

アーバスキュラー菌根菌の遺伝的異質性

小八重善裕

キーワード アーバスキュラー菌根菌, 異核共存体 (ヘテロカリオン), 遺伝メカニズム, ゲノム構造, ヌクレオタイプ

1. はじめに

アブラナ科やヒユ科, タデ科などの作物を除き, 圃場の作物の根にはアーバスキュラー菌根菌 (AM 菌) が共生している。植物は根だけでなく, そこから土壤に伸びた AM 菌の菌糸を使って養分を吸収する。リン酸など, 土壤中の移動度が小さく欠乏しやすい養分を得るには, 根と AM 菌をあわせた「菌根」を使って吸収した方が効率は良く, 植物は多くの場合, 菌根を作ることによってその栄養と生長を改善することができる (Smith and Read, 2008)。

前作に AM 菌の宿主となる作物を栽培することで, 非宿主の作物を栽培したときに比べて, 後作の収量増 (Arihara and Karasawa, 2000; Karasawa, 2004) やリン酸肥料の減肥 (Oka *et al.*, 2010; 八木ら, 2014; 大友ら, 2015) が期待できる。これは宿主植物との共生により土壤中の AM 菌の感染源が増加し, 菌根の形成が促されたためだと考えられる。土壤中の AM 菌は一種ではなく, 根の中にも複数種の AM 菌が感染しているのが普通であるが (van Tuinen *et al.*, 1998), どの AM 菌がその作物に適しているのか, あるいは適していないのかを知ることは今のところ困難である (Plenchette *et al.*, 2005; Verbruggen and Kiers, 2010)。これは, AM 菌の分類と, その機能性の評価が非常に難しいことに起因する (Sanders, 2004; Johnson *et al.*, 2012)。以前, 筆者は同誌上において, 圃場における AM 菌の機能について論じた (小八重, 2017)。ここでは, 主に菌根機能を調べる方法, いわば“機能の見える化”について, それまでの知見をまとめたのであるが, 圃場の AM 菌の分類, つまり, 感染している AM 菌の種類を同定する方法については, ほとんど触れなかった。実は, これまでの AM 菌の分類では, その形態や DNA 情報の大まかな類似性に基づく種レベルでの線引きまでが限界であり, それ以上の細分化は困難である (Krüger *et al.*,

2012; Lindahl *et al.*, 2013; van der Heijden *et al.*, 2015; Sanders and Rodriguez, 2016)。にもかかわらず, AM 菌の機能性はその種内, さらには系統間における差異が極めて大きいことが次第に明らかとなっている (Munkvold *et al.*, 2004; Angelard *et al.*, 2010; Boon *et al.*, 2015; Mensah *et al.*, 2015)。そのような機能的差異を生じる要因として, 近年もっとも注目されているのが, AM 菌のゲノムが持つ遺伝的異質性 (genetic heterogeneity) である (Sanders and Rodriguez, 2016)。

本稿は, AM 菌の分類について論じるものではない。菌根の機能性を正しく理解するうえで重要な, AM 菌の複雑で, 特殊なゲノム構造や遺伝メカニズムについて, これまでの知見を解説することを目的とする。本稿の内容は, 植物研究者にはなじみの薄い“菌”の話題が中心となってしまうが, 菌根とは, 言うまでもなく, “植物”と“菌”の複合体である。菌根を理解するためには, やはり菌側の理解が欠かせない。

2. AM 菌の形態と分類

AM 菌のゲノム構造や遺伝メカニズムに話を進める前に, その菌糸体の形態的特徴についても少し触れておく必要がある。なぜなら, 多くの植物研究者が慣れ親しんでいるように, 一つの個体が一つのゲノム, あるいは一つの細胞が一つの核を持つという常識が, AM 菌をはじめ, 特に早期分岐系統の真菌類の多くには当てはまらないからである。そして, その形態的特徴が, そのゲノムや遺伝メカニズムと密接な関係にあると考えられる。

AM 菌の菌糸や胞子には, 細胞と細胞を仕切る膜や壁 (隔壁) がない。そのため, その個体は, 連続した細胞質中に何千, 何万もの核が含まれる多核体 (ケノサイト, coenocyte) である (Pawlowska, 2005; Sanders and Croll, 2010)。それらの核は, 菌糸中を約 $0.1\mu\text{m}/\text{min}$ という, 他のオルガネラ (約 $5\mu\text{m}/\text{sec}$) よりはゆっくりしたスピードで, 規則性を伴わず, そして時に菌糸内を双方向 (対向) に移動しており (Uetake *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2004; Jany and Pawlowska, 2010), ここでは核の有糸分裂や, おそらくその寿命による崩壊が観察されている (Jany and Pawlowska, 2010; Sanders and Croll, 2010)。このように菌糸体が隔壁を有しない多核体の形態は, 真菌類の早期分岐系統の中でも, AM 菌やケカビ類など, よく

Yoshihiro KOBAE: Genetic heterogeneity of arbuscular mycorrhizal fungi

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター (062-8555 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘)

Corresponding Author: 小八重善裕 kobae@affrc.go.jp

2017年4月14日受付・2017年5月2日受理

日本土壌肥科学雑誌 第88巻 第5号 p. 478~487 (2017)

発達した菌糸体を形成する系統において顕著である (Lanfranco and Young, 2012; Spatafora *et al.*, 2016; Yamamoto *et al.*, 2017).

AM 菌はそのリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) 配列の系統発生解析から、グロムス菌門 (Glomeromycota) という独立した門に分類されてきた (Schübler *et al.*, 2001). しかし近年、核やミトコンドリアのゲノムスケールでの系統解析から、AM 菌をグロムス菌門ではなく、ケカビ門 (Mucoromycota) というより大きなグループの中へ位置付ける分類もなされている (Lanfranco and Young, 2012; Spatafora *et al.*, 2016; Corradi and Brachmann, 2016). それに加えて、これまで細い菌糸を持ち、培養ができない AM 菌 (fine endophytes) として知られていた *Glomus tenue* (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1981; Abbott, 1982) が、最近になりケカビ亜門 (Mucoromycotina) に分類できると報告された (Orchard *et al.*, 2016a). これまで、AM 菌はグロムス菌に属する単系統と考えられてきたが、実は多系統群である可能性が高い。

この *G. tenue* はいわゆるグロムス菌と同じく、樹枝状体によく似た構造を細胞内に作る (Thippayarugs *et al.*, 1999). その菌糸は細く (<1.5 μ m), 胞子も非常に小さい (直径<20 μ m) (Brundrett and Ashwath, 2013). 興味深いことに、この菌は過湿などのストレスに対して通常の AM 菌に比べて耐性があり、農業現場でも特定の環境において何らかの働きを担っている可能性がある (Orchard *et al.*, 2016b). これまで、グロムス菌のみが AM 菌として扱われてきたが、難培養性 (あるいは培養できない) のグロムス菌以外の系統による菌根が、その機能とともに見過ごされてきた可能性がある (Ohsowski *et al.*, 2014; Öpik *et al.*, 2014). 今後、AM 菌と呼ばれる菌種の属性は、さらに広がりを見せることが予想される (Truong *et al.*, 2017).

ここで、ケカビ類の形態や生殖の特徴についても記しておいた方がよいだろう。ただし、ここに記すのはあくまで、実験が豊富に行われてきたケカビ目 (*Mucorales*) の一部の種における知見であり、アツギケカビ目 (*Endogonales*), クサレケカビ目 (*Mortierellales*) ならびに Umberopsis 目など、ケカビ門の多くの系統については菌糸形態や生殖に関する知見が蓄積されていない点に注意すべきである。ケカビ類の菌糸体は多核であるが、そこに含まれる核はいずれも同質 (ホモカリオン) である (Schwartz *et al.*, 2014). 担子菌類や子嚢菌類、そして AM 菌などでは、栄養菌糸同士の融合 (anastomosis) を通して、異核が交じり合うことが知られているが (この点は後で詳しく述べる), ケカビ類では、遺伝的に異質の菌糸が融合するのは有性生殖時に限られている (Gregory, 1984). 有性生殖では、各親の菌糸上に形成された配偶子嚢 (gametangium) が接合し、接合胞子嚢 (sporangiogonium) の中に接合胞子 (zygospore) が一つ形成される。接合胞子の中には数千個の両株の単相 (haploid) 核が含まれているが、接

合胞子の発芽時まで、おそらく大部分の核が融合 (karyogamy) して複相 (diploid) 核になっている。その中で、たった一つの複相核が減数分裂に移行する。長い休眠期間 (2~6 カ月) を経て、接合胞子が発芽すると、胞子嚢柄を伸ばし、その先端に胞子嚢 (sporangium) を形成する。減数分裂により生じた 4 つの単相核は有糸分裂を繰り返し、胞子嚢には 3, 4 個の単相の核をそれぞれに含む数千個の胞子 (胞子嚢胞子, sporangiospore) が収納される (Alvarez and Eslava, 1983). ただし、胞子嚢胞子に含まれる複数の核は、単一核の有糸分裂に由来するホモカリオンである (Bergman *et al.*, 1969).

「AM 菌」を定義する明確な形態的特徴は、「樹枝状体を細胞内に作ること」である (Smith and Read, 2008). 形態に関する情報を伴わない遺伝情報から、その正確な属性や機能性を推定することは難しい (Öpik and Johnson, 2016; Hibbett *et al.*, 2016; Truong *et al.*, 2017). 根の中には複数の AM 菌が感染しているため、樹枝状体を含む細胞か、あるいは一菌糸に由来し、樹枝状体を形成している感染部位を切り出し、そこに含まれる遺伝情報を解析することが、「AM 菌」の正確な定義のために重要となるだろう。ある系統の AM 菌は従来の染色方法では検出にくいことが知られている (Stürmer, 2012). 植物側の共生分子マーカーを利用するなど、別の検出方法が必要となる。

3. AM 菌の遺伝的異質性に関する長い議論： ヘテロカリオンかホモカリオンか

生物の種分類によく用いられる rDNA 配列は、バクテリアから真核生物に至るまで、ゲノム上の特定領域に、数遺伝子から数百遺伝子のマルチリピートとして存在しており、リピート内の遺伝子配列はよく保存されていることが種分類の前提となっている (Campbell *et al.*, 1997; Gandolfi *et al.*, 2001; Eickbush and Eickbush, 2007). しかし、土壌から採取された AM 菌の一胞子から、著しく異なった rDNA 型が複数検出された (Sanders *et al.*, 1995; Lloyd-McGilp *et al.*, 1996; Clapp *et al.*, 1999; Pringle *et al.*, 2000). また、AM 菌 *Scutellospora pellucida* の単一胞子を植物に接種し増殖すると、そこには形も大きさも異なる様々な胞子が形成された (Bever and Morton, 1999). これらのことから、AM 菌は、その菌糸や一胞子の中に異なる核を持つ「異核共存体」であり、rDNA の多型はそれぞれ別々の異なる核に由来すると考えられた。これが AM 菌における「ヘテロカリオン説」である。しかしどんな説にも例外はつきものである。後述するように、ヘテロカリオン説に対して、そのまったく逆のホモカリオン説も生じてきた。すなわち、検出された一胞子内の多型は、同一染色体中で重複した異なった座位にある遺伝子 (パラログ) 間の多型に由来するもので、胞子内の核同士は同質であるという考えである。ここ 20 年ほど、この二つの仮説に基づく研究が精力的に進められ、両者

の意見は長い間平行線をたどってきた (Ropars and Corradi, 2015).

1) ヘテロカリオン説

一胞子に含まれる rDNA 配列が著しい多型を持つことに加えて、サンプルを希釈していき、PCR の反応液に一つの核が入る計算でそれらの rDNA 配列を調べると、それらサンプル間で著しい多型が検出された (Hijri *et al.*, 1999; Hosny *et al.*, 1999). すなわち胞子中には、遺伝的に異なる核が存在することが示唆された (Sanders, 1999, 2002). しかし、その一胞子からは担子菌類の rDNA 配列までもが検出されており (Hijri *et al.*, 1999; Hosny *et al.*, 1999), 後にこれが胞子に付着していたコンタミであることが発覚する (Redecker *et al.*, 1999; Schübler, 1999). こうした単一か単一でないかの議論では、コンタミは完全に排除されている必要があるため、一胞子の rDNA 解析の多くはその後、培養根で増殖された AM 菌の単一胞子系統 (single-spore culture) を用いた実験へとシフトしていく。そして rDNA 配列に限らず、ゲノム上にシングルコピーと考えられる遺伝子配列についても、単一胞子系統内にやはり多数の多型が見出された (Kuhn *et al.*, 2001; Pawlowska and Taylor, 2004; Hijri and Sanders, 2005; Boon *et al.*, 2010, 2015). それでも、それらが同一核内の染色体の倍数性や、遺伝子の重複に由来する可能性もある。しかし、当時詳しく調べられた *Rhizophagus irregularis* および *G. etunicatum* のゲノムは単相の核に由来するものであり、そのサイズは 15~38 Mbp と真核生物の中でもひととき小さいと推定された (Hijri and Sanders, 2004, 2005). 加えて、*G. etunicatum* の一胞子中からは、13 タイプの異なった配列の *POL1*-like sequence (*PLS1*) 遺伝子が検出されるにもかかわらず (Pawlowska and Taylor, 2004), 定量的 PCR からは一つの核中の遺伝子コピー数はわずかに 2 と見積もられたことから、*G. etunicatum* のゲノムは倍数化も遺伝子重複もしておらず、ヘテロカリオンであることが強く示唆された (Hijri and Sanders, 2005). さらに直接的な証拠としては、土壌から採集した胞子を用いて、rDNA *ITS2* 遺伝子に対する異なる DNA プローブを用いた FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 解析を行うと、異なる *ITS2* 配列を持つ核が同一胞子に含まれることが示された (Kuhn *et al.*, 2001).

さらに、これまでヘテロカリオン説を強く支持してきたのは、AM 菌に性がないこと、すなわち有性生殖が認められないという事実であった。AM 菌には核の融合、減数分裂などの有性生殖の存在を示す形態的な証拠が見つからない。形態的に AM 菌の生殖器官とみなせる胞子の中には、数百の核が含まれているのだが、それらは胞子内部で一核から増殖されたものではなく、そこに接続している菌糸から次々と流れ込み集積したものである (Jany and Pawlowska, 2010). もし、AM 菌が性を持たないクローン増殖を行い、外部からの遺伝子流入がないとすると、自

然に発生する有害遺伝子変異がゲノムに不可逆的に蓄積することになり、有性生殖で導入される機能的アレルによる補償作用が期待できない。そういった生殖様式は、それを採用する生物系統の存続にとって致命的となるはずである (Pawlowska, 2005). 実際、そういった無性的増殖を選んだ生物系統の進化の歴史はそう長くない (Taylor *et al.*, 1999). にもかかわらず、AM 菌という生物系統の歴史は 4 億年以上と、真菌類の中でも際立って長命である (Delaux, 2017). そこで、性による遺伝子導入 (組換え) の不在を補償するヘテロカリオン説は、進化生物学的な観点からも、論理性を持って受け入れられてきた (Pawlowska and Taylor, 2004; Croll *et al.*, 2009; Sanders and Croll, 2010; Corradi and Brachmann, 2016).

2) ホモカリオン説

現象として、また理論としても興味深いヘテロカリオン説が注目される一方で、この説を支持しない証拠も少なく出されていた。ヨーロッパ各地から採集した *Glomus* 属 10 系統の単胞子を用いて、複数のシングルコピー遺伝子を対象にジェノタイピングを行うと、それらの遺伝子型は胞子内では単一であり、異核の共存は認められなかった (Stukenbrock and Rosendahl, 2005). また菌糸融合は同一系統間では高頻度に起こるものの、遺伝的あるいは地理的に遠縁の系統間ではその頻度は著しく低下する (Giovannetti *et al.*, 2003; Pawlowska, 2005; de la Providencia *et al.*, 2013). 一胞子中の rDNA 配列には、やはり著しい多型が認められていたが (Corradi *et al.*, 2007; Rosendahl, 2008), 真菌類の rDNA リピート配列内の多型はそれほど珍しいものでもないことが次第に明らかになってきた (Simon and Weiss, 2008; Lin *et al.*, 2014). したがって、AM 菌ゲノムはヘテロカリオンというよりも、倍数性や核内遺伝子重複を内包するホモカリオンと考えられた (Pawlowska and Taylor, 2004). しかしホモカリオン説は、先に述べた *R. irregularis* DAOM197198 のゲノムサイズ (15 Mbp) が真核生物として非常に小さいことや、*G. etunicatum* (38 Mbp) の一核中の *PLS1* 遺伝子コピー数 (Hijri and Sanders, 2005) が少ないことと矛盾する。そして、無性的である以上、どのようにして有害遺伝子変異の蓄積の影響を回避しているのかという疑問も残る。しかしその後、複数の研究グループにより *R. irregularis* DAOM197198 のゲノムサイズの再測定が行われ、いずれのゲノムも 150 Mbp 付近であることが示された (Sędziewska *et al.*, 2011; Tisserant *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014). さらに、*PLS1* 遺伝子は、*R. irregularis* DAOM197198 のトランスクリプトーム解析や単一核のゲノム解析から、ゲノム中にシングルコピーであることが示唆された (Lin *et al.*, 2014; Riley *et al.*, 2014). あわせて、rDNA リピートや他の遺伝子に認められていた多型についても、ゲノム内の遺伝子重複で説明できることが、それらゲノム解析から明らかとなり (Ropars and Corradi, 2015; Corradi and Brachmann, 2016), ここにきて、ヘテロカ

リオン説は大きく揺らぐことになる。これまでに、ゲノムが解読された *R. irregularis* 系統の SNPs は 0.1~1/kb であり、これは典型的なヘテロカリオンの真菌類、例えば一細胞内に 10 個前後の異核を持つ植物病原菌 *Rhizoctonia solani* の SNPs 数 (>10 SNPs/kb) (Hane *et al.*, 2014) と比べるとはるかに小さい。また *R. irregularis* のゲノムやトランスクリプトームデータに見つかる SNPs は、数千ある核ゲノム全体に均一に散らばっており(異なる核を持つなら、その核ごとに SNPs の偏在が検出されるはずである) (Tisserant *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014), 少なくともゲノムが調べられた *R. irregularis* に関しては、いずれもヘテロカリオンではなかった (Corradi and Brachmann, 2016)。

3) ダイカリオン説

最近、ヘテロカリオンの *R. irregularis* が見つかった (Ropars *et al.*, 2016)。カナダオタワ大学の Nicolas Corradi の研究グループは、あらたに *R. irregularis* の 5 系統のゲノムを次世代シーケンサーで解析した。その結果、それらの SNPs 数は 3 系統が <0.2/kb, 残り 2 系統がそれより多めの 0.45/kb と 0.8/kb であった。いずれの SNPs 数も典型的なヘテロカリオンゲノムの SNPs に比べるとかなり少ない。そして後者 2 系統では、検出された SNPs におけるアリの出現頻度はいずれも 0.5 であり(つまりゲノム中にアリが 1:1 で存在する)、これは真菌類が有性生殖時の核分裂(減数分裂)に先立ち一時的に経験する複相核(二倍体, diploid)の状態を予想させる。ところが驚いたことに、それぞれのゲノムサイズは約 135 Mb であり、しかも核の倍数性をフローサイトメーターで調べたところ、いずれも単相(haploid)であった。したがって、前の 3 系統はホモカリオンであり、後の 2 系統は安定的に二種類の核を同じ割合で持つヘテロカリオン(図1)、つまり二核菌糸体(ダイカリオン, dikaryon)に類似したゲノム構造を持っていたのである (Ropars *et al.*, 2016)。

二核菌糸体とは文字どおり、担子菌類、子囊菌類などの二核菌類(ダイカリア, dikarya)にみられる特徴である。その二核状態の維持メカニズムはこれまでよく調べられている。担子菌類では、遺伝的に異なる一つの核を持つ体細胞同士が融合した後、それに引き続いて起こる体細胞分裂に伴い、二核が“共役的”に分裂し、異なる二核のセットが一つの細胞に厳密に分配される (Kües, 2000) (シイタケなど例外もある)。この二核状態は、生活環の大部分において維持されている。子囊菌においては、有性生殖時に共役的な二核の維持が認められる。遺伝子型の異なる配偶子囊が接合後、二核の融合が開始するまでのしばらくの間、共役的な核分裂が行われ、菌糸(造囊糸, ascogenous hypha)内に同数の二核が保持される期間がある (Roper *et al.*, 2011)。AM 菌の菌糸体では、前述したように、担子菌類のような隔壁の形成を伴う細胞分裂は認められていない。また子囊菌類のように、有性生殖器官を形成しないか、もしくは見つからない。AM 菌と類縁のケカビ類

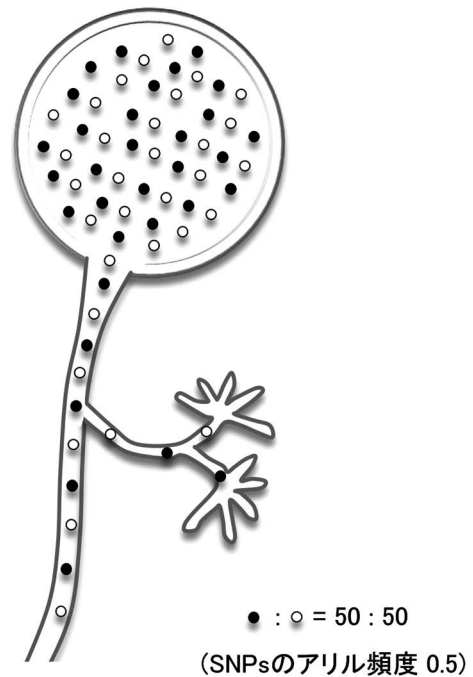


図1 *Rhizophagus irregularis* のヘテロカリオン系統は二種類の核を等比で持つ

Ropars ら (2016) の結果をもとに作図。

が、二核菌糸体ではないことも、先に述べた通りである。

4. AM 菌の遺伝的異質化のメカニズム

ここまで、野外の AM 菌の単胞子解析から、AM 菌がヘテロカリオンである可能性が見出され、その後、培養系統を使った解析からは、ほとんどそういった遺伝的異質性は認められなくなった経緯を振り返った。Ropars *et al.* (2016) の実験で用いられた 2 つのヘテロカリオン(ダイカリオン)は、実験室内で 10 年以上培養・維持されてきた系統である(由来はおそらく Koch *et al.*, 2004)。通常、ヘテロカリオンは、担子菌類のように構造的な共役的二核化のメカニズムが備わっていない限り、あるいはヘテロカリオンであることが有利となる選択圧のかからない単純培養系においては、次第に解消される傾向にある (Crawford *et al.*, 1986)。にもかかわらず、その 2 系統は長年の培養を経てもなお、個体内の SNPs のアリル頻度が 0.5 に保たれている。すなわち、AM 菌が隔壁のない菌糸体であることを考えると、それらの系統は連続した細胞質の中で規則性を持たない動きをする何千、何万もの二種類の核を、量的に 1:1 に維持できる(少なくとも現時点では)ことを意味している(図1)。しかし菌糸のライブイメージングでは、AM 菌の菌糸内の細胞質や核の流態に一定の方向性は認められず (Uetake *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2004; Bago *et al.*, 2002), 核のペアが同調的な動きをするようなことも観察されていない (Jany and Pawlowska, 2010)。推測に過ぎないが、Ropars *et al.* (2016) がゲノム解析で見出した *R. irregularis* の二つのヘテロカリオン系統は、培養を経てもかろうじて保持されてきた

AM菌本来の遺伝的異質性の姿を示しているのかもしれない。もし、その二核菌糸状態が単なる偶然ではなく、遺伝的異質化のメカニズムに基づいているとしたら、こういったモデル培養系を使ったヘテロカリオン化(ヘテロカリオシス)を生じる遺伝メカニズムの解析は、圃場におけるAM菌の遺伝情報や機能の動態を理解するうえでも重要である。

1) 遺伝的に近い系統間の菌糸融合

AM菌の一個体が遺伝的に多様性を増す最初のステップは、遺伝的に異なる菌糸間の融合である。AM菌はケカビ類と異なり、同じ菌糸体内で菌糸融合を高頻度で起こすことが *Glomus*, *Rhizophagus*, *Funneliformis*, *Claroideoglomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* の系統で示されてきた (Giovannetti *et al.*, 2001, 2003; Croll *et al.*, 2009; de la Providencia *et al.*, 2005; Purin and Morton, 2011; de Novais *et al.*, 2013; Pepe *et al.*, 2016)。しかし、これらの菌糸融合は“違う”系統同士ではほとんど起こらない (Giovannetti *et al.*, 2003)。つまり、AM菌が採集された地域(国)が異なる場合など、地理的に離れた系統同士がほとんど(すべてではない)菌糸融合しない (Giovannetti *et al.*, 2003; Purin and Morton, 2011)。しかし近年、同じ圃場から採集された遺伝子型の異なる *Rhizophagus* の菌糸同士が融合し、細胞質の連結と核の交換が確認できる完全な融合(perfect fusion)を起こすことが認められている (Croll *et al.*, 2009; Angelard *et al.*, 2010; Angelard and Sanders, 2011; de la Providencia *et al.*, 2013; Puirn and Morton, 2011)。それら *R. irregularis* 系統の菌糸の融合後、親系統に特異的な遺伝マーカーを用いて、その後代の単一胞子系統の遺伝子型を追跡したところ、親系統の遺伝子型は娘胞子に伝わっており、またそれら娘胞子は接種された宿主植物に対してそれぞれ親系統とは大きく異なる作用(根長やバイオマスなど)を示すことが分かった (Croll *et al.*, 2009; Angelard *et al.*, 2010; Colard *et al.*, 2011; Angelard *et al.*, 2014)。圃場において、私たちが問題としているのは、そこに存在するAM菌の遺伝子型や機能の“飛躍的”な変化ではなく、同じ圃場に存在する遺伝的に近縁のAM菌に生じる、栽培期間を通じた、“ローカル”な変化である。圃場において、少なくとも一部のAM菌種の遺伝子型や機能性は、菌糸融合により変化していると考えてよいだろう。

2) 栄養菌糸不和合性による制御

核に加えて、核に制御される細胞システム、すなわち各種オルガネラやタンパク質などの生体成分が、異質なものとで丸ごと“合流”することになる菌糸融合は、時として致命的な結果を両者にもたらす (Glass *et al.*, 2000)。菌糸融合をその生活スタイルに深く組み入れた多くの真菌類は、非自己を認識し、無益な融合を回避する分子メカニズムを備えている (Glass and Kaneko, 2003)。そのような栄養菌糸の不和合性メカニズムは、アカバカンカビなどの子嚢菌類で詳しく調べられており、不和合性は、核ゲノム

の *het* (heterokaryon incompatibility) 遺伝子など複数のアレルによって制御されることがわかっている (Pearson *et al.*, 2009)。栄養菌糸の融合は基本的にランダムに起こりうるが、対峙する二菌がともに同じ不和合性アレルを持っている場合に限り、融合した細胞は維持され、菌糸は伸長を続けることができる。和合性がない場合には、菌糸融合は成立せず、融合細胞はネクロシスというよりはむしろプログラム細胞死により死滅する (Glass and Kaneko, 2003)。

AM菌の場合も、不和合性の菌糸同士の融合において、(1)物理的な接触に先立ち原形質分離と隔壁が形成される pre-fusion incompatibility (Sbrana *et al.*, 2011; Purin and Morton, 2013) や、(2)融合後に同様の反応が生じる post-fusion incompatibility (Pepe *et al.*, 2016) が観察されており、これらの細胞応答は、他の真菌類のプログラム細胞死と形態的に類似している (Pepe *et al.*, 2016)。興味深いことに、AM菌の場合これらの栄養菌糸の不和合性は遺伝的に異なる菌糸同士だけではなく、同じ菌糸体内の菌糸融合における自家不和合性にも表れている。*Funneliformis* と *Rhizophagus* の菌糸体内における菌糸融合の成功率は、それぞれ4.5~64%および2.4~66.6%と、系統間で大きな違いがある (Giovannetti *et al.*, 1999; Avio *et al.*, 2006; Purin and Morton, 2011, 2013; Pepe *et al.*, 2016)。さらに興味深いことに、*Rhizophagus* など *Glomeraceae* に属するAM菌の個体は、菌糸切断後の修復(wound healing)や、隔たった菌糸同士の融合が可能であるが、*Ambispora*, *Gigaspora*, *Scutellospora* の個体は、切断後の修復はできても、隔たった菌糸同士の融合はほとんど起こらない (de la Providencia *et al.*, 2005; Voets *et al.*, 2006)。真菌類の *het* 遺伝子は、系統的、地理的に遠ければ遠いほど、その変異は大きく、菌糸融合が難しくなることが予想される (Chagnon, 2014; Pepe *et al.*, 2016)。AM菌の属間あるいは種間で、それぞれの一個体が内包する遺伝的異質性にどれほどの違いがあるのか、あるいは菌糸体内で核(遺伝情報)に偏在があるのかについての報告はない。AM菌の *het* 遺伝子など不和合性に関わる因子は同定できておらず、今後は実験室レベルでの不和合性遺伝子の同定と合わせて、圃場のAM菌の不和合性遺伝子がどれほど多様なのか、そしてそれらがAM菌の遺伝や機能性の発現にどのような影響を及ぼすのかについて、地理的に狭い範囲において、詳細な調査を行うことが重要である。

3) 交配型因子による制御

ヘテロカリオシスは、栄養菌糸の和合性とは独立した *MAT* 交配型遺伝子に支配される有性生殖のプロセスによっても制御される。交配型遺伝子座は多くの場合、転写制御因子、フェロモン、フェロモン受容体遺伝子などをコードしており、これらが一体となって菌糸融合に先立つ菌糸間相互作用、減数分裂への移行、そして担子菌の場合であれば、二核菌糸体の共役核分裂を制御する (Cop-

pin *et al.*, 1997; Casselton and Olesnicky, 1998). 先の Ropars *et al.* (2016) は, *R. irregularis* のヘテロカリオン系統の二核が, それぞれ異なる *MAT* 遺伝子座を持つ可能性を検討した. それまで, AM 菌の *MAT* 遺伝子座は同定されておらず, またその DNA 配列は菌類ごとに大きく異なるため, ホモロジーからの同定は困難であった (Riley and Corradi, 2013; Riley *et al.*, 2014). Ropars *et al.* (2016) は, *R. irregularis* 二核系統のゲノムの中に, 遺伝子変異が集積したアリル (*MAT* 遺伝子座内には変異に富んだイデオモルフと呼ばれる非相同領域がある) を探索し, ゲノム読み深度 (depth of coverage) が 1/2 に低下する推定 *MAT* 遺伝子座の特定にこぎつけた. この領域には, 担子菌の *MAT* 遺伝子座に含まれるホメオドメインタンパク質をコードする遺伝子と類似の遺伝子が含まれていた. そのうえで, *R. irregularis* の単核の 2 系統と二核の 1 系統から, それぞれ 20 個以上の単一核ゲノム解析を行い, 単核系統が一つの推定 *MAT* 遺伝子座候補を持ち, そして二核系統では, 異なる推定 *MAT* 遺伝子座を持つ二種の核が菌糸に等量含まれていることを明らかにした. さらに異なる研究室から集めた *R. irregularis* 27 系統の推定 *MAT* 遺伝子座を調べ, それらが系統進化的に 6 つのクレードに分類されること, そして単核系統はその中の一種のみ, そして二核系統は二種の推定 *MAT* 遺伝子座を持つことを明らかにした. 詳細な解析はまだだが, *R. irregularis* のゲノムにはダイカリアに特異的な性ホルモン受容体遺伝子が保存されており (Halary *et al.*, 2013; Ropars *et al.*, 2016), 減数分裂に特異的に関わる遺伝子も *R. irregularis* (Tisserant *et al.*, 2013; Halary *et al.*, 2013) の他に, *Gigaspora margarita* (Salvioli *et al.*, 2016), *G. rosea* (Tang *et al.*, 2016) のゲノムに保存されていた. 交配型が菌糸融合, 核融合, 減数分裂, 核の分配 (異質化) のどの部分に関わっているのか, あるいは関わっていないのかを, 今後具体的に調べていく必要がある.

5. 今後の展望

本稿では, AM 菌の一部が遺伝的に異質であること, そしてそこに関わると考えられる遺伝メカニズムを解説した. 要点をまとめると次のようになる. (1) 既知の遺伝子マーカー (rDNA など) では AM 菌の細かい分類は困難. (2) 圃場には未分類の AM 菌が多数存在する. (3) 近縁の (ローカルな) AM 菌は菌糸融合により遺伝的に異質化する. (4) AM 菌の一部はヘテロカリオンである. (5) 遺伝的異質化は遺伝学的に説明できると期待できる. これらを総合すると, 本稿の冒頭で述べた “どの AM 菌がその作物に適しているか” を知るためには, その遺伝的異質性の動態を明らかにすることが重要であると分かる (Lekberg and Koide, 2014; Öpik and Davison, 2016). AM 菌の “個” が, 一つの固定された遺伝情報では識別できない “異質” で “流動的” な存在であり, その機能性とは, AM 菌の遺伝情報に記されていると考えられる以上, AM 菌の

種類に拘泥せず, 遺伝情報そのものを分類・同定の指標に据えることが, 今後の研究の中では正しいアプローチといえるだろう. AM 菌を農業に利用していくうえで, その遺伝情報と機能性をつなげていくためには, 菌糸の中を流れて遺伝する極めて雑多な核の情報を, 分類・同定できる解像度をそなえた試験設計が重要となる. 以前, 筆者は菌根機能が, 「一菌糸の感染に由来する感染単位において一過的に発現する機能の積み重ね」であると述べた (小八重, 2017). ここでは詳しくは繰り返さないが, 感染単位 (infection unit) ごとに含まれる核の遺伝情報 (ヌクレオタイプ) を調べ (Kobae *et al.*, 2017), 機能と対応させた形で分類を行うことが, “どの AM 菌” の同定にはもっとも近道であろう. そのデータを圃場レベルで蓄積していくことで, 機能とむすびついた AM 菌の遺伝メカニズムを明らかにできるだろう.

Ropars *et al.* (2016) の AM 菌の *MAT* 遺伝子座の発見は, AM 菌のゲノムを人為的に改変 (育種) する技術開発につながる可能性がある. 今後, 多数の AM 菌の *MAT* 遺伝子座や, 栄養菌糸不和合性に関わる遺伝子が同定される可能性は高い. そうしたヘテロカリオンを制御する遺伝子を指標にして, 機能的に異なる系統同士の融合をより効率的, 計画的に行い, 宿主植物に目的の菌根機能を付与したテラーメードの AM 菌資材を作ることが提案されている (Corradi and Brachmann, 2016; Ropars *et al.*, 2016). しかしそういった資材が生かせるのは, 施設園芸など栽培コントロールがしやすい環境に限られるだろう. 輪作を基本とする畑作では, AM 菌のゲノムは毎年変化を繰り返す可能性が高い (Bever *et al.*, 1996; Eom *et al.*, 2000; Bever, 2002). 前作で増殖された AM 菌のゲノムが感染源 (遺伝資源) として後作に受け継がれ, そのゲノムや機能性が輪作の中でどのように変化していくのか, 今後は, AM 菌の動的な遺伝的異質性を圃場レベルで調べていく必要があるだろう.

最後に指摘しておきたいのは, AM 菌の遺伝情報は核ゲノムに限らないという点である. AM 菌の菌糸体には, ミトコンドリア (de la Providencia *et al.*, 2013; Daubois *et al.*, 2016), 内生細菌 (Salvioli *et al.*, 2016; Torres-Cortés *et al.*, 2015; Vannini *et al.*, 2016; Bonfante and Desirò, 2017), ウイルス (Ghabrial, 1998; Pearson *et al.*, 2009; Ikeda *et al.*, 2012) などの遺伝情報も含まれている. AM 菌のこれらの遺伝情報は, 隔壁のない菌糸体を流動し, 菌糸融合によって拡散すると予想される. 野外ではそういった多様な遺伝情報が一体となり, 植物の生長に大きな影響を与える可能性がある (Pawlowska, 2005; Brusini *et al.*, 2011; Chagnon, 2014). 輪作の中で AM 菌を効果的に利用するためには, 栽培期間を通じて, AM 菌に含まれる多様な遺伝情報の変化を長期間, 定点調査し, その機能性を評価するポット試験と合わせて, “どの菌=どの遺伝子” がその作物に適しているのかを調べていくことが重要と考えられる.

謝 辞：本稿で紹介した研究の一部は、JST ACCEL (JPMJAC1403) の支援により行った。基礎生物学研究所の前田太郎博士、栃木県立博物館の山本航平博士には、本稿をご校閲いただいた。この場を借りてお礼申し上げる。

文 献

- Abbott, L. 1982. Comparative anatomy of vesicular–arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. *Aust. J. Bot.*, **30**, 485–499.
- Alvarez, M.I., and Eslava, A.P. 1983. Isogenic strains of *Phycomyces blakesleeanus* suitable for genetic analysis. *Genetics*, **105**, 873–879.
- Angelard, C., Colard, A., Niculita-Hirzel, H., Croll, D., and Sanders, I.R. 2010. Segregation in a mycorrhizal fungus alters rice growth and symbiosis-specific gene transcription. *Curr. Biol.*, **20**, 1216–1221.
- Angelard, C., and Sanders, I.R. 2011. Effect of segregation and genetic exchange on arbuscular mycorrhizal fungi in colonization of roots. *New Phytol.*, **189**, 652–657.
- Angelard, C., Tanner, C.J., Fontanillas, P., Niculita-Hirzel, H., Masclaux, F., and Sanders, I.R. 2014. Rapid genotypic change and plasticity in arbuscular mycorrhizal fungi is caused by a host shift and enhanced by segregation. *ISME J.*, **8**, 284–294.
- Arihara, J., and Karasawa, T. 2000. Effect of previous crops on arbuscular mycorrhizal formation and growth of succeeding maize. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **46**, 43–51.
- Avio, L., Pellegrino, E., Bonari, E., and Giovannetti, M. 2006. Functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungal isolates in relation to extraradical mycelial networks. *New Phytol.*, **172**, 347–357.
- Bago, B., Zipfel, W., Williams, R., Jun, J., Arreola, R., Lammers, P., Pfeffer, P.E., and Shachar-Hill, Y. 2002. Translocation and utilization of fungal lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.*, **128**, 108–124.
- Bergman, K., Burke, P.W., Cerda-Olmedo, E., David, C.N., Delbruck, M., Foster, K.W., Goodell, E.W., Heisenberg, M., Meissner, G., Zalokar, M., Dennison, D.S., and Shropshire, W. Jr. 1969. *Phycomyces*. *Bacteriol. Rev.*, **33**, 99–157.
- Bever, J.D. 2002. Negative feedback within a mutualism: host-specific growth of mycorrhizal fungi reduces plant benefit. *Proc. Biol. Sci.*, **269**, 2595–2601.
- Bever, J.D., and Morton, J. 1999. Heritable variation of spore shape in a population of arbuscular mycorrhizal fungi: Suggestions of a novel mechanism of inheritance. *Am. J. Bot.*, **86**, 1209–1216.
- Bever, J.D., Morton, J.B., Antonovics, J., and Schultz, P.A. 1996. Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. *J. Ecol.*, **84**, 71–82.
- Bonfante, P., and Desirò, A. 2017. Who lives in a fungus? The diversity, origins and functions of fungal endobacteria living in Mucoromycota. *ISME J.*, **11**, 1727–1735.
- Boon, E., Halary, S., Baptiste, E., and Hijri, M. 2015. Studying genome heterogeneity within the arbuscular mycorrhizal fungal cytoplasm. *Genome Biol. Evol.*, **7**, 505–521.
- Boon, E., Zimmerman, E., Lang, B.F., and Hijri, M. 2010. Intra-isolate genome variation in arbuscular mycorrhizal fungi persists in the transcriptome. *J. Evol. Biol.*, **23**, 1519–1527.
- Brundrett, M., and Ashwath, N. 2013. Glomeromycotan mycorrhizal fungi from tropical Australia III. Measuring diversity in natural and disturbed habitats. *Plant Soil*, **370**, 419–433.
- Brusini, J., Robin, C., and Franc, A. 2011. Parasitism and maintenance of diversity in a fungal vegetative incompatibility system: The role of selection by deleterious cytoplasmic elements. *Ecol. Lett.*, **14**, 444–452.
- Campbell, C.S., Wojciechowski, M.F., Baldwin, B.G., Alice, L.A., and Donoghue, M.J. 1997. Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae). *Mol. Biol. Evol.*, **14**, 81–90.
- Casselton, L.A., and Olesnick, N.S. 1998. Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 55–70.
- Chagnon, P.L. 2014. Ecological and evolutionary implications of hyphal anastomosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **88**, 437–444.
- Clapp, J.P., Fitter, A.H., and Young, J.P.W. 1999. Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora* sp. *Mol. Ecol.*, **8**, 915–921.
- Colard, A., Angelard, C., and Sanders, I.R. 2011. Genetic exchange in an arbuscular mycorrhizal fungus results in increased rice growth and altered mycorrhiza-specific gene transcription. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 6510–6515.
- Coppin, E., Debuchy, R., Arnaise, S., and Picard, M. 1997. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 411–428.
- Corradi, N., Croll, D., Colard, A., Kuhn, G., Ehinger, M., and Sanders, I.R. 2007. Gene copy number polymorphisms in an arbuscular mycorrhizal fungal population. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 366–369.
- Corradi, N., and Brachmann, A. 2016. Fungal mating in the most widespread plant symbionts? *Trends Plant Sci.*, **22**, 175–183.
- Croll, D., Giovannetti, M., Koch, A.M., Sbrana, C., Ehinger, M., Lammers, P.J., and Sanders, I.R. 2009. Nonself vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol.*, **181**, 924–937.
- Crawford, M.S., Chumley, F.G., Weaver, C.G., and Valent, B. 1986. Characterization of the heterokaryotic and vegetative diploid phases of *Magnaporthe grisea*. *Genetics*, **114**, 1111–1129.
- Daubois, L., Beaudet, D., Hijri, M., and de la Providencia, I. 2016. Independent mitochondrial and nuclear exchanges arising in *Rhizophagus irregularis* crossed-isolates support the presence of a mitochondrial segregation mechanism. *BMC Microbiol.*, **16**, 11.
- de la Providencia, I.E., de Souza, F.A., Fernandez, F., Sejalón-Delmas, N., and Declerck, S. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi exhibit distinct pattern of anastomoses formation and hyphal healing mechanism between different phylogenetic groups. *New Phytol.*, **165**, 261–271.
- de la Providencia, I.E., Nadimi, M., Beaudet, D., Morales, G.R., and Hijri, M. 2013. Detection of a transient mitochondrial DNA heteroplasmy in the progeny of crossed genetically divergent isolates of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, **200**, 211–221.
- de Novais, C.B., Sbrana, C., Júnior, O.J.S., Siqueira, J.O., and Giovannetti, M. 2013. Vegetative compatibility and anastomosis formation within and among individual germings of tropical isolates of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*, **23**, 325–331.

- Delaux, P.M. 2017. Comparative phylogenomics of symbiotic associations. *New Phytol.*, **213**, 89–94.
- Eickbush, T.H., and Eickbush, D.G. 2007. Finely orchestrated movements: Evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics*, **175**, 477–485.
- Eom, A.H., Hartnett, D.C., and Wilson, G.W.T. 2000. Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. *Oecologia*, **122**, 435–444.
- Gandolfi, A., Bonilauri, P., Rossi, V., and Menozzi, P. 2001. Intraindividual and intraspecific variability of ITS1 sequences in the ancient asexual *Darwinula stevensoni* (Crustacea: Ostracoda). *Heredity*, **87**, 449–455.
- Ghabrial, S. 1998. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes*, **16**, 119–131.
- Gianinazzi-Pearson, V., Morandi, D., Dexheimer, J., and Gianinazzi, S. 1981. Ultrastructural and ultracytochemical features of a *Glomus tenuis* mycorrhiza. *New Phytol.*, **88**, 633–639.
- Giovannetti, M., Azzonlini, D., and Citernesi, A.S. 1999. Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 5571–5575.
- Giovannetti, M., Fortuna, P., Citernesi, A.S., Morini, S., and Nuti, M.P. 2001. The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytol.*, **151**, 717–724.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Strani, P., Agnolucci, M., Rinaudo, V., and Avio, L. 2003. Genetic diversity of isolates of *Glomus mosseae* from different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 616–624.
- Glass, N., Jacobson, D., and Shiu, P. 2000. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annu. Rev. Genet.*, **34**, 165–186.
- Glass, N.L., and Kaneko, I. 2003. Fatal attraction: Nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryot. Cell*, **2**, 1–8.
- Gregory, P.H. 1984. The fungal mycelium: An historical-perspective. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **82**, 1–11.
- Halary, S., Daubois, L., Terrat, Y., Ellenberger, S., Wöstemeyer, J., and Hijri, M. 2013. Mating type gene homologues and putative sex pheromone-sensing pathway in arbuscular mycorrhizal fungi, a presumably asexual plant root symbiont. *PLoS ONE*, **19**, e80729.
- Hane, J.K., Anderson, J.P., Williams, A.H., Sperschneider, J., and Singh, K.B. 2014. Genome sequencing and comparative genomics of the broad host-range pathogen *Rhizoctonia solani* AG8. *PLoS Genet.*, **10**, e1004281.
- Hibbett, D., Abarenkov, K., Kõljalg, U., Öpik, M., Chai, B., Cole, J.R., Wang, Q., Crous, P.W., Robert, V.A., Helgason, T., Herr, J.O., Kirk, P., Lueschow, S., O'Donnell, K., Nilsson, H., Oono, R., Schoch, C.L., Smyth, C., Walker, D., Porras-Alfaro, A., Taylor, J.W., and Geiser, D.M. 2016. Sequence-based classification and identification of Fungi. *Mycologia*, **108**, 1049–1068.
- Hijri, M., Hosny, M., van Tuinen, T., and Dulieu, H. 1999. Intraspecific ITS polymorphism in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycota) is structured within multinucleate spores. *Fungal Genet. Biol.*, **26**, 141–151.
- Hijri, M., and Sanders, I.R. 2004. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. *Fungal Gen. Biol.*, **41**, 253–261.
- Hijri, M., and Sanders, I.R. 2005. Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature*, **433**, 160–163.
- Hosny, M., Hijri, M., Passerieux, E., and Dulieu, H. 1999. rDNA units are highly polymorphic in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycetes). *Gene*, **226**, 61–71.
- Ikeda, Y., Shimura, H., Kitahara, R., Masuta, C., and Ezawa, T. 2012. A novel virus-like double-stranded RNA in an obligate biotroph arbuscular mycorrhizal fungus: A hidden player in mycorrhizal symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **25**, 1005–1012.
- Jany, J.L., and Pawlowska, T.E. 2010. Multinucleate spores contribute to evolutionary longevity of asexual glomeromycota. *Am. Nat.*, **175**, 424–435.
- Johnson, D., Martin, F., Cairney, J.W.G., and Anderson, I.C. 2012. The importance of individuals: Intraspecific diversity of mycorrhizal plants and fungi in ecosystems. *New Phytol.*, **194**, 614–628.
- Karasawa, T. 2004. Arbuscular mycorrhizal associations and interactions in temperate cropping systems. *Res. Bull. Natl. Agric. Res. Cent.*, **179**, 1–71.
- 小八重善裕 2017. アーバスキュラー菌根共生の圃場における機能・価値. *土肥誌*, **88**, 258–264.
- Kobae, Y., Ohtomo, R., Oka, N., and Morimoto, S. 2017. A simple model system for identifying arbuscular mycorrhizal fungal taxa that actively colonize rice roots grown in field soil. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **63**, 29–36.
- Koch, A.M., Kuhn, G., Fontanillas, P., Fumagalli, L., Goudet, J., and Sanders, I.R. 2004. High genetic variability and low local diversity in a population of arbuscular mycorrhizal fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2369–2374.
- Krüger, M., Krüger, C., Walker, C., Stockinger, H., and Schüßler, A. 2012. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytol.*, **193**, 970–984.
- Kües, U. 2000. Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 316–353.
- Kuhn, G., Hijri, M., and Sanders, I.R. 2001. Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, **619**, 745–748.
- Lafranco, L., and Young, J.P.W. 2012. Genetic and genomic glimpses of the elusive arbuscular mycorrhizal fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **15**, 454–461.
- Lekberg, Y., and Koide, R.T. 2014. Integrating physiological, community, and evolutionary perspectives on the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Botany*, **92**, 241–251.
- Lin, K., Limpens, E., Zhang, Z., Ivanov, S., Saunders, D.G., Mu, D., Pang, E., Cao, H., Cha, H., Lin, T., Zhou, Q., Shang, Y., Li, Y., Sharma, T., van Velzen, R., de Ruijter, N., Aanen, D.K., Win, J., Kamoun, S., Bisseling, T., Geurts, R., and Huang, S. 2014. Single nucleus genome sequencing reveals high similarity among nuclei of an endomycorrhizal fungus. *PLoS Genet.*, **10**, e1004078.
- Lindahl, B.D., Nilsson, R.H., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Carlsen, T., Kjoller, R., Kõljalg, U., Pennanen, T., Rosendahl, S., Stenlid, J., and Kauserud, H. 2013. Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers—A user's guide. *New Phytol.*, **199**, 288–299.
- Lloyd-Macgilp, S.A., Chambers, S.M., Dodd, J.C., Fitter, A.H., Walker, C., and Young, J.P.W. 1996. Diversity of the ribo-

- somal internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, **133**, 103–111.
- Mensah, J.A., Koch, A.M., Antunes, P.M., Kiers, E.T., Hart, M., and Bücking, H. 2015. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi is associated with differences in phosphate and nitrogen uptake and fungal phosphate metabolism. *Mycorrhiza*, **25**, 533–546.
- Munkvold, L., Kjoller, R., Vestberg, M., Rosendahl, S., and Jakobsen, I. 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, **164**, 357–364.
- Ohsowski, B.M., Zaitsoff, P.D., Öpik, M., and Hart, M.M. 2014. Where the wild things are: Looking for uncultured Glomeromycota. *New Phytol.*, **204**, 171–179.
- Oka, N., Karasawa, T., Okazaki, K., and Tanabe, M. 2010. Maintenance of soybean yield with reduced phosphorus application by previous cropping with mycorrhizal plants. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **56**, 824–830.
- 大友 量・酒井 治・塚本康貴・杉戸智子・谷藤 健・岡 紀邦 2015. 北海道のダイズ作における輪作順序を考慮したリン酸減肥法. *土肥誌*, **86**, 550–553.
- Öpik, M., and Davison, J. 2016. Uniting species- and community-oriented approaches to understand arbuscular mycorrhizal fungal diversity. *Fungal Ecol.*, **24**, 106–113.
- Öpik, M., Davison, J., Moora, M., and Zobel, M. 2014. DNA-based detection and identification of Glomeromycota: The virtual taxonomy of environmental sequences. *Botany*, **92**, 135–147.
- Orchard, S., Hilton, S., Bending, G.D., Dickie, I.A., Standish, R.J., Gleeson, D.B., Jeffery, R.P., Powell, J.R., Walker, C., Bass, D., Monk, J., Simonin, A., and Ryan, M.H. 2016a. Fine endophytes (*Glomus tenue*) are related to Mucoromycotina, not Glomeromycota. *New Phytol.*, **213**, 481–486.
- Orchard, S., Standish, R.J., Nicol, D., Gupta, V.V.S.R., and Ryan, M.H. 2016b. The response of fine root endophyte (*Glomus tenue*) to waterlogging is dependent on host plant species and soil type. *Plant Soil*, **403**, 305–315.
- Pawlowska, T.E. 2005. Genetic processes in arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Lett.*, **251**, 185–192.
- Pawlowska, T.E., and Taylor, J.W. 2004. Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, **427**, 733–737.
- Pearson, M.N., Beever, R.E., Boine, B., and Arthur, K. 2009. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Mol. Plant Pathol.*, **10**, 115–128.
- Pepe, A., Giovannetti, M., and Sbrana, C. 2016. Different levels of hyphal self-incompatibility modulate interconnectedness of mycorrhizal networks in three arbuscular mycorrhizal fungi within the Glomeraceae. *Mycorrhiza*, **26**, 325–332.
- Plenchette, C., Clermont-Dauphin, C., Meynard, J.M., and Fortin, J.A. 2005. Managing arbuscular mycorrhizal fungi in cropping systems. *Can. J. Plant Sci.*, **85**, 31–40.
- Pringle, A., Moncalvo, J.M., and Vilgalys, R. 2000. High levels of variation in ribosomal DNA sequences within and among spores of a natural population of the arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora colossica*. *Mycologia*, **92**, 259–268.
- Purin, S., and Morton, J.B. 2011. *In situ* analysis of anastomosis in representative genera of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, **21**, 505–514.
- Purin, S., and Morton, J.B. 2013. Anastomosis behaviour differs between asymbiotic and symbiotic hyphae of *Rhizophagus clarus*. *Mycologia*, **12**, 589–602.
- Redecker, D., Hijri, M., Dulieu, H., and Sanders, I.R. 1999. Phylogenetic analysis of a dataset of fungal 5.8S rDNA sequences shows that highly divergent copies of internal transcribed spacers reported from *Scutellospora castanea* are of ascomycete origin. *Fungal Genet. Biol.*, **28**, 238–244.
- Riley, R., Charron, P., Idnurm, A., Farinelli, L., Dalpé, Y., Martin, F., and Corradi, N. 2014. Extreme diversification of the mating type-high-mobility group (*MATA-HMG*) gene family in a plant-associated arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.*, **201**, 254–268.
- Riley, R., and Corradi, N. 2013. Searching for clues of sexual reproduction in the genomes of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecol.*, **6**, 44–49.
- Ropars, J., and Corradi, N. 2015. Homokaryotic vs heterokaryotic mycelium in arbuscular mycorrhizal fungi: Different techniques, different results? *New Phytol.*, **208**, 638–641.
- Ropars, J., Toro, K.S., Noel, J., Pelin, A., Charron, P., Farinelli, L., Marton, T., Krüger, M., Fuchs, J., Brachmann, A., and Corradi, N. 2016. Evidence for the sexual origin of heterokaryosis in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nat. Microbiol.*, **1**, 16033.
- Roper, M., Ellison, C., Taylor, J.W., and Glass, N.L. 2011. Nuclear and genome dynamics in multinucleate ascomycete fungi. *Curr. Biol.*, **21**, R786–R793.
- Rosendahl, S. 2008. Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, **178**, 253–266.
- Saito, K., Kuga-Uetake, U., and Saito, M. 2004. Acidic vesicles in living hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *Plant Soil*, **261**, 231–237.
- Salvioli, A., Ghignone, S., Novero, M., Navazio, L., Venice, F., Bagnaresi, P., and Bonfante, P. 2016. Symbiosis with an endobacterium increases the fitness of a mycorrhizal fungus, raising its bioenergetic potential. *ISME J.*, **10**, 130–144.
- Sanders, I.R. 1999. Evolutionary genetics—No sex please, we're fungi. *Nature*, **399**, 737–739.
- Sanders, I.R. 2002. Ecology and evolution of multigenomic arbuscular mycorrhizal fungi. *Am. Nat.*, **160** (Suppl. 4), S128–S141.
- Sanders, I.R. 2004. Plant and arbuscular mycorrhizal fungal diversity—Are we looking at the relevant levels of diversity and are we using the right techniques? *New Phytol.*, **164**, 415–418.
- Sanders, I.R., Alt, M., Groppe, K., Boller, T., and Wiemken, A. 1995. Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: Application to studies of genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytol.*, **130**, 419–427.
- Sanders, I.R., and Croll, D. 2010. Arbuscular mycorrhiza: The challenge to understand the genetics of the fungal partner. *Annu. Rev. Genet.*, **44**, 271–292.
- Sanders, I.R., and Rodriguez, A. 2016. Aligning molecular studies of mycorrhizal fungal diversity with ecologically important levels of diversity in ecosystems. *ISME J.*, **10**, 2780–2786.
- Sbrana, C., Fortuna, P., and Giovannetti, M. 2011. Plugging into the network: Belowground connections between germ-lings and extraradical mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia*, **103**, 307–316.
- Schüßler, A. 1999. Glomales SSU rRNA gene diversity. *New Phytol.*, **144**, 205–207.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., and Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution.

- Mycol. Res.*, **105**, 1413–1421.
- Schwartz, V.U., Winter, S., Shelest, E., Marcet-Houben, M., Horn, F., Wehner, S., Linde, J., Valiante, V., Sammeth, M., Riege, K., Nowrousian, M., Kaerger, K., Jacobsen, I.D., Marz, M., Brakhage, A.A., Gabaldón, T., Böcker, S., and Voigt, K. 2014. Gene expansion shapes genome architecture in the human pathogen *Lichtheimia corymbifera*: An evolutionary genomics analysis in the ancient terrestrial Mucorales (Mucoromycotina). *PLoS Genet.*, **10**, e1004496.
- Sędziewska, K.A., Fuchs, J., Tensch, E.M., Baronian, K., Watzke, R., and Kunze, G. 2011. Estimation of the *Glomus intraradices* nuclear DNA content. *New Phytol.*, **192**, 794–797.
- Simon, U.K., and Weiss, M. 2008. Intragenomic variation of fungal ribosomal genes is higher than previously thought. *Mol. Biol. Evol.*, **25**, 2251–2254.
- Smith, S.E., and Read, D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis, 3rd edn., Academic Press, Inc, San Diego, CA.
- Spatafora, J.W., Chang, Y., Benny, G.L., Lazarus, K., Smith, M.E., Berbee, M.L., Bonito, G., Corradi, N., Grigoriev, I., Gryganskyi, A., James, T.Y., O'Donnell, K., Roberson, R.W., Taylor, T.N., Uehling, J., Vilgalys, R., White, M.M., and Stajich, J.E. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, **108**, 1028–1046.
- Stukenbrock, E.H., and Rosendahl, S. 2005. Development and amplification of multiple co-dominant genetic markers from single spores of arbuscular mycorrhizal fungi by nested multiplex PCR. *Fungal Genet. Biol.*, **42**, 73–80.
- Stürmer, S.L. 2012. A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum Glomeromycota. *Mycorrhiza*, **22**, 247–258.
- Tang, N., San Clemente, H., Roy, S., Bécarré, G., Zhao, B., and Roux, C. 2016. A survey of the gene repertoire of *Gigaspora rosea* unravels conserved features among Glomeromycota for obligate biotrophy. *Front. Microbiol.*, **7**, 233.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., and Fisher, M.C. 1999. The evolution of asexual fungi: Reproduction, speciation and classification. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **37**, 197–246.
- Thippayarugs, S., Bansal, M., and Abbott, L.K. 1999. Morphology and infectivity of fine endophyte in a mediterranean environment. *Mycol. Res.*, **103**, 1369–1379.
- Tisserant, E., Malbreil, M., Kuo, A., Kohler, A., Symeonidi, A., Balestrini, R., Charron, P., Duensing, N., Frei dit Frey, N., Gianinazzi-Pearson, V., Gilbert, L.B., Handa, Y., Herr, J.R., Hijri, M., Koul, R., Kawaguchi, M., Krajinski, F., Lammers, P.J., Masclaux, F.G., Murat, C., Morin, E., Ndikumana, S., Pagni, M., Petitpierre, D., Requena, N., Rosikiewicz, P., Riley, R., Saito, K., San Clemente, H., Shapiro, H., van Tuinen, D., Becard, G., Bonfante, P., Paszkowski, U., Shachar-Hill, Y., Tuskan, G.A., Young, P.W., Sanders, I.R., Henrissat, B., Rensing, S.A., Grigoriev, I.V., Corradi, N., Roux, C., and Martin, F. 2013. Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 562–563.
- Torres-Cortés, G., Ghignone, S., Bonfante, P., and Schüßler, A. 2015. Mosaic genome of endobacteria in arbuscular mycorrhizal fungi: Transkingdom gene transfer in an ancient mycoplasma-fungus association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 7785–7790.
- Truong, C., Mujic, A.B., Healy, R., Kuhar, F., Furci, G., Torres, D., Niskanen, T., Sandoval-Leiva, P.A., Fernández, N., Escobar, J.M., Moretto, A., Palfner, G., Pfister, D., Nouhra, E., Swenie, R., Sánchez-García, M., Matheny, P.B., and Smith, M.E. 2017. How to know the fungi: Combining field inventories and DNA-barcoding to document fungal diversity. *New Phytol.*, **214**, 913–919.
- Uetake, Y., Kojima, T., Ezawa, T., and Saito, M. 2002. Extensive tubular vacuole system in an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytol.*, **154**, 761–768.
- van der Heijden, M.G.A., Martin, F.M., Selosse, M.A., and Sanders, I.R. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: The past, the present, and the future. *New Phytol.*, **205**, 1406–1423.
- van Tuinen, D., Jacquot, E., Zhao, B., Gollotte, A., and Gianinazzi-Pearson, V. 1998. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Mol. Ecol.*, **7**, 879–887.
- Vannini, C., Carpentieri, A., Salvioli, A., Novero, M., Marsoni, M., Testa, L., de Pinto, M.C., Amoresano, A., Ortolani, F., Bracale, M., and Bonfante, P. 2016. An interdomain network: The endobacterium of a mycorrhizal fungus promotes antioxidative responses in both fungal and plant hosts. *New Phytol.*, **211**, 265–275.
- Verbruggen, E., and Kiers, E.T. 2010. Evolutionary ecology of mycorrhizal functional diversity in agricultural systems. *Evol. Appl.*, **3**, 547–560.
- Voets, L., de la Providencia, I.E., and Declercq, S. 2006. Glomeraceae and Gigasporaceae differ in their ability to form hyphal networks. *New Phytol.*, **172**, 185–188.
- 八木哲生・松本武彦・大友 量・小林創平・三枝俊哉・岡 紀邦 2014. 根鉤地域における飼料用トウモロコシのアーバスキュラー菌根菌感染率とリン酸施肥反応に及ぼす前作物の影響. *土肥誌*, **85**, 501–507.
- Yamamoto, K., Degawa, Y., Takashika, Y., Fukuda, M., and Yamada, A. 2017. *Endogone corticioides* sp. nov. from subalpine conifer forests in Japan and China, and its multi-locus phylogeny. *Mycoscience*, **58**, 23–29.