \pm SE / n=12) の比較。a, b, c) 図の横軸は処理区を示し、Control: 真菌非接種、AMF+: AM 菌の単独接種、P7+: 真菌 P7 の単独接種、P17+: 真菌 P17 の単独接種、AMF+/P7+: AM 菌と真菌 P7 の共接種、AMF+/P17+: AM 菌と真菌 P17 の共接種条件下で、それぞれ栽培したことを示す。図中のアルファベットは、tukey's test によって検定を行い、異符号間で統計的に有意な差が見られたことを示す ($p < 0.05$)。

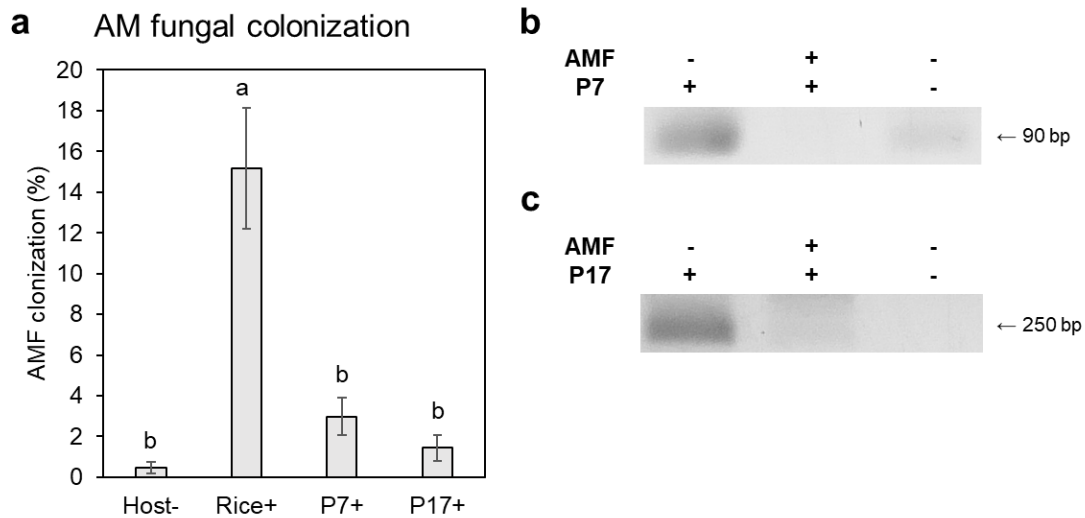


図 35. AM 菌と内生真菌の共接種が互いの感染に与える影響

a) AM 菌と内生真菌の共接種後 60 日における *P. kansuensis* の AM 菌感染率 (平均値 \pm SE / n=7-12) の比較を示した。図の横軸は処理区を示し、Host-: 宿主植物が存在しない単独栽培 (AM 菌のみ接種)、Rice+: 宿主植物・イネ (コシヒカリ) との共栽培 (AM 菌のみ接種)、P7+: AM 菌と真菌 P7 の共接種 (宿主植物なし)、P17+: AM 菌と真菌 P17 の共接種 (宿主植物なし) の条件下で、それぞれ栽培したことを示す。図中のアルファベットは、tukey's test によって検定を行い、異符号間で統計的に有意な差が見られたことを示す ($p < 0.05$)。b, c) AM 菌や内生真菌の接種後 60 日における *P. kansuensis* の根から抽出した DNA を内生真菌 P7 及び P17 の系統特異的プライマーセットによる PCR に供し、その増幅産物をアガロースゲル電気泳動した時の写真を示した。 -: 非接種、+: 接種。

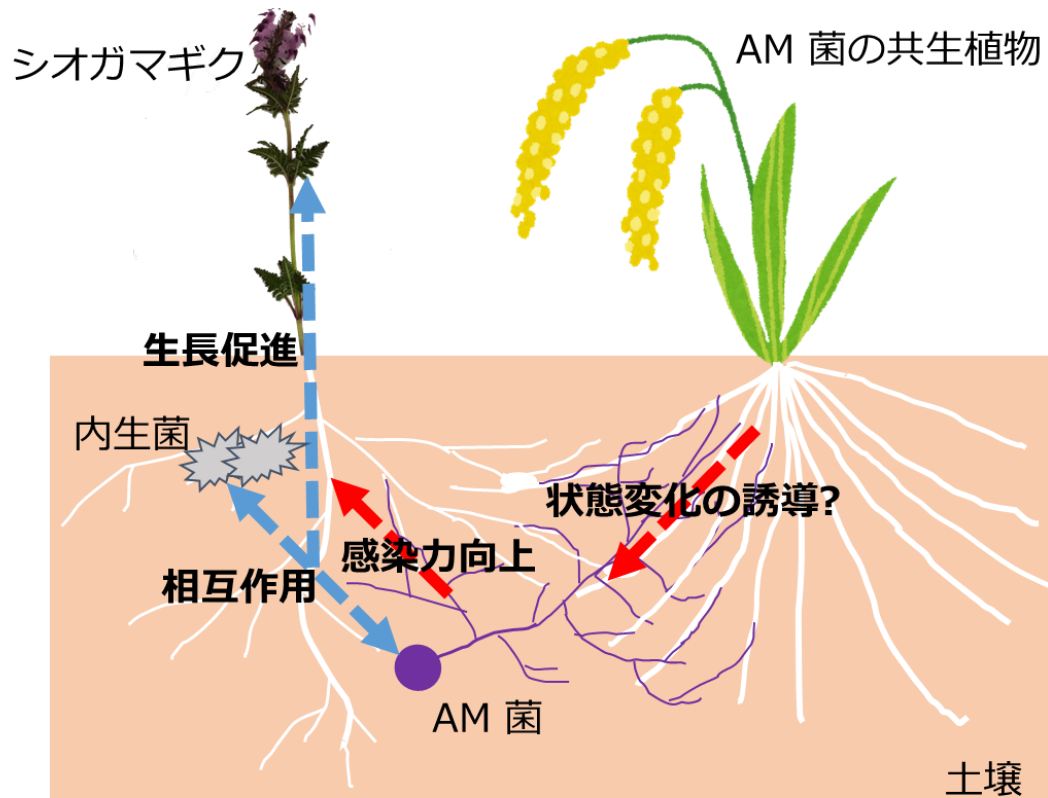


図 36. シオガマギク属植物、宿主植物、AM 菌、内生菌を含む共生系
 シオガマギク属寄生植物の周辺に生える AM 菌と共生している植物が、AM 菌を共生状態へと性質を変化させた結果、AM 菌の植物への感染能力が上昇する可能性がある。
 (赤矢印) AM 菌は根表面に付着器を形成したり、根表面の間隙等を通じて侵入したりすることでシオガマギク属にも感染する(赤矢印)。そして、根内や根圏に存在する AM 菌は病原菌やラン菌根菌などの他の真菌類との相互作用を通じてシオガマギク属の生長を促進する場合がある(青矢印)。このような菌類間の相互作用による生長促進効果は、シオガマギク属の高山環境における生存率の向上に貢献している可能性が考えられる。

表 1. 菌叢解析の対象植物種

ID	Species (Japanese)	Species (Scientific)	Location						AM fungi					Endophyte			
			Site	Prefecture	Latitude	Longitude	Altitude	Habitat	Hyphae ⁶¹	Arbuscule ⁶¹	Vesicle ⁶¹	Colonization (%) ⁶¹	Metagenome ⁶²	<i>Cadophora</i> ⁷³	<i>Ceratobasidium</i> ⁷³	<i>Colletrichum</i> ⁷³	<i>Paraphoma</i> ⁷³
YAKPa14	ミヤマシオガマ	<i>Pedicularis apodochila</i>	Mt. Yakeishidake	Iwate	39° 09' N	140° 49' E	1,547 m	Alpine meadow	-	-	-	0	-	-	-	-	-
YAKPa15-1	ミヤマシオガマ	<i>Pedicularis apodochila</i>	Mt. Yakeishidake	Iwate	39° 09' N	140° 49' E	1,547 m	Alpine meadow	+	+	+	85	+	-	-	-	-
GASPa5-1	ミヤマシオガマ	<i>Pedicularis apodochila</i>	Mt. Gassan	Yamagata	38° 32' N	140° 01' E	1,984 m	Alpine meadow	+	+	+	30	+	+	+	-	-
GASPa11-1	ミヤマシオガマ	<i>Pedicularis apodochila</i>	Mt. Gassan	Yamagata	38° 32' N	140° 01' E	1,984 m	Alpine meadow	+	-	-	22	+	-	+	-	+
YATPa108	ミヤマシオガマ	<i>Pedicularis apodochila</i>	Mts. Yatsugatake	Nagano	35° 58' N	138° 22' E	2,899 m	Alpine meadow	+	+	+	60	+	-	-	-	-
YATPa109	ミヤマシオガマ	<i>Pedicularis apodochila</i>	Mts. Yatsugatake	Nagano	35° 58' N	138° 22' E	2,899 m	Alpine meadow	-	-	-	0	-	-	-	-	-
KITPa89	ミヤマシオガマ	<i>Pedicularis apodochila</i>	Mt. Kitadake	Yamanashi	35° 40' N	138° 14' E	3,193 m	Alpine meadow	-	-	-	0	-	-	-	-	-
KITPa90	ミヤマシオガマ	<i>Pedicularis apodochila</i>	Mt. Kitadake	Yamanashi	35° 40' N	138° 14' E	3,193 m	Alpine meadow	-	-	-	0	-	-	-	-	-
REBPc22	ヨツバシオガマ	<i>Pedicularis chamissonis</i>	Rebun Island	Hokkaido	45° 27' N	141° 02' E	52 m	Arctic meadow	-	-	-	0	+	+	-	-	-
TAIPc45	ヨツバシオガマ	<i>Pedicularis chamissonis</i>	Mts. Taisetsu	Hokkaido	43° 39' N	142° 54' E	2,230 m	Alpine meadow	+	-	-	31	+	-	-	-	-
TAIPc49	ヨツバシオガマ	<i>Pedicularis chamissonis</i>	Mts. Taisetsu	Hokkaido	43° 39' N	142° 54' E	2,230 m	Alpine meadow	-	-	-	0	-	-	-	-	-
GASPa7-1	ヨツバシオガマ	<i>Pedicularis chamissonis</i>	Mt. Gassan	Yamagata	38° 32' N	140° 01' E	1,984 m	Alpine meadow	+	+	+	50	+	-	-	-	-
GASPa13-1	ヨツバシオガマ	<i>Pedicularis chamissonis</i>	Mt. Gassan	Yamagata	38° 32' N	140° 01' E	1,984 m	Alpine rocky place	-	-	-	0	+	-	-	-	+
SHBPc184	ヨツバシオガマ	<i>Pedicularis chamissonis</i>	Mt. Shibutsu	Gunma	36° 54' N	139° 10' E	2,228 m	Alpine meadow	-	-	-	0	-	-	-	-	-
SHBPc193	ヨツバシオガマ	<i>Pedicularis chamissonis</i>	Mt. Shibutsu	Gunma	36° 54' N	139° 10' E	2,228 m	Alpine meadow	+	+	-	15	+	+	+	-	+
KITPa79-1	ヨツバシオガマ	<i>Pedicularis chamissonis</i>	Mt. Kitadake	Yamanashi	35° 40' N	138° 14' E	3,193 m	Alpine meadow	-	-	-	0	-	-	-	-	-
KITPa82-1	ヨツバシオガマ	<i>Pedicularis chamissonis</i>	Mt. Kitadake	Yamanashi	35° 40' N	138° 14' E	3,193 m	Alpine meadow	+	-	+	24	+	-	+	-	-
YARPa135	ヨツバシオガマ	<i>Pedicularis chamissonis</i>	Mt. Yariगतake	Gifu	36° 20' N	137° 38' E	3,180 m	Alpine meadow	+	-	-	23	+	-	-	+	-
YARPa143	ヨツバシオガマ	<i>Pedicularis chamissonis</i>	Mt. Yariगतake	Gifu	36° 20' N	137° 38' E	3,180 m	Alpine rocky place	-	-	-	0	+	-	-	-	-

ID	Species (Japanese)	Species (Scientific)	Location						AM fungi					Endophyte			
			Site	Prefecture	Latitude	Longitude	Altitude	Habitat	Hyphae ^{*1}	Arbuscule ^{*1}	Vesicle ^{*1}	Colonization (%) ^{*1}	Metagenome ^{*2}	<i>Cadophora</i> ^{*3}	<i>Ceratobasidium</i> ^{*3}	<i>Colletotrichum</i> ^{*3}	<i>Paraphoma</i> ^{*3}
YARPc247	ヨツバシオガマ	<i>Pedicularis chamissonis</i>	Mt. Yariyake	Gifu	36° 20' N	137° 38' E	3,180 m	Alpine meadow	-	-	-	0	+	-	-	-	-
YARPc253	ヨツバシオガマ	<i>Pedicularis chamissonis</i>	Mt. Yariyake	Gifu	36° 20' N	137° 38' E	3,180 m	Alpine meadow	+	+	+	33	-	-	-	-	-
YARPc263	ヨツバシオガマ	<i>Pedicularis chamissonis</i>	Mt. Yariyake	Gifu	36° 20' N	137° 38' E	3,180 m	Alpine rocky place	+	+	+	48	+	-	-	-	-
HAKPc157	ヨツバシオガマ	<i>Pedicularis chamissonis</i>	Mts. Hakusan	Ishikawa	36° 09' N	136° 46' E	2,702 m	Alpine meadow	-	-	-	0	+	-	-	-	-
TAIPv53-1	タカネシオガマ	<i>Pedicularis verticillata</i>	Mts. Taisetsu	Hokkaido	43° 39' N	142° 54' E	2,230 m	Alpine rocky place	-	-	-	0	-	-	+	-	-
TAIPv57	タカネシオガマ	<i>Pedicularis verticillata</i>	Mts. Taisetsu	Hokkaido	43° 39' N	142° 54' E	2,230 m	Alpine rocky place	-	-	-	0	-	-	-	-	-
SHBPv178	タカネシオガマ	<i>Pedicularis verticillata</i>	Mt. Shibutsu	Gunma	36° 54' N	139° 10' E	2,228 m	Alpine rocky place	-	-	-	0	-	-	-	-	+
SHBPv186	タカネシオガマ	<i>Pedicularis verticillata</i>	Mt. Shibutsu	Gunma	36° 54' N	139° 10' E	2,228 m	Alpine rocky place	-	-	-	0	-	-	-	-	-
YATPv110	タカネシオガマ	<i>Pedicularis verticillata</i>	Mts. Yatsugatake	Nagano	35° 58' N	138° 22' E	2,899 m	Alpine rocky place	-	-	-	0	-	-	-	+	-
YATPv115	タカネシオガマ	<i>Pedicularis verticillata</i>	Mts. Yatsugatake	Nagano	35° 58' N	138° 22' E	2,899 m	Alpine rocky place	-	-	-	0	-	-	-	-	-
KITPv94	タカネシオガマ	<i>Pedicularis verticillata</i>	Mt. Kitadake	Yamanashi	35° 40' N	138° 14' E	3,193 m	Alpine rocky place	-	-	-	0	-	-	-	-	-
YARPv149	タカネシオガマ	<i>Pedicularis verticillata</i>	Mt. Yariyake	Gifu	36° 20' N	137° 38' E	3,180 m	Alpine rocky place	-	-	-	0	-	-	-	-	-
YARPv150	タカネシオガマ	<i>Pedicularis verticillata</i>	Mt. Yariyake	Gifu	36° 20' N	137° 38' E	3,180 m	Alpine rocky place	-	-	-	0	-	-	-	-	-
YARAn243	ハクサンイチゲ	<i>Anemone narcissiflora</i>	Mt. Yariyake	Gifu	36° 20' N	137° 38' E	3,180 m	Alpine meadow	+	+	+	93	+	-	-	-	-
YARAn249	ハクサンイチゲ	<i>Anemone narcissiflora</i>	Mt. Yariyake	Gifu	36° 20' N	137° 38' E	3,180 m	Alpine meadow	+	+	+	7	+	+	-	-	-
YARAn254	ハクサンイチゲ	<i>Anemone narcissiflora</i>	Mt. Yariyake	Gifu	36° 20' N	137° 38' E	3,180 m	Alpine meadow	+	+	+	63	+	-	+	-	-
YARAn259	ハクサンイチゲ	<i>Anemone narcissiflora</i>	Mt. Yariyake	Gifu	36° 20' N	137° 38' E	3,180 m	Alpine rocky place	+	+	+	47	+	-	-	-	-
YARAn264	ハクサンイチゲ	<i>Anemone narcissiflora</i>	Mt. Yariyake	Gifu	36° 20' N	137° 38' E	3,180 m	Alpine rocky place	-	-	-	0	+	-	-	-	-
YARSv245	アキノキリンソウ	<i>Solidago virgaurea</i>	Mt. Yariyake	Gifu	36° 20' N	137° 38' E	3,180 m	Alpine meadow	+	+	+	28	+	-	-	-	+
YARSv251	アキノキリンソウ	<i>Solidago virgaurea</i>	Mt. Yariyake	Gifu	36° 20' N	137° 38' E	3,180 m	Alpine meadow	+	+	+	46	-	-	-	-	-

ID	Species (Japanese)	Species (Scientific)	Location						AM fungi					Endophyte			
			Site	Prefecture	Latitude	Longitude	Altitude	Habitat	Hyphae ^{*1}	Arbuscule ^{*1}	Vesicle ^{*1}	Colonization (%) ^{*1}	Metagenome ^{*2}	<i>Cadophora</i> ^{*3}	<i>Ceratobasidium</i> ^{*3}	<i>Colletotrichum</i> ^{*3}	<i>Paraphoma</i> ^{*3}
YARSv256	アキノキリンソウ	<i>Solidago virgaurea</i>	Mt. Yarigatake	Gifu	36° 20' N	137° 38' E	3,180 m	Alpine meadow	+	+	+	56	+	-	-	-	-
YARSv261	アキノキリンソウ	<i>Solidago virgaurea</i>	Mt. Yarigatake	Gifu	36° 20' N	137° 38' E	3,180 m	Alpine rocky place	+	+	-	25	+	-	-	-	-
YARSv266	アキノキリンソウ	<i>Solidago virgaurea</i>	Mt. Yarigatake	Gifu	36° 20' N	137° 38' E	3,180 m	Alpine rocky place	+	+	+	9	+	-	-	-	-

^{*1} 染色根の顕微鏡観察により、AM 菌が、+ は確認できた、- は確認できなかったことをそれぞれ示す。感染率は顕微鏡観察の結果から算出したものである。

^{*2} メタゲノム解析において、AM 菌が、+ は確認できた、- は確認できなかったことをそれぞれ示す。

^{*3} メタゲノム解析において、各属の真菌が、+ は確認できた、- は確認できなかったことをそれぞれ示す。

表 2. 菌叢解析用の PCR master mix の組成

	1st PCR master mix	2nd PCR master mix
Template DNA	2.0 μL	—
Purified 1st PCR product	—	2.0 μL
10x Ex Buffer (Takara Bio)	1.0 μL	1.0 μL
dNTPs (each 2.5mM) (Takara Bio)	0.8 μL	0.8 μL
10 μM Forward primer	0.5 μL	0.5 μL
10 μM Reverse primer	0.5 μL	0.5 μL
ExTaq HS (Takara Bio)	0.1 μL	0.1 μL
Fill up to 10 μL with sterilized H_2O	10 μL	10 μL

表 3. 本研究で用いたプライマーの一覧

Primer-set	Primer-name	Target organism	Target gene	Sequence	Application	Reference
Fungal ITS*	1st_ITS1-F_KYO1	<i>Fungus</i>	<i>ITS1</i>	5'-ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTNNNN-CTHGGTCATTTAGAGGAATAA-3'	Metagenome	
	1st_ITS2_KYO2	<i>Fungus</i>	<i>ITS1</i>	5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTNNNN-TTYRCTRGGTTCATC-3'	Metagenome	
Illumina Miseq adaptor	2ndF	<i>Fungus</i>	<i>ITS</i>	5'-AATGATACGGCGACCCGAGATCTACAC-Index2 (8 bp)-ACACTCTTCCCTACACGACGC-3'	Metagenome	
	2ndR	<i>Fungus</i>	<i>ITS</i>	5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-Index1 (8 bp)-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTG-3'	Metagenome	
Fungal ITS	ITS1-F_KYO2	<i>Fungus</i>	<i>ITS</i>	5'-TAGAGGAAGTAAAAGTCGTA-3'	PCR	130
	ITS4	<i>Fungus</i>	<i>ITS</i>	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	PCR	131
PkACT2	PkACT2_F	<i>Pedicularis kansuensis</i>	<i>ACTIN</i>	5'-ACTGATCTTTGTAGGCCATTGTG-3'	RT-qPCR	This study
	PkACT2_R	<i>Pedicularis kansuensis</i>	<i>ACTIN</i>	5'-TCTGGATTGGAGGTCTATTTTGG-3'	RT-qPCR	This study
PkCCD7	PkCCD7_F	<i>Pedicularis kansuensis</i>	<i>CCD7</i>	5'-AGTGAGAATCTGTAAGCCCAATC-3'	RT-qPCR	This study
	PkCCD7_R	<i>Pedicularis kansuensis</i>	<i>CCD7</i>	5'-CCCTCGCAGTCATTTACCTC-3'	RT-qPCR	This study
PkCCD8	PkCCD8_F	<i>Pedicularis kansuensis</i>	<i>CCD8</i>	5'-TCCTTCTCCATTCTGTCACTTACC-3'	RT-qPCR	This study
	PkCCD8_R	<i>Pedicularis kansuensis</i>	<i>CCD8</i>	5'-TCAATACCCTCTGAACCCTTCTTC-3'	RT-qPCR	This study
PkRAM2	PkRAM2_F	<i>Pedicularis kansuensis</i>	<i>RAM2</i>	5'-ATGGTGGAGCCCTTCTCAC-3'	RT-qPCR	This study
	PkRAM2_R	<i>Pedicularis kansuensis</i>	<i>RAM2</i>	5'-TCGTGAAAATTATCGGCTTTC-3'	RT-qPCR	This study
PkFatM	PkFatM_F	<i>Pedicularis kansuensis</i>	<i>FatM</i>	5'-CGACAGGGGCGAAGTGATAG-3'	RT-qPCR	This study
	PkFatM_R	<i>Pedicularis kansuensis</i>	<i>FatM</i>	5'-GGCGTCTCGTGTGCTTGT-3'	RT-qPCR	This study
OsCYCLOPHILIN2	OsCYCLOPHILIN2F	<i>Oryza sativa</i>	<i>CYCLOPHILIN2</i>	5'-GTGGTGTTAGTCTTTTATGAGTTCGT-3'	RT-qPCR	94
	OsCYCLOPHILIN2R	<i>Oryza sativa</i>	<i>CYCLOPHILIN2</i>	5'-ACCAAACCATGGGCGATCT-3'	RT-qPCR	94
OsRAM2L	OsRAM2LF	<i>Oryza sativa</i>	<i>RAM2-LIKE</i>	5'-GGCGTGTCTTCATCTGCT-3'	RT-qPCR	This study
	OsRAM2LR	<i>Oryza sativa</i>	<i>RAM2-LIKE</i>	5'-TCCTGATCGGCGACAATATCT-3'	RT-qPCR	This study

Primer-set	Primer-name	Tagert organism	Target gene	Sequence	Application	Reference
GintrRNA	GintrRNA (5.8S Ribosomic) F	<i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>5.8S rRNA</i>	5'-GTATGCCTGTTTGAGGGTCAGTATT-3'	RT-qPCR	43
	GintrRNA (5.8S Ribosomic) R	<i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>5.8S rRNA</i>	5'-AAACTCCGGAACGTCACTAAAGAG-3'	RT-qPCR	43
GintPT	GintPT F	<i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>PT</i>	5'-AACACGATGTCAACAAAGCAAC-3'	RT-qPCR	43
	GintPT R	<i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>PT</i>	5'-AAGACCGATTCCATAAAAAGCA-3'	RT-qPCR	43
GintAMT2	GintAMT2 F	<i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>AMT2</i>	5'-AGTGCCAATGCCGCTAACATA-3'	RT-qPCR	43
	GintAMT2 R	<i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>AMT2</i>	5'-TGATGTACCTCCAACAATTCCA-3'	RT-qPCR	43
GintMST4	GintMST4 F	<i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>MST4</i>	5'-TAGCTACATTGCTATTGGTTTAG-3'	RT-qPCR	43
	GintMST4 R	<i>Rhizophagus irregularis</i>	<i>MST4</i>	5'-CCCTAACTCCAAAAATAATGAAC-3'	RT-qPCR	43
Cad-specific	Cspq1	<i>Cadophora</i>	<i>ITS</i>	5'-CTAGAGCAAAGGATAGGCAGC-3'	PCR	132
	Cspq2	<i>Cadophora</i>	<i>ITS</i>	5'-CGAGAGGTTTCGACGACTCTAA-3'	PCR	132
Cer-specific	AG-A	<i>Ceratobasidium</i>	<i>ITS</i>	5'-CTTGTGAGACTGGAGGCCGT-3'	PCR	133
	ThanaCera-R	<i>Ceratobasidium</i>	<i>ITS</i>	5'-TGATACTCAAACAGGCATGC-3'	PCR	133

* 参考文献 130 のプライマー配列に、シーケンス解析時における品質向上のための 0-5 塩基の異なる長さのランダム配列と、Illumina 社製シーケンサーの解析用アダプター配列を付加したものである。

表 4. 本研究の栽培実験で用いた植物種・系統の一覧

Species (Japanese)	Species (Scientific)	Strain	Non-parasite	Origin	Provider
	<i>Pedicularis kansuensis</i>		Facultative parasite	China	Dr. Ai Rong Li (CAS)
コシオガマ	<i>Phtheirospermum japonicum</i>	Okayama	Facultative parasite	Okayama	
ストライガ	<i>Striga hermonthica</i>		Obligate parasite	Sudan	
	<i>Lindenbergia philippensis</i>		Non-parasite		
イネ (コシヒカリ)	<i>Oryza sativa</i>	Koshihikari	Non-parasite		
イネ (日本晴)	<i>Oryza sativa</i>	Nipponbare	Non-parasite		Dr. Imaizumi (NARO)
イネ (シオカリ)	<i>Oryza sativa</i>	Shiokari	Non-parasite		RIKEN
イネ (<i>ccamk</i>)	<i>Oryza sativa</i>	<i>ccamk</i> (Nipponbare NE1115-3)	Non-parasite		Dr. Imaizumi (NARO)
イネ (<i>pollux</i>)	<i>Oryza sativa</i>	<i>pollux</i> (Nipponbare ND5050-4)	Non-parasite		Dr. Imaizumi (NARO)
イネ (<i>d10</i>)	<i>Oryza sativa</i>	<i>d10</i> (Shiokari)	Non-parasite		RIKEN
ミヤコグサ	<i>Lotus japonicus</i>	Miyakojima (MG-20)	Non-parasite		
タルウマゴヤシ	<i>Medicago truncatula</i>	A17	Non-parasite		Dr. Toyoda (Okayama Univ.)
チャイブ	<i>Allium schoenoprasum</i>		Non-parasite		
ニンジン毛状根	<i>Daucus carota</i>	T1	Non-parasite		Dr. Kawaguchi (NIBB)

表 5. 植物栽培用肥料 (Hoagland) 溶液の組成

Material	1/10 Hoagland solution	Nitrogen-deficient solution	1/2 Hoagland solution
KNO ₃	50.56 mg	—	252.8 mg
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	118.08 mg	—	590.4 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	49.3 mg	49.3 mg	246.5 mg
KH ₂ PO ₄	13.6 mg	13.6 mg	68.0 mg
Fe(III)-EDTA	3.77 mg	3.77 mg	18.85 mg
H ₃ BO ₃	0.286 mg	0.286 mg	1.43 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.18 mg	0.18 mg	0.9 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.022 mg	0.022 mg	0.11 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.008 mg	0.008 mg	0.04 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.00252 mg	0.00252 mg	0.0126 mg
Fill up to 1,000 mL H ₂ O	1,000 mL	1,000 mL	1,000 mL

pH 6.0 に調整後、121 °C で 20 分間オートクレーブ滅菌した。ただし、酸性条件は pH 4.0 に調整した。

表 6. ラクトグリセロール溶液の組成

Material	Volume
Lactic acid	875 mL
Glycerol	63 mL
Fill up to 1,000 mL H ₂ O	1,000 mL

表 7. PBS の組成

Material	Volume
NaCl	80 g
KCl	2.0 g
Na ₂ HPO ₄	14.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g
Fill up to 1,000 mL H ₂ O	1,000 mL

溶質を溶解後、HCl で pH 7.4 に調整して保管した。

蛍光染色には、10 倍希釈した溶液を用いた。

表 8. 培地の組成

Material	1/2MS ^{*1}	M ^{*2}	MMN ^{*3,4}
Murashige and Skoog Plant Salt Mixture (Fujifilm Wako)	4,600 mg	—	—
KNO ₃	—	80 mg	—
KCl	—	65 mg	—
KH ₂ PO ₄	—	4.8 mg	500 mg
(NH ₄) ₂ HPO ₄	—	—	250 mg
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	—	488 mg	—
CaCl ₂	—	—	50 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	—	731 mg	150 mg
NaCl	—	—	25 mg
NaFeEDTA	—	8 mg	—
1% Fe(III)Cl ₃ solution	—	—	1.2 mL
KI	—	0.75 mg	—
MnCl ₂ · 4H ₂ O	—	6 mg	—
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	—	2.75 mg	—
H ₃ BO ₃	—	1.5 mg	—
CuSO ₄ · 5H ₂ O	—	0.13 mg	—
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	—	0.0024 mg	—
MES	590 mg	—	—
Myo-inositol	100 mg	50 mg	—
Glycine	—	3 mg	—

Material	1/2MS ^{*1}	M ^{*2}	MMN ^{*3,4}
Thiamine hydrochloride	3 mg	0.1 mg	0.1 mg
Nicotinic acid	5 mg	0.5 mg	—
Pyridoxine hydrochloride	0.5 mg	0.1 mg	—
Sucrose	10,000 mg	10,000 mg	10,000 mg
Extract Yeast Dried (Nacalai Tesque)	—	—	3,000 mg
Phytigel (Sigma-Aldrich)	5,000 mg	—	—
Gellan gum (Sigma-Aldrich)	—	2,000 mg	—
Agar Powder (Nacalai Tesque)	—	—	15,000 mg
Fill up to 1,000 mL H ₂ O	1,000 mL	1,000 mL	1,000 mL

^{*1} pH 5.7 に調整後、121 °C で 20 分間オートクレーブ滅菌し、シャーレに固めた。

^{*2} 121 °C で 20 分間オートクレーブ後、シャーレに固めて使用した。

^{*3} 寒天培地にして使用する際は Agar Powder を加えて 121 °C で 20 分間オートクレーブ滅菌後、シャーレに固めた。

^{*4} 液体培地として使用する際は Agar Powder を除いて 121 °C で 20 分間オートクレーブ滅菌して使用した。

表 9. qPCR master mix の組成

qPCR master mix	
10x diluted cDNA	1.0 μ L
THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix (Toyobo)	5.0 μ L
5 μ M Forward primer	1.0 μ L
5 μ M Reverse primer	1.0 μ L
Fill up to 10 μ L with sterilized H ₂ O	10 μ L

表 10. 発色液の組成

Material	Volume
2.5 M Sulfuric acid	6.0 mL
4% Ammonium molybdate solution	1.8 mL
0.27% Antimony potassium tartrate solution	0.6 mL
Ascorbate	0.063 g
Fill up to 50 mL H ₂ O	50 mL

表 11. PCR master mix の組成

PCR master mix	
Template DNA	1.0 μ L
2x PCR Buffer for KOD FX Neo (Toyobo)	5.0 μ L
5 μ M Foward primer	0.6 μ L
5 μ M Reverse primer	0.6 μ L
2mM dNTPs (Toyobo)	2.0 μ L
KOD FX Neo (Toyobo)	0.2 μ L
Fill up to 10 μ L with sterilized H ₂ O	10 μ L

表 12. 次世代シーケンシングの結果の概要

Summary of Next Generation sequencing results		
	Total No. of reads* ¹	2,501,100
Sequencing- results	Ave. No. of reads* ¹	57,894
	Ave. Q20* ^{1,2}	92.4%
	Ave. Q30* ^{1,2}	83.4%
Filtering-results	Total No. of combined reads* ¹	2,014,692
	Ave. No. of combined reads* ¹	46,065

*¹Total 及び Ave. は解析に供した全サンプルの合計値及び、各サンプルの平均値をそれぞれ示す。

*² Q20 及び Q30 は配列正確性 99.00%、99.90% 以上の割合をそれぞれ示す。

表 13. 単離された真菌の一覧

ID	Accession number	Best BLAST match	Similarity (%)	Note
P7	MT294412	<i>Cadophora orchidicola</i>	100	Endophyte
P9	KU556536	<i>Gibellulopsis</i> sp.	99	Pathogen / Saprotrophic
P17	MH666073	<i>Ceratobasidium</i> sp.	100	Orchid mycorrhiza / Pathogen
P18/20	GU934514	<i>Colletotrichum pisi</i>	99	Pathogen
P19	OU612361	<i>Paraphoma</i> sp.	99	Pathogen
P21	LM644509	<i>Ochroconis constricta</i>	99	Soil fungus

8. 参考文献

1. Frank A. B. (1885). On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A. B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza*. 15: 267–275.
2. Harley J. L. (1989). The significance of mycorrhiza. *Mycological Research* 92: 129–139.
3. Brundrett M. C. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil*. 320: 37–77.
4. Brundrett M. C., Tedersoo L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytol*. 220: 1108–1115.
5. Yang S. Y., Gronlund 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., Paszkowski U. (2012). Nonredundant regulation of rice arbuscular mycorrhizal symbiosis by two members of the *PHOSPHATE TRANSPORTER1* gene family. *Plant Cell*. 24: 4236–4251.
6. Cordier C., Pozo M. J., Barea J. M., Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. (1998). Cell Defense Responses Associated with Localized and Systemic Resistance to *Phytophthora parasitica* Induced in Tomato by an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 11 (10): 1017–1028.
7. Pozo M. J., Cordier C., Dumas-Gaudot E., Gianinazzi S., Barea J. M., Azcón-Aguilar C. (2002). Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *J. Exp. Bot*. 53: 525–534.
8. Liu J., Maldonado-Mendoza I., Lopez-Meyer M., Cheung F., Town C. D., Harrison M. J. (2007). Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J*. 50 (3): 529–544.
9. Lee J. (2011). The Distribution of Cytoplasm and Nuclei within the Extra-radical Mycelia in *Glomus intraradices*, a Species of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Mycobiology*. 39 (2): 79–84.
10. Quiroga G., Erice G., Aroca R., Chaumont F., Ruiz-Lozano J. M. (2017). Enhanced Drought Stress Tolerance by the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis in a Drought-Sensitive Maize Cultivar Is Related to a Broader and Differential Regulation of Host Plant Aquaporins than in a Drought-Tolerant Cultivar. *Front Plant Sci*. 19 (8): 1056. doi: 10.3389/fpls.2017.01056.
11. Bonfante P., Genre A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun*. 1: 48. doi: 10.1038/ncomms1046.

12. Li T., Hu Y. J., Hao Z. P., Li H., Wang Y. S., Chen B. D. (2013). First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol.* 197 (2): 617–630.
13. Recorbet G., Abdallah C., Renaut J., Wipf D., Dumas-Gaudot E. (2013). Protein actors sustaining arbuscular mycorrhizal symbiosis: underground artists break the silence. *New Phytol.* 199 (1): 26–40.
14. Cook C. E., Whichard L. P., Turner B., Wall M. E., Egley G. H. (1966). Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science.* 154 (3753): 1189–1190.
15. Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature.* 435 (7043): 824–827.
16. Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer P. B., Puech-Pagès V., Dun E. A., Pillot J. P., Letisse F., Matusova R., Danoun S., Portais J. C., Bouwmeester H., Bécard G., Beveridge C. A., Rameau C., Rochange S. F. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature.* 455 (7210): 180–194.
17. Umehara M., Hanada A., Yoshida S., Akiyama K., Arite T., Takeda-Kamiya N., Magome H., Kamiya Y., Shirasu K., Yoneyama K., Kyojuka J., Yamaguchi S. (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature.* 455 (7210): 195–200.
18. Tian B., Pei Y., Huang W., Ding J., Siemann E. (2021). Increasing flavonoid concentrations in root exudates enhance associations between arbuscular mycorrhizal fungi and an invasive plant. *ISME J.* 15 (7): 1919–1930. doi: 10.1038/s41396-021-00894-1.
19. Maillet F., Poinot V., André O., Puech-Pagès V., Haouy A., Gueunier M., Cromer L., Giraudet D., Formey D., Niebel A., Martinez E. A., Driguez H., Bécard G., Dénarié J. (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature.* 469 (7328): 58–63.
20. Sun J., Miller J. B., Granqvist E., Wiley-Kalil A., Gobbato E., Maillet F., Cottaz S., Samain E., Venkateshwaran M., Fort S., Morris R. J., Ané J-M., Dénarié J., Oldroyd G. E. (2015). Activation of symbiosis signaling by arbuscular mycorrhizal fungi in legumes and rice. *The Plant Cell.* 27 (3): 823–838.
21. Genre A., Chabaud M., Balzergue C., Puech-Pagès V., Novero M., Rey T., Fournier J., Rochange S., Bécard G., Bonfante P., Barker D. G. (2013). Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytol.* 198 (1): 190–202.
22. Nadal M., Paszkowski U. (2013). Polyphony in the rhizosphere: presymbiotic communication in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16 (4): 473–479.

23. Miyata K., Kozaki T., Kouzai Y., Ozawa K., Ishii K., Asamizu E., Okabe Y., Umehara Y., Miyamoto A., Kobae Y., Akiyama K., Kaku H., Nishizawa Y., Shibuya N., Nkagawa T. (2014). The Bifunctional Plant Receptor, OSCERK1, Regulates Both Chitin-Triggered Immunity and Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis in Rice. *Plant Cell Physiol.* 55 (11): 1864–1872.
24. Genre A., Russo G. (2016). Does a Common Pathway Transduce Symbiotic Signals in Plant-Microbe Interactions? *Front. Plant Sci.* 7: 96. doi: 10.3389/fpls.2016.00096.
25. Wang W., Shi J., Xie Q., Jiag Y., Yu N., and Wang E. (2017). Nutrient Exchange and Regulation in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Mol. Plant.* 10: 1147–1158.
26. Bago B., Azcón-Aguilar C., Goulet A., Piché Y. (1998). Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 139: 375–388.
27. Dickson S., Smith F. A., Smith S. E. (2007). Structural differences in arbuscular mycorrhizal symbioses: more than 100 years after Gallaud, where next?. *Mycorrhiza.* 17 (5): 375–393.
28. Tominaga T., Miura C., Takeda N., Kanno Y., Takemura Y., Seo M., Yamato M., Kaminaka H. (2020). Gibberellin promotes fungal entry and colonization during Paris-type arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Eustoma grandiflorum*. *Plant Cell Physiol.* 61 (3): 565–575.
29. Simon L., Bousquet J., Lévesque C., Lalonde M. (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature.* 363: 67–69.
30. Remy W., Taylor T. N., Hass H., Kerp H. (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (25): 11841–11843.
31. Redecker D., Kodner R., Graham L. E. (2000). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science.* 289 (5486): 1920–1921.
32. Radhakrishnan G. V., Keller J., Rich M. K., Vernié T., Mbadanga D. L., Vigneron N., Cottret L., Clemente H. S., Libourel C., Cheema J., Linde A-M., Eklund D. M., Cheng S., Wong G. K. S., Lagercrantz U., Li F-W., Oldroyd G. E. D., Delaux, P. M. (2020). An ancestral signalling pathway is conserved in intracellular symbioses-forming plant lineages. *Nature Plants.* 6 (3): 280–289.
33. Rich M. K., Vigneron N., Libourel C., Keller J., Xue L., Hajheidari M., Radhakrishnan G. V., Aurélie L. R., Diop S. I., Potente G., Conti E., Duijsings D., Batut A., Faouder P. L., Kodama K, Kyojuka J., Sallet E., Bécard G., Rodriguez-Franco M., Ott T., Bertrand-Michel J., Oldroyd G. E. D., Péter Szövényi, Marcel Bucher-Delaux, P. M. (2021). Lipid exchanges drove the evolution of mutualism during plant terrestrialization. *Science* 372 (6544): 864–868.
34. Hayakawa S., Uetake Y., Ogoshi A. (1999). Identification of Symbiotic Rhizoctonias from Naturally Occurring Protocorms and Roots of *Dactylorhiza aristata* (Orchidaceae). *J. Fac.*

- Agri. Hokkaido Univ.* 69 (2): 129-141.
35. Matsuda Y., Okochi S., Katayama T., Yamada A., Ito S. (2011). Mycorrhizal fungi associated with *Monotropastrum humile* (Ericaceae) in central Japan. *Mycorrhiza*. 21: 569–576. doi: 10.1007/s00572-011-0365-3
 36. Bago B., Zipfel W., Williams R. M., Jun J., Arreola R., Lammers P. J., Pfeffer P. E., Shachar-Hill Y. (2002). Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.* 128 (1): 108–124.
 37. 横山 潤, 堂園 いくみ, 種生物学会. (2008). 共進化の生態学—生物間相互作用が織りなす多様性. 文一総合出版, 東京.
 38. Hiruma K., Gerlach N., Sacristán S., Thomas-Nakano R., Hacquard S., Kracher B., Neumann U., Ramírez D., Bucher M., O’Connell R. J., Schulze-Lefert P. (2016). Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. *Cell*. 165: 464–474.
 39. Delaux P. M., Varala K., Edger P. P., Coruzzi G. M., Pires J. C., Ane J. M. (2014). Comparative Phylogenomics Uncovers the Impact of Symbiotic Associations on Host Genome Evolution. *PLOS Genet.* 10 (7): e1004487.
 40. Bravo A., York T., Pumplin N., Mueller L. A., Harrison M. J. (2016). Genes conserved for arbuscular mycorrhizal symbiosis identified through phylogenomics. *Nature plants*. 2: 15208. doi: 10.1038/nplants.2015.208.
 41. Veiga R. S., Faccio A., Genre A., Pieterse C. M., Bonfante P., van der Heijden M. G. (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi reduce growth and infect roots of the non-host plant *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 36 (11): 1926–1937. doi: 10.1111/pce.12102.
 42. Cosme M., Fernández I., Van der Heijden M. G. A., Pieterse C. M. J. (2018). Non-Mycorrhizal Plants: The Exceptions that Prove the Rule. *Trends Plant Sci.* 23 (7): 577-587. doi: 10.1016/j.tplants.2018.04.004.
 43. Fernández I., Cosme M., Stringlis I. A., Yu K., de Jonge R., van Wees S. M., Pozo M. J., Pieterse C. M. J., van der Heijden M. G. A. (2019). Molecular dialogue between arbuscular mycorrhizal fungi and the nonhost plant *Arabidopsis thaliana* switches from initial detection to antagonism. *New Phytol.* 223 (2): 867–881. doi: 10.1111/nph.15798.
 44. Wu B., Hogetsu T., Isobe K., Ishii R. (2007). Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in a primary successional volcanic desert on the southeast slope of Mount Fuji. *Mycorrhiza*. 17: 495–506.
 45. Yoshida S., Wakatake T., Shirasu K. (2014). A molecular view of survival strategies of root parasitic plants. *Regulation of Plant Growth & Development*. 49 (1): 66–73.
 46. Twyford A. D. (2018). Parasitic Plants. *Curr. Biol.* 28 (16): 857–859.
 47. Westwood J. H., Yoder J. I., Timko M. P., dePamphilis C. W. (2010). The evolution of

- parasitism in plants. *Trends Plant Sci.* 15 (4): 227–235.
48. 若竹崇雅, 吉田聡子, 白須賢. (2016). 根寄生植物の寄生メカニズム—ゲノム解読とモデル実験系の確立で農業被害の撲滅に道. *生物の科学 遺伝.* 70 (4): 289–293.
 49. Chang M., Lynn D. G. (1986). The haustorium and the chemistry of host recognition in parasitic angiosperms. *J. Chem. Ecol.* 12 (2): 561–579.
 50. Cui S., Wada S., Tobimatsu Y., Takeda Y., Saucet S. B., Takano T., Umezawa T., Shirasu K., Yoshida S. (2018). Host lignin composition affects haustorium induction in the parasitic plants *Phtheirospermum japonicum* and *Striga hermonthica*. *New Phytol.* 218 (2): 710–723.
 51. Ishida J. K., Wakatake T., Yoshida S., Takebayashi Y., Kasahara H., Wafula E., dePamphilis C. W., Namba S., Shirasu K. (2016). Local Auxin Biosynthesis Mediated by a YUCCA Flavin Monooxygenase Regulates Haustorium Development in the Parasitic Plant *Phtheirospermum japonicum*. *Plant Cell.* 28 (8): 1795–1814.
 52. Yoshida S., Cui S., Ichihashi Y., Shirasu K. (2016). The Haustorium, a Specialize Invasive Organ in Parasitic Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67: 643–667.
 53. 加賀悠樹, 柴田航希, 鳴川秀樹, 横山隆亮, 西谷和彦. (2016). 茎寄生植物ネナシカズラの寄生戦略—茎寄生研究用のモデル植物を目指す. *生物の科学 遺伝.* 70 (4): 284–288.
 54. Aly R., Hamamouch N., Abu-Nassar J., Wolf S., Joel D. M., Eizenberg H., Kaisler E., Cramer C., Gal-On A., Westwood J. H. (2011). Movement of protein and macromolecules between host plants and the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca* Pers. *Plant Cell Rep.* 30 (12): 2233–2241.
 55. Kim G., Westwood J. H. (2015). Macromolecule exchange in *Cuscuta*-host plant interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 26: 20–25.
 56. Jiang L., Qu F., Li Z., Doohan D. (2013). Inter-species protein trafficking endows dodder (*Cuscuta pentagona*) with a host-specific herbicide-tolerant trait. *New Phytol.* 198: 1017–1022.
 57. Kim G., LeBlanc M. L., Wafula E. K., dePamphilis C. W., Westwood J. H. (2014). Plant science. Genomic-scale exchange of mRNA between a parasitic plant and its hosts. *Science.* 345: 808–811.
 58. Shahid S., Kim G., Johnson N. R., Wafula E., Wang F., Coruh C., Bernal-Galeano V., Phifer T., dePamphilis C. W., Westwood J. H., Axtell M. J. (2018). MicroRNAs from the parasitic plant *Cuscuta campestris* target host messenger RNAs. *Nature.* 553: 82–85.
 59. Spallek T., Melnyk C. W., Wakatake T., Zhang J., Sakamoto Y., Kibaa T., Yoshida S., Matsunaga S., Sakakibara H., Shirasu K. (2017). Interspecies hormonal control of host root morphology by parasitic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (20): 5283–5288.
 60. Bennett J. R., Mathews S. (2006). Phylogeny of the parasitic plant family Orobanchaceae

- inferred from phytochrome A. *Am. J. Bot.* 93 (7): 1039–1051.
61. McNeal J. R., Bennett J. R., Wolfe A. D., Mathews S. (2013). Phylogeny and origins of holoparasitism in Orobanchaceae. *Am. J. Bot.* 100 (5): 971–983.
 62. Wicke S., Muller K. F., deFamphilis C. W., Quandt D., Wickett N. J., Zhang Y., Renner S. S., Schneeweiss G. M. (2013). Mechanisms of Functional and Physical Genome Reduction in Photosynthetic and Nonphotosynthetic Parasitic Plants of the Broomrape Family. *Plant Cell*. 25: 3711–3725.
 63. Yoshida S., Maruyama S., Nozaki H., Shirasu K. (2010). Horizontal gene transfer by the parasitic plant *Striga hermonthica*. *Science*. 328 (5982): 1128.
 64. Zhang Y., Fernandez-Aparicio M., Wafula E. K., Das M., Jiao Y., Wickett N. J., Honaas L. A., Ralph P. E., Wojciechowski M. F., Timko M. P., Yoder J. I., Westwood J. H., Depamphilis C. W. (2013). Evolution of a horizontally acquired legume gene, albumin 1, in the parasitic plant *Phelipanche aegyptiaca* and related species. *BMC Evol. Biol.* 13: 48.
 65. Zhang D., Qi J., Yue J., Huang J., Sun T., Li S., Wen J. F., Hettenhausen C., Wu J., Wang L., Zhuang H., Wu J., Sun G. (2014). Root parasitic plant *Orobanche aegyptiaca* and shoot parasitic plant *Cuscuta australis* obtained Brassicaceae-specific *strictosidine synthase-like* genes by horizontal gene transfer. *BMC Plant Biol.* 14: 19.
 66. Conn C. E., Bythell-Douglas R., Neumann D., Yoshida S., Whittington B., Westwood J. H., Shirasu K., Bond C. S., Dyer K. A., Nelson D. C. (2015). Convergent evolution of strigolactone perception enabled host detection in parasitic plants. *Science*. 349 (6247): 540–543.
 67. Tkach N., Ree R. H., Kuss P., Roser M., Hoffmann M. H. (2014). High mountain origin, phylogenetics, evolution, and niche conservatism of arctic lineage in the hemiparasitic genus *Pedicularis* (Orobanchaceae). *Mol. Phylogenet Evol.* 76: 75–92.
 68. 門田 裕一. (2013). 山溪ハンディ図鑑2 増補改訂新版 山に咲く花. 山と溪谷社, 東京.
 69. 清水 建美. (2014). 山溪ハンディ図鑑8 増補改訂新版 高山に咲く花. 山と溪谷社, 東京.
 70. Li A. R., Li Y. J., Smith S. E., Smith F. A., Guan K. Y. (2013). Nutrient requirements differ in two *Pedicularis* species in the absence of a host plant: implication for driving forces in the evolution of host preference of root hemiparasitic plants. *Ann. Bot.* 112 (6): 1099–1106.
 71. Li A. R., Guan K. Y. (2007). Mycorrhizal and dark septate endophytic fungi of *Pedicularis* species from northwest of Yunnan Province, China. *Mycorrhiza*. 17: 103–109.
 72. Li A. R., Guan K. Y. (2008). Arbuscular mycorrhizal fungi may serve as another nutrient strategy for some hemiparasitic species of *Pedicularis* (Orobanchaceae). *Mycorrhiza*. 18: 429–436.

73. 川井 友裕. (2019). シオガマギク属根寄生植物とアーバスキュラー菌根菌の相互作用の解析. 東京大学大学院総合文化研究科, 修士論文.
74. Kangwankraiphaisan T., Suntornvongsagul K., Sihanonth P., Klysubun W., Gadd G. M. (2013). Influence of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on zinc biogeochemistry in the rhizosphere of *Lindenbergia philippensis* growing in zinc-contaminated sediment. *Biometals*. 26 (3): 489–505. doi: 10.1007/s10534-013-9634-2.
75. Li A. R., Guan K. Y., Stonor R., Smith S. E., Smith F.A. (2013). Direct and indirect influences of arbuscular mycorrhizal fungi on phosphorus uptake by two root hemiparasitic *Pedicularis* species: do the fungal partners matter at low colonization levels? *Ann. Bot.* 112 (6): 1089–1098.
76. Toju H., Tanabe A. S., Ishii H. S. (2016). Ericaceous plant-fungus network in a harsh alpine subalpine environment. *Mol. Ecol.* 25 (13): 3242–3257.
77. Magoc T., Salzberg S. L. (2011). FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*. 27 (21): 2957–2963.
78. Bolyen E., Rideout J. R., Dillon M. R., Bokulich N. A., Abnet C. C., Al-Ghalith G. A., Alexander H., Alm E. J., Arumugam M., Asnicar F., Bai Y., Bisanz J. E., Bittinger K., Brejnrod A., Brislawn C. J., Brown C. T., Callahan B. J., Caraballo-Rodríguez A. M., Chase J., Cope E. K., Da Silva R., Diener C., Dorrestein P. C., Douglas G. M., Durall D. M., Duvallet C., Edwardson C. F., Ernst M., Estaki M., Fouquier J., Gauglitz J. M., Gibbons S. M., Gibson D. L., Gonzalez A., Gorlick K., Guo J., Hillmann B., Holmes S., Holste H., Huttenhower C., Huttley G. A., Janssen S., Jarmusch A. K., Jiang L., Kaehler B. D., Kang K. B., Keefe C. R., Keim P., Kelley S. T., Knights D., Koester I., Kosciulek T., Kreps J., Langille M. G. I., Lee J., Ley R., Liu Y. X., Loftfield E., Lozupone C., Maher M., Marotz C., Martin B. D., McDonald D., McIver L. J., Melnik A. V., Metcalf J. L., Morgan S. C., Morton J. T., Naimey A. T., Navas-Molina J. A., Nothias L. F., Orchanian S. B., Pearson T., Peoples S. L., Petras D., Preuss M. L., Pruesse E., Rasmussen L. B., Rivers A., Robeson M. S. 2nd, Rosenthal P., Segata N., Shaffer M., Shiffer A., Sinha R., Song S. J., Spear J. R., Swafford A. D., Thompson L. R., Torres P. J., Trinh P., Tripathi A., Turnbaugh P. J., Ul-Hasan S., van der Hooft J. J. J., Vargas F., Vázquez-Baeza Y., Vogtmann E., von Hippel M., Walters W., Wan Y., Wang M., Warren J., Weber K. C., Williamson C. H. D., Willis A. D., Xu Z. Z., Zaneveld J. R., Zhang Y., Zhu Q., Knight R., Caporaso J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37 (8): 852–857.
79. Kõljalg U., Nilsson H. R., Schigel D., Tedersoo L., Larsson K-H., May T. W., Taylor A. F. S., Jeppesen T. S., Frøslev T. G., Lindahl B. D., Põldmaa K., Saar I., Suija A., Savchenko A., Yatsiuk I., Adojaan K., Ivanov F., Piirmann T., Põhönen R., Zirk A., Abarenkov K. (2020).

- The Taxon Hypothesis Paradigm—On the Unambiguous Detection and Communication of Taxa. *Microorganisms*. 8 (12): 1910.
80. Nguyen N. H., Song Z., Bates S. T., Branco S., Tedersoo L., Menke J., Schilling J. S., Kennedy P. G. (2016). FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecol.* 20: 241–248.
 81. Phillips J. M., Hayman D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55 (1): 158–161.
 82. Bécard G., Fortin J. A. (1988). Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211–218.
 83. Tsuzuki S., Handa Y., Takeda N., Kawaguchi M. (2016). Strigolactone-Induced Putative Secreted Protein 1 Is Required for the Establishment of Symbiosis by the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Rhizophagus irregularis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 29 (4): 277–286. doi: 10.1094/MPMI-10-15-0234-R.
 84. 土壤環境分析法編集委員会. (1997). 土壤環境分析法. 博友社, 東京.
 85. Marx D. H. (1969). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of Pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology.* 59: 153–163.
 86. Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111–120.
 87. Hall A. T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 41: 95–98.
 88. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 33: 1870–1874.
 89. Berthelot C., Leyval C., Chalot M., Blaudez C. (2019). Interactions between dark septate endophytes, ectomycorrhizal fungi and root pathogens *in vitro*. *FEMS Microbiol. Lett.* 366 (13): 158. doi: 10.1093/femsle/fnz158.
 90. Zijlstra J. D., Van't Hof P., Baar J., Verkley G. J., Summerbell R. C., Paradi I., Berendse F. (2014). Diversity of symbiotic root endophytes of the *Helotiales* in ericaceous plants and the grass, *Deschampsia flexuosa*. *Stud. Mycol.* 79 (1): 121–186. doi: 10.3114/sim.53.1.147.
 91. Crous P. W., Quaedvlieg W., Hansen K., Hawksworth D. L., Groenewald J. Z. (2014). *Phacidium* and *Ceuthospora* (Phacidiaceae) are congeneric: taxonomic and nomenclatural implications. *IMA Fungus.* 5 (2): 173–193. doi: 10.5598/ima fungus.2014.05.02.02.
 92. Doğmuş-Lehtijärvi H. T., Lehtijärvi A., Woodward S., Oskay F. (2016). Impacts of inoculation with *Herpotrichia pinetorum*, *Gremmenia infestans* and *Gremmeniella abietina* on *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* and *Cedrus libani* seedlings in the field. *For. Pathol.* 46

- (1): 47–53.
93. Cannon P. F., Kirk P. M. (2007). *Fungal Families of the World*. CAB International, Cambridge.
 94. Kobae Y., Kameoka H., Sugimura Y., Saito K., Ohtomo R., Fujiwara T., Kyojuka J. (2018). Strigolactone Biosynthesis Genes of Rice are Required for the Punctual Entry of Arbuscular Mycorrhizal Fungi into the Roots. *Plant Cell Physiol.* 59 (3): 544–553. doi: 10.1093/pcp/pcy001.
 95. 川口 正代司. (2006). ミヤコグサで解き明かす菌根・根粒共生系の分子基盤 特集にあたって. 蛋白質 核酸 酵素. 51 (9): 1015–1021.
 96. Gutjahr C., Banba M., Croset V., An K., Miyao A., An G., Hirochika H., Imaizumi-Anraku H., Paszkowski U. (2008). Arbuscular mycorrhiza-specific signaling in rice transcends the common symbiosis signaling pathway. *Plant Cell.* 20 (11): 2989–3005. doi: 10.1105/tpc.108.062414.
 97. López-Ráez J. A., Fernández I., García J. M., Berrio E., Bonfante P., Walter M. H., Pozo, M. J. (2015). Differential spatio-temporal expression of carotenoid cleavage dioxygenases regulates apocarotenoid fluxes during AM symbiosis. *Plant Sci.* 230: 59–69.
 98. Tupac O. J., Ackerman J. D., Bayman P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *Am. J. Bot.* 89 (11): 1852–1858. doi: 10.3732/ajb.89.11.1852.
 99. Irwin M. J., Dearnaley J. D. W. (2007). *Pterostylis nutans* (Orchidaceae) has a specific association with two *Ceratobasidium* root-associated fungi across its range in eastern Australia. *Mycoscience.* 48 (4): 231–239. doi.org/10.1007/S10267-007-0360-X.
 100. Rachel M., John D. (2012). The rare Australian epiphytic orchid *Sarcochilus weinthalii* associates with a single species of *Ceratobasidium*. *Fungal Divers.* 54: 31–37.
 101. Wilhelm S., Nelson P. E., Thomas H. E., Johnson H. (1972). Pathology of strawberry root rot caused by *Ceratobasidium* species. *Phytopathology.* 62 (6): 700–705.
 102. Rabago-Zavala K., Valenzuela-Escoboza F. A., Mora-Romero G. A., Lizárraga-Sánchez G. J., Tovar-Pedraza J. M. (2022). First Report of *Ceratobasidium* sp.(AG-A and AG-G) Causing Root Rot and Stem Canker of Common Bean in Mexico. *Plant Disease.* doi: 10.1094/PDIS-06-22-1317-PDN.
 103. Currah R. S., Sigler L., Hambleton S. (1987). New records and new taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. *Can. J. Bot.* 65 (12): 2473–2482. doi: 10.1139/b87-336.
 104. Wang L., Shen J., Xu L., Gao J., Zhang C., Wang Y., Chen F. (2019). A metabolite of endophytic fungus *Cadophora orchidicola* from *Kalimeris indica* serves as a potential fungicide and TLR 4 agonist. *J. Appl. Microbiol.* 126 (5): 1383–1390.

105. Pakshir K., Rahimi Ghiasi, M., Zomorodian K., Gharavi A. R. (2013). Isolation and molecular identification of keratinophilic fungi from public parks soil in Shiraz, Iran. *BioMed research international*. 2013.
106. Zhou Y., Zhao Z. Q., Guo Q. Y., Lei B. (2017). First report of wilt of sugar beet caused by *Gibellulopsis nigrescens* in the Xinjiang region of China. *Plant Disease*. 101 (7): 1318.
107. Tomm G. O. (2001). Control of foliar diseases of field pea in Southern Brazil. LTA, 2001.
108. Cao S., Liang Q. W., Nzabanita C., Li Y. Z. (2020). Paraphoma root rot of alfalfa (*Medicago sativa*) in Inner Mongolia, China. *Plant Pathol*. 69 (2): 231–239.
109. Metwally R. A., Al-Amri S. M. (2020) Individual and interactive role of *Trichoderma viride* and arbuscular mycorrhizal fungi on growth and pigment content of onion plants. *Lett Appl Microbiol*. 70 (2): 79–86. doi: 10.1111/lam.13246.
110. Fracchia S., Garcia-Romera I., Godeas A., Ocampo J. A. (2000). Effect of the saprophytic fungus *Fusarium oxysporum* on arbuscular mycorrhizal colonization and growth of plants in greenhouse and field trials. *Plant and Soil*. 223 (1): 177–186.
111. Sato T., Ezawa T., Cheng W., Tawaraya K. (2015). Release of acid phosphatase from extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. *Soil Science and Plant Nutrition*. 61(2): 269–274.
112. Ahonen-Jonnarth U., Patrick A. W. V. H., Lundström U., Finlay R. (2000). Organic acids produced by mycorrhizal *Pinus sylvestris* exposed to elevated aluminium and heavy metal concentrations. *New Phytol*. 146 (3): 557–567. doi:10.1046/j.1469-8137.2000.00653.x
113. Ezawa T., Saito K. (2018). How do arbuscular mycorrhizal fungi handle phosphate? New insight into fine-tuning of phosphate metabolism. *New phytol*. 220 (4): 1116–1121.
114. Kameoka H., Tsutsui I., Saito K., Kikuchi Y., Handa Y., Ezawa T., Hayashi H., Kawaguchi M., Akiyama, K. (2019). Stimulation of asymbiotic sporulation in arbuscular mycorrhizal fungi by fatty acids. *Nature Microbiol*. 4 (10): 1654–1660. doi: 10.1038/s41564-019-0485-7.
115. Sugiura Y., Akiyama R., Tanaka S., Yano K., Kameoka H., Marui S., Saito M., Kawaguchi M., Akiyama K., Saito K. (2020). Myristate can be used as a carbon and energy source for the asymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 117 (41): 25779–25788.
116. Zhou X., Li J., Tang N., Xie H., Fan X., Chen H., Tang M., Xie X. (2021). Genome-wide analysis of nutrient signaling pathways conserved in arbuscular mycorrhizal fungi. *Microorganisms*. 9 (8): 1557. doi.org/10.3390/microorganisms9081557.
117. Müller A., Ngwene B., Peiter E., George E. (2017). Quantity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungal storage organs within dead roots. *Mycorrhiza*. 27 (3): 201–

210. doi: 10.1007/s00572-016-0741-0.
118. Sharma V., Bhattacharyya S., Kumar R., Kumar A., Ibañez F., Wang J., Guo B., Sudini H. K., Gopalakrishnan S., DasGupta M., Varshney R. K., Pandey M. K. (2020). Molecular Basis of Root Nodule Symbiosis between *Bradyrhizobium* and 'Crack-Entry' Legume Groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plants (Basel)*. 9 (2): 276. doi: 10.3390/plants9020276.
119. Sprent J. I. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol.* 174 (1): 11–25. doi: 10.1111/j.1469–8137.2007.02015.x.
120. Wang E., Schornack S., Marsh J. F., Gobbato E., Schwessinger B., Eastmond P., Schultze M., Kamoun S., Oldroyd G. E. (2012). A common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. *Curr. Biol.* 22 (23): 2242–2246. doi: 10.1016/j.cub.2012.09.043.
121. Kochian L. V., Hoekenga O. A., Pineros M. A. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55 (1): 459–493.
122. Schechter S. P., Bruns T. D. (2008). Serpentine and non-serpentine ecotypes of *Collinsia sparsiflora* associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal assemblages. *Mol. Ecol.* 17: 3198–3210.
123. Lagrange A., Ducousso M., Jourand P., Majorel C., Amir H. (2011). New insights into the mycorrhizal status of Cyperaceae from ultramafic soils in New Caledonia. *Canadian J. Microbiol.* 57 (1): 21–28.
124. Van-Aarle I. M., Söderström B., Olsson P. A. (2003). Growth and interactions of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from limestone and acid rock habitats. *Soil Biol. Biochem.* 35 (12): 1557–1564. doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00248-7.
125. Nakatsubo T. (1999). Mycorrhizal symbiosis in polar and alpine ecosystems. *Japanese Journal of Ecology.* 49: 151–157.
126. Garcia K., Delaux P. M., Cope K. R., Ané J. M. (2015). Molecular signals required for the establishment and maintenance of ectomycorrhizal symbioses. *New Phytol.* 208 (1): 79–87. doi: 10.1111/nph.13423.
127. Gobbato E., Wang E., Higgins G., Bano S. A., Henry C., Schultze M., Oldroyd G. E. (2013). *RAM1* and *RAM2* function and expression during arbuscular mycorrhizal symbiosis and *Aphanomyces euteiches* colonization. *Plant Signal Behav.* 8 (10): e26049. doi: 10.4161/psb.26049.
128. Kotlínek M., Hiiesalu I., Košnar J., Šmilauerová M., Šmilauer P., Altman J., Dvorský M., Kopecký M., Doležal J. (2017). Fungal root symbionts of high-altitude vascular plants in the Himalayas. *Sci Rep.* 7 (1): 6562. doi: 10.1038/s41598-017-06938-x.

129. Davison J., Moora M., Öpik M., Adholeya A., Ainsaar L., Bâ 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., Zobel M. (2015). FUNGAL SYMBIONTS. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science*. 349 (6251): 970–973.
130. Toju H., Tanabe A. S., Yamamoto S., Sato H. (2012). High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PLoS One*. 7 (7): e40863. doi: 10.1371/journal.pone.0040863.
131. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *PCR Protocols*, Academic Press, U. S. A.
132. Yakti W., Kovács G. M., Franken P. (2019). Differential interaction of the dark septate endophyte *Cadophora* sp. and fungal pathogens *in vitro* and *in planta*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95 (12): fiz164.
133. Arakawa M., Inagaki K. (2014). Molecular markers for genotyping anastomosis groups and understanding the population biology of *Rhizoctonia* species. *J. Gen. Plant Pathol.* 80 (5): 401–407.

9. 謝辞

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科の吉田聡子教授のご指導のもとに行われました。挑戦的なテーマであったにも関わらず、自由に研究をさせていただき、快適な研究環境もご提供いただきました。厚く御礼申し上げます。また、アドバイザーとして有益なご助言をくださいました、中島敬二教授並びに西條雄介教授に深く感謝いたします。さらに、研究に関して多数のご助言をくださり、各種解析機器の使用方法も丁寧にご指導いただきました、植物共生学研究室の Songkui Cui 助教、大津美奈助教、稲葉尚子特任助教に感謝申し上げます。植物共生学研究室の皆さまにもセミナーなどで研究計画や解析手法に関して非常に多くのご助言をいただきました。特に、同期の Kee Yee Jia さんにはゲノム解析データや植物の栽培方法などを共有して頂き大変お世話になりました。深く感謝いたします。

本研究は、修士課程における研究の継続として行いました。修士課程の研究において、ご指導をいただきました東京大学・大学院総合文化研究科の伊藤元己教授に感謝申し上げます。また、修士課程において研究計画や解析方法に関する多数のご助言をくださいました東京大学・大学院総合文化研究科の植物進化多様性情報学研究室の皆さまにも感謝いたします。

植物の種子や試料をご提供いただきました、中国科学院・昆明植物研究所の Ai Rong Li 博士並びに、農業・食品産業技術総合研究機構の今泉温子博士、基礎生物学研究所の川口正代司教授、岡山大学・農学部の豊田和弘教授に感謝申し上げます。また、実験や分析の方法をご教示くださいました、大阪公立大学附属植物園の石川直子博士、京都大学・生態学研究センターの福島慶太郎博士、大阪公立大学・大学院理学研究科の西野貴子助教並びに、真鍋遼さん、愛媛大学・農学部の米山香織特任准教授、鳥取大学・大学院農学研究科の富永貴哉さん、奈良先端科学技術大学院大学・植物免疫学

研究室の藤雅子さん、植物二次代謝研究室の阿部友美さんに感謝申し上げます。植物の野外調査や採取にご協力いただきました、礼文町高山植物培養センターの村山誠治博士、熊本大学・大学院先端科学研究部の藤井紀行准教授、瀬井純雄さん、理化学研究所・環境資源科学研究センターの田中勇輝さんに感謝申し上げます。最後に、高山植物の採取許可をくださいました、環境省並びに、林野庁、文化庁、出羽三山神社、白山比咩神社、東京電力ホールディングス株式会社と各機関の担当者の皆さまに御礼申し上げます。

2023 年 3 月 17 日

川井 友裕