

アーバスキュラー菌根菌の純粋培養技術の確立

石井孝昭¹・堀井幸江^{2, **}¹ 一般財団法人日本菌根菌財団理事長² 京都府立大学大学院

はじめに

アーバスキュラー菌根菌(AMF)は、ほぼ全ての陸上植物と共生し、宿主植物から光合成産物を得る見返りに、宿主植物の養水分吸収 (特にリン酸)の促進、病虫害抵抗性および環境ストレス耐性の付与に貢献することが知られている。そのため、農業や環境緑化への利用が期待されているが、絶対共生菌であるため、宿主植物との共生なしには AMF の増殖、特に孢子生産はできないと言われ続けられてきた。

しかし、筆者ら(21, 25)は宿主植物(宿主細胞も含む)を用いない方法(純粋培養技術)で、AMF の菌糸増殖と孢子生産を世界に先駆けて成功した。ここでは、AMF 研究の歴史的背景とともに、純粋培養技術の取り組みとこれからの展望を紹介したい。

背景

マツタケ、ホンシメジ、ショウロ、トリュフなどのキノコを形成する外生菌根菌の場合、肉眼でも感染の有無などを観察しやすいことから、古くからこれらの外生菌根菌が宿主植物と共生関係を築いていることが知られていた。しかし、AMF の場合は肉眼での観察が難しく、菌糸が透明なので、染色させなければならぬことから、AMF が宿主植物の根内に侵入し、菌根を形成する微生物(当時は内生菌根菌と呼ばれていた)であることが明らかになったのは 20 世紀初頭のことである。Reed & Fremont(41)によれば、カンキツ樹に菌根形成が確認されたのは 1933 年という。わが国でもマメ科植物に内生菌根が形成されること(2)や、わが国に自生する様々な植物においても内生菌根が観察されることが報告されている(32)。その後、Kleinschmit & Gerdemann(29)は、米国では土壌消毒後、カンキツ樹の生育が抑えられ、要素欠乏症が起きていたが、その症状が有害物質によるものではなく、消毒によって AMF が殺されたためであることを発見した。そこで、Menge et al. (34)および Nemec(39)は実際にカンキツ幼樹や台木に AMF を接種したところ、要素欠乏症が解消され、対照(無接種)区と比べて、樹の生育が旺盛になるとともに、樹勢が揃うことを明らかにした。これらの研究成果から、作物栽培における AMF の重要性に関心が集められるようになった。

その後、AMF の素晴らしい効能がいろいろと見出され、かつ様々な作物と共生関係を結ぶことから、この菌の活用によって、安心・安全で持続可能な農業生産や環境緑化の構築が可能となるので、この共生菌の大量生産技術、特に純粋培養が試みられてきた。

その始まりとして、宿主根からの溶出物を用いた菌糸培養(4, 10)や宿主植物細胞を用いた菌糸培養技術(5)が行われたが、この増殖させた培養菌糸の感染性は検討されていない。また、遺伝子組み換えの毛状根(根だけで異常に増殖)からの溶出物を利用した Dual(一つのシャーレを半分に区切り、一方に毛状根を設置し、その根からの溶出物が、AMF 孢子を設置した他方の区分に流れ込むようにさせた培養法)培養技術が検討された(3)が、この培養方法では変異遺伝子による AMF への影響や、その変異遺伝子の自然環境への流出・拡大が懸念される。

** 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 果樹茶業研究部門

第 1 表 菌根菌生長促進物質

1)フラボノイド(flavonoids)

(作用)アーバスキュラー菌根菌(AMF)の菌糸生長を促進する(5, 9, 19, 38)。

2)ポリアミン(polyamines)

(作用)AMF の菌糸生長を促進する(6, 20)。スペルミジンは花に大量に含まれ、落花後、AMF 形成を促進する(23)。

3)アルギン酸オリゴ糖(alginate oligosaccharide)および糖アルコール (sugar alcohols)

(作用)AMF の菌糸生長を促進する (20, 30)。

4)核酸 (nucleic acids)

(作用)高濃度の RNA(250 ppm)は孢子形成を誘発し、新孢子数を増加させる(14)。5'-デオキシ-5'-メチルアミノアデノシン は AMF の菌糸生長を促進する(31)。また、AMF は宿主植物の細胞核を奪う(24)。

5)セスキテルペン(sesquiterpenes)

(作用)*Gigaspora* 属の AMF 菌糸の分岐を促進する(1)。ただし、*Glomus* 属の AMF では菌糸の分岐促進効果がみられないものがある。

6)ペプチド(peptides)

(作用)トリプトファンダイマーというペプチドは AMF を誘引し、菌糸生長を促進する (15)。また AMF の孢子形成も促進する(21, 22)。

7)エチレン(ethylene)および脂質(lipids)

(作用)唯一のガス体の AMF 生長促進物質であり、0.01~0.1 ppm の濃度で菌糸生長を促進する。しかし、0.2 ppm 以上の濃度では阻害する (7, 8, 18)。

脂質は、微生物作用および非微生物作用でエチレンを生成する(40)。そのため、AMF の純粋培養用培地に脂質と鉄、特に 2 価鉄イオンを含む化合物、Fe-EDTAなどを添加するとエチレンの効能が期待される。

さらに、ミリスチン酸、パルミトレイン酸などの脂肪酸を含む単純脂質や、これらを構成脂肪酸とする糖脂質およびリン脂質は、AMF の菌糸生長や菌糸の分岐を著しく促進し、孢子形成を誘発させる(42)。特に、リン脂質の効果は顕著である(42, 43)。そこで、AMF の純粋培養用(IH)培地ではリン脂質を用いている(第 2 表)。なお、鉄を含む培地(培養液)に脂質を添加する場合、エチレンが生成されるので、脂質の添加量を調整し、エチレン生成量を高めないように注意する必要がある。ちなみに、鉄添加でミリスチン酸、パルミトレイン酸などの多くの脂肪酸からエチレンが生成される。

8)低級アミン(lower amines)

(作用)エチレンジアミン、1, 2-プロパンアミンなどのアミン類は AMF の孢子形成を促進する(25, 26)。これらはキレート物質であるので、養分吸収にも関与する。

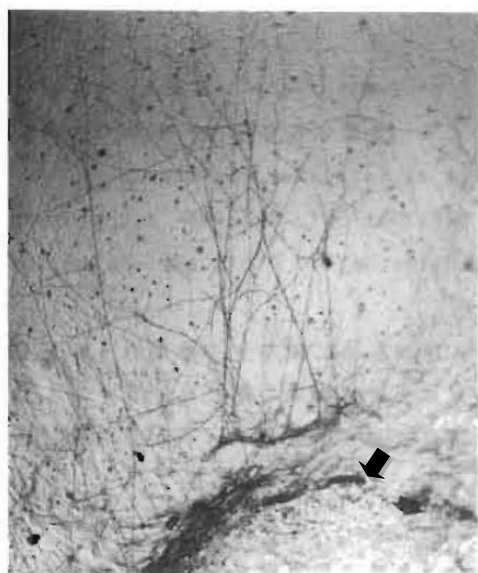
しかし、これらの研究成果は宿主の根には AMF の生長を促進する物質が存在することを示唆した。そこで、筆者らは AMF の生長増進に著しく貢献するイネ科植物、特にバヒアグラスに着目し、この草の根に存在する様々な菌根菌生長促進物質の探索を行った。ちなみに、この草は、台湾では「百喜草」と呼ばれていたもので、縁起を担いでこの草からの恵みを得られることにかけてみた。幸運なことに、バヒアグラス根抽出物を用いることによって、AMF の純粋培養に成功したので、まさにこの成功はバヒアグラスからの恵みと言える。その後、この根抽出物から様々な有益な菌根菌生長促進物質を単離・同定するとともに、微生物の生長制御に関与する光の波長の影響などを明らかにすることによ

って、根や根抽出物(根溶出物も含む)を用いない方法で、世界初の菌根菌純粋培養技術も確立し、現在、AMF の大量孢子生産の事業化ができる段階にある。この純粋培養技術の詳細については、以下に示すとおりである。

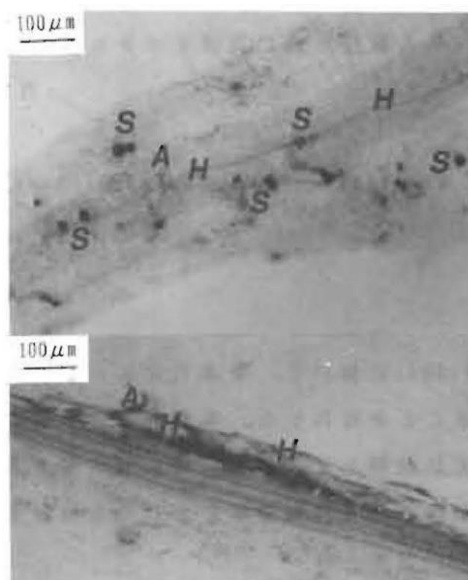
なお、第1表は、現在までに明らかになっている菌根菌生長促進物質を示す。

純粋培養技術の取り組み

前述した通り、石井ら(17)は、フラッシュクロマトグラフィーで得たバヒアグラス根の 25%メタノール溶出物を用いて、AMF の純粋培養に世界で初めて成功した。つまり、バヒアグラス根抽出物の 25%メタノール溶出物を添加した寒天培地に、*Gigaspora ramisporophora* という AMF を素寒天培地上で培養し、コルクボーラーで採取した菌糸切片ディスク(直径 7 mm)を置床して、30°C の暗黒下で培養した。その結果、培養 60 日後、菌糸のみでも旺盛に菌糸生長する(第1図)とともに、この培養菌糸は宿主への感染性を持つ(第2図)ことを明確に証明した。



第1図 バヒアグラス根の 25%メタノール溶出物添加培地上での AMF 菌糸の伸長(培養 2 か月後) (x150)
矢印：AMF 菌糸を含む寒天ディスク



第2図 培養菌糸の感染性(接種 1 か月後)
上：バヒアグラス根，下：ネギ根
A：樹枝状体，H：菌糸，S：孢子

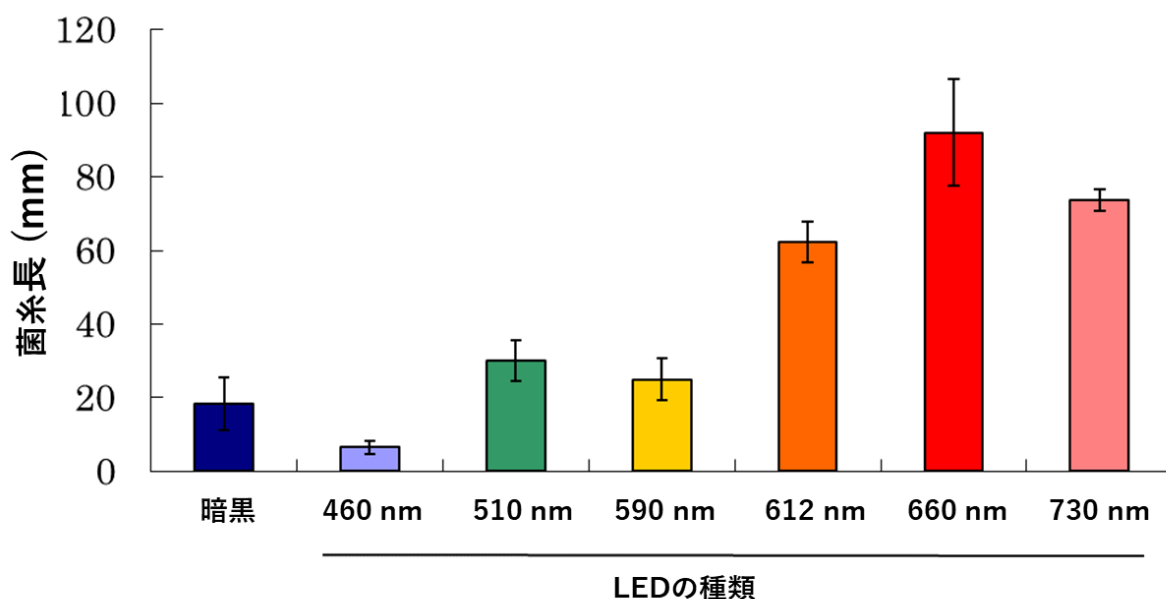
バヒアグラス根抽出物の 25%メタノール溶出物は、7 月から 9 月の生育期間中に採取したバヒアグラス根を蒸留水で洗浄した後、以下のようにして抽出・精製を行った。すなわち、このバヒアグラス根を 80%メタノール中に入れ、一昼夜浸漬した後、東洋ろ紙 No.5C でろ過した。このように、AMF 生長促進物質などを抽出した後、この抽出液(ろ液)をエバポレーターで濃縮した。得られた濃縮液を Chromatorex ODS DM1020T(直径 20 mm, 長さ 25 cm)を装備したフラッシュクロマトグラフ(富士シリシア化学製)を用いて精製し、25%メタノールで溶出した。これらの溶出液(0.4 g 根相当)を蒸発乾固し、それぞれ 1.4%の寒天を含む 10 ml の液体(蒸留水)を加えて溶解した後、120°C で 15 分間オートクレーブを用いて滅菌し、AMF の人工培養のための培地とした。

この方法では、菌糸切片のみで菌糸を増殖させることができたが、孢子形成までに時間がかかること、実用化のためにはバヒアグラス根 25%メタノール溶出物が大量に用意しなければならないことなどから、この 25%メタノール溶出物中の菌糸生長および孢子形成に関与する菌根菌生長促進物質の探

索を行うとともに、培養効率を改善するため、培養条件の検討も行った。

まず AMF 胞子の表面殺菌方法を検討した。その結果、胞子の消毒剤は、クロラミン T: 7000 ppm, ストレプトマイシン: 56 ppm, クロラムフェニコール: 21 ppm および Tween80 : 数滴が適することを見出し、胞子を 10~15 分間浸漬させ、その後滅菌水で洗浄して試験に用いるという最良の方法を開発した。培養条件の検討のための培地は、オートクレーブした 1.5%の寒天もしくはゲルライト培地とした。培養後は、菌糸長や胞子形成などを、CCD カメラを装備した実体顕微鏡およびパソコンによる画像処理法 (16)を用いて評価した。

その後、培養中の光条件について検討を行った。612~730 nm の赤色領域の光照射は暗黒下の場合と比較して、*Gigaspora margarita* という AMF に対して 3~5 倍の顕著な菌糸生長促進効果を示した。また光強度の違いによる影響は $10\sim40\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ までは差異が認められなかった (45, 46)。510 nm および 590 nm 下では暗黒下との間に有意差がみられなかった。一方、450 nm 付近の青色領域の照射では菌糸生長が著しく抑制された(第3図)。

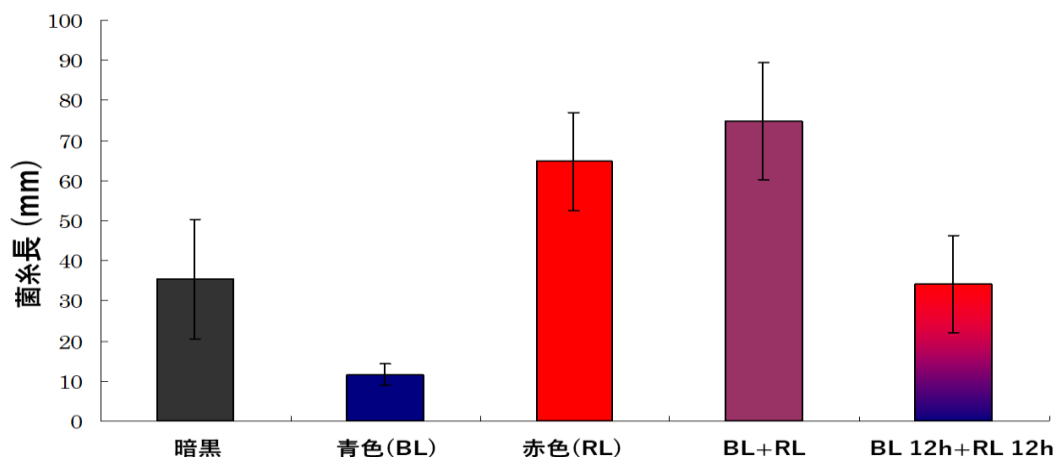


第3図 暗黒、ならびに色々な波長の LED 照射が AMF (*Gigaspora margarita*) の菌糸伸長に及ぼす影響
図中の垂線は標準誤差 (n=9) を示す。

ほぼ同時期、Nagahashi et al.(36, 37)は AMF 菌が植物に感染する際に重要となる菌糸の分岐に着目し、強い光照射や青色光が、*Gigaspora gigantea* などの AMF に対して菌糸の分岐を促進することを報告していた。

また筆者らは、450 nm の波長をピークとする青色発光ダイオード (BL) および 660 nm の波長をピークとする赤色発光ダイオード (RL) を使用し、混合照射や間欠照射の影響を *Gigaspora margarita* で調査した。BL+RL の混合照射では RL と同程度の顕著な生長促進効果がみられた。しかし、BL12h +RL12h の間欠照射では暗黒下の場合と比べて有意な差がみられなかった。全分岐数は BL+RL の混合照射において高かった(第4図)。さらに興味深いこととして、RL あるいは BL+RL 照射下では、基本培地(35)にバヒアグラス根 25%メタノール抽出物 (0.1g DW/10 mL)を添加した培地において、*Gigaspora margarita* で 1 か月後、*Glomus* 属では 2 週間後から新しい胞子の形成が観察された (46)。

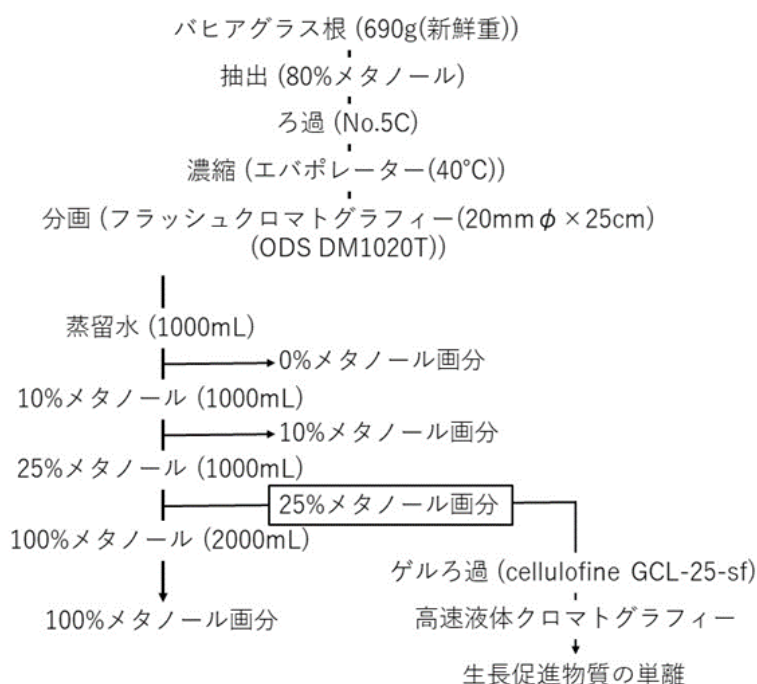
AMF の孢子形成は何らかのストレスを受けたときに起こると考えられ、赤色光のみを照射するよりも、青色光との同時照射によるストレスが孢子形成を促している可能性が考えられた。



第4図 青色および赤色 LED 照射が AMF (*Gigaspora margarita*) の菌糸伸長に及ぼす影響

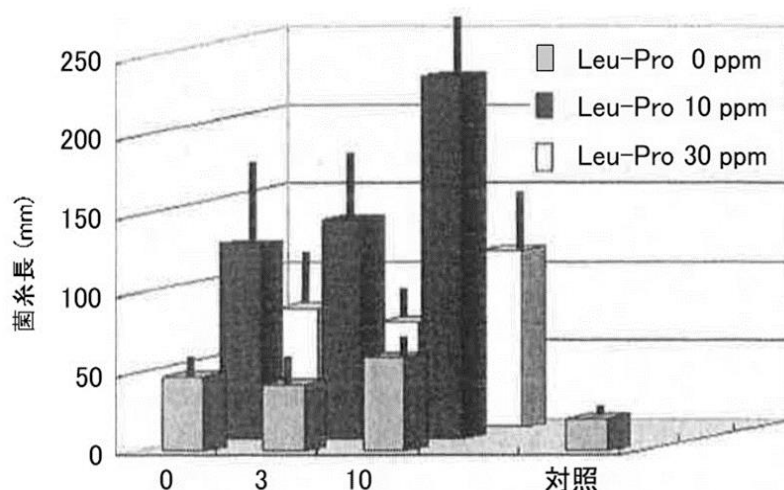
図中の垂線は標準誤差 (n=9) を示す。

培地組成についても検討を行った。バヒアグラス根の 25%メタノール溶出物には数種の物質が含まれるため、物質の単離・同定を試みた(第 5 図)。まず、フラボノイドの 1 種であるユーパリチンを同定した (19)。ユーパリチンは、10 ppm の濃度で培地に添加したとき、*Gigaspora ramisporophora* の菌糸長を対照区と比較して、約 2.7 倍伸長させた。さらに、他の物質についても同定を進めるため、等電点電気泳動装置ロトフォア (BIO-RAD) を用いて精製した溶液から、HPLC を用いて物質の単離・同定を試みた。単離したピークのうちペプチドに着目し、アミノ酸シーケンサーおよび NMR を用いた解析から、トリプトファンダイマーを同定した (15)。このペプチドは様々な植物根や種子から滲出していることも発見した。これ以外に、ロイシルプロリンやそのペプチド誘導体を検出した。



第 5 図 AMF 生長促進物質の単離手順

そこで、トリプトファンダイマーおよびロイシルプロリンを培地に加えて *Gigaspora margarita* を培養した。その結果、すでに同定していたユーパリチン 10 ppm に、トリプトファンダイマーおよびロイシルプロリン(第 6 図)をそれぞれ 10 ppm で添加した場合、菌糸伸長が著しかった(11)。それぞれの物質単独でも菌糸生長促進効果が認められるが、これらの物質を混合した場合に菌糸生長は相乗的に促進された。なお、トリプトファンダイマーはバヒアグラス以外の様々な植物根からの滲出液にも含まれること (44)、バヒアグラス根からは、水ストレス条件下で多く滲出すること (13) が報告されている。



第6図 Trp-Trp(トリプトファンダイマー)、Leu-Pro(ロイシルプロリン)およびユーパリチンが AMF (*Gigaspora margarita*) の菌糸伸長に及ぼす影響

対照 (水のみ) を除き、いずれの区にもユーパリチン 10 ppm を加えた。

図中の垂線は標準誤差 (n=6) を示す。

さらなる培地の改善のため、脂質や炭の添加について検討した。第 1 表に示すように、単純脂質、糖脂質およびリン脂質は AMF の菌糸生長や菌糸の分岐を著しく促進して、孢子形成を誘発させるが、特にリン脂質の効果が顕著であった。そこで、リン脂質に着目し、調査したところ、L- α -ジミリストイル・ホスファチジルコリンおよび L- α -ジミリストイル・ホスファチジリエタノールアミン添加区で、*Gigaspora margarita* の菌糸生長促進効果が認められた(43)。そのため、基本培地 (35) にはこの 2 種類のリン脂質を加えたものを改良基本(IH)培養液とした (第 2 表)。

炭は土壤中の AMF を活性化させるが、pH が上昇するため培養に用いることが難しかった。しかし、炭素繊維の表面を賦活化させた活性炭素繊維は培地の pH を変化させない。そこで、光調整環境下でのヤシガラ活性炭 (AC)、炭素繊維 (CF) (トレカ®) および活性炭素繊維 (ACF)(KF-1700FL, 東洋紡) が AMF の生長に及ぼす影響を調査した。AC, CF および ACF をそれぞれ 0.1% 添加した 1.5% ゲルライト培地 (pH6.0) に *Gigaspora margarita* の孢子を植え付け、暗黒、赤色、青色および赤青混合光下で 10 日間培養し、菌糸長、副細胞数および分岐数を測定した。菌糸長および副細胞の形成は、CF 添加では効果がみられなかったが、AC および ACF 添加区では促進され、さらに赤青混合光下ではこの効果が大きかった (33)。

第2表 改良基本 (IH) 培養液

Base media	mg・L ⁻¹
KNO ₃	100
KH ₂ PO ₄	48
Ca(NO ₃) ₂ ・4H ₂ O	288
MgSO ₄ ・7H ₂ O	512
NH ₄ NO ₃	80
FeCl ₂ ・6H ₂ O	10
H ₃ BO ₄	7
MnSO ₄ ・4H ₂ O	4
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	0.05
Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	0.007
CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.003
myo-Inositol	100
Glycine	2
Pyridoxine hydrochloride	0.5
Nicotinic acid	0.5
Thiamine hydrochloride	0.1
Biotin	0.2
Choline chloride	0.02
L- α - Dimyristoyl phosphatidylcholine	10
L- α - Dimyristoyl phosphatidylethanolamine	10
Sucrose or glucose	1000
pH	6 to 6.5

第3表 ペプチド、活性炭素繊維および赤色LEDがAMFの菌糸生長および孢子形成に及ぼす影響

処理区	菌糸生長	孢子形成
ポテトデキストロース寒天培地	—	—
改良基本培養液 (IH)	+	—
IH + ペプチド	++	+
IH + ペプチド + 活性炭素繊維	+++	++
IH + ペプチド + 赤色LED	+++	+ ~ +++
IH + ペプチド + 赤色LED + 活性炭素繊維	+++	++ ~ ++++

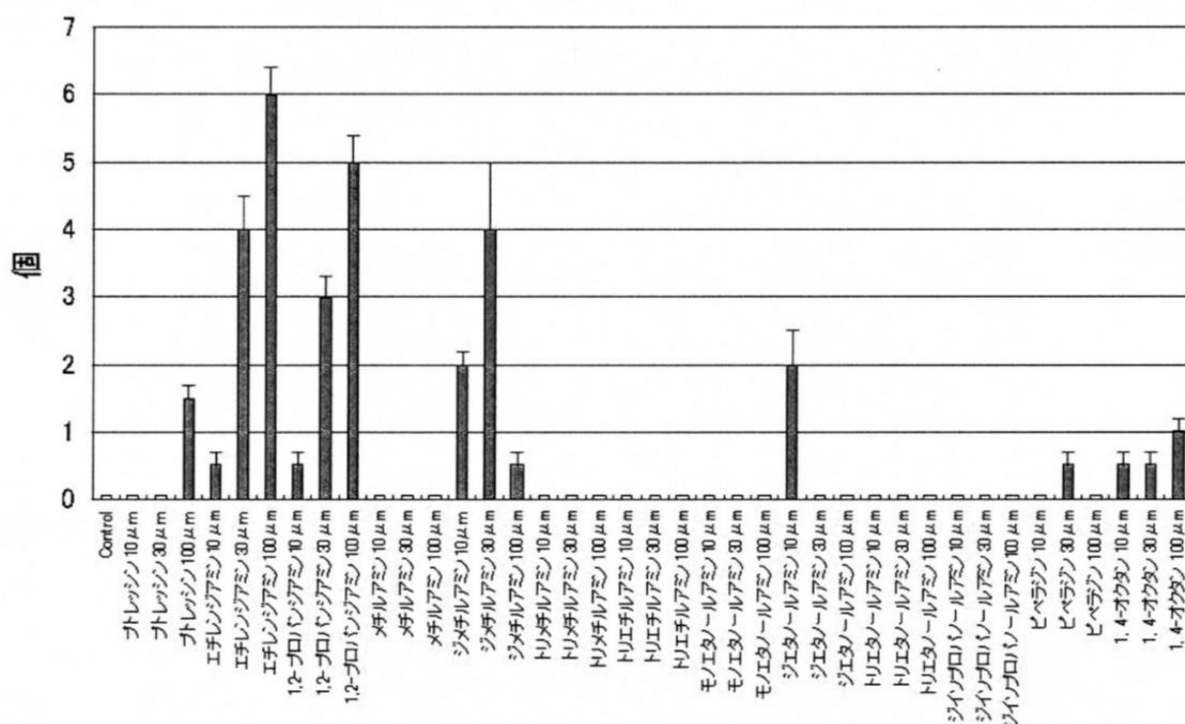
—: 効果なし、+ ~ ++++: 効果あり (小 ~ 大)

赤色LED (5 ~ 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

ポテトデキストロース寒天培地以外の処理区はゲルライト (1.5%) を用いた。

これらの技術を統合し、IH 培養液にバヒアグラス根の 25%メタノール溶出物から見出した菌根菌生長促進物質であるトリプトファンダイマーおよびロイシルプロリンというペプチドをそれぞれ 10 ppm 加える培地を作り上げ、ゲルライト (1.5%) 固形培地を用い培養を行った。さらにこの培地のための培養以外にも、赤色発光ダイオード (RL) による光照射および活性炭素繊維(ACF)を加えて培養を行った。培養温度は 25°Cとした。AMF には、*Gigaspora albida*, *Glomus etunicatum* および *Glomus caledonium* を供試した。IH 培養液+Peptides+Dark 区でも孢子形成が観察されたが、IH 培養液+peptides+ACF+RL 区で孢子形成がさらに促進され、培養 1 か月後には、いずれの AMF においても 1 個の母孢子から数個の新しい孢子が形成された(第 3 表)。また、新(子)孢子からさらに新(孫)孢子をも連続して形成される継代培養技術を作り上げ、これらの孢子が感染性を持ち、様々な植物の根に菌根共生を築くことも確認した (12, 21, 22)。

さらに探索を進めて、孢子形成に極めて重要な新規の菌根菌生長促進物質、つまりアミン類を発見した(25, 26)。すなわち、アミン類を添加した IH 培地に *Glomus clarum* を置床し、RL 光下で培養したところ、供試したアミン類は、菌根菌の菌糸生長促進効果を示さず、むしろ生長を抑制するものが多かった。しかしながら、それらの中で、第一アミンおよび第二アミンに含まれるアミン類は、孢子形成を誘発させる作用を有していた。特に、第 7 図に示すように、エチレンジアミン、1, 2-プロパンジアミンおよびジメチルアミンの効果は著しく大きいものであった。またエチレンジアミンおよび 1, 2-プロパンジアミンは菌根植物において孢子形成を促進する濃度で検出されたが、非菌根植物では検出されなかった (26)。



第7図 アミン類がAMF (*Glomus clarum*) の孢子形成に及ぼす影響

図中の垂線は標準誤差 (n=8) を示す。

最近, Kameoka et al. (28) は, パルミトレイン酸という脂質を含む培地で, *Rhizophagus irregularis* という遺伝子変異が起きている AMF を用いて世界で初めて純粋培養に成功したと報告している。しかし, 筆者らは, 第 1 表に示すように, すでにミリスチン酸, パルミトレイン酸などの脂肪酸を含む単純脂質や, これらを構成脂肪酸とする糖脂質およびリン脂質は AMF の菌糸生長や菌糸分岐の促進, ならびに胞子形成の誘発に関与していることを明らかにしている。特に, リン脂質の効果は顕著であった(42)。L- α -ジミリスチル・ホスファチジルコリンの 10 ppm 添加区では, *Gigaspora margarita* の菌糸長が対照区のおよそ 4 倍になったことも報告している (43)。

このように, Kameoka らは筆者らの前述の脂質に関する論文や特許(21, 25)の成果を全く引用せず偽装し, かつ盗用の疑いがかけられる行為を行うとともに, 国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)のホームページなどで「世界初」と吹聴している。石井(27)は, 「研究者としての心構え」の中で, 「Doctor」という英単語には「Falsify(書類などを偽装する。事実などを偽る。)」という奥深い意味もあることを紹介している。この論文に関係する Doctors は, まさに事実を偽って, 外部資金の獲得や人事案件などの優位性を高めようとしていると言える。

これからの展望

AMF の純粋培養が可能となったことで, 微生物資材としての AMF の利用が進むことが期待される。なぜなら, 宿主植物への共生を必要とせず一定環境下での培養が進めば, 生産コストを削減できるため, より安価に AMF を生産者へ普及することが可能となるからである。AMF は宿主植物のリン酸の吸収を助けるが, そのリン酸肥料に関して食糧生産の現場は大きな問題に直面している。リン酸は限られた資源であるにもかかわらず, 先進国ではその過剰施肥が問題となっている。AMF を施用すれば必ず作物の生育が促進されるわけではなく, リン酸肥料が全て不要になるわけではない。しかし, AMF の施用により土壤中に蓄積されているリン酸肥料を有効に利用することは可能である。有用な資材である AMF を活用するためには, 化学性・物理性を含む土壤環境や AMF のパートナー細菌の増殖, 宿主となる植物根の健全な発達など, AMF が植物と共生できる環境を整える必要がある。AMF は, 限られた資源を有効に使い, 安全で安心な食糧を持続的に生産していくための資材の一つである。現在のように速効性や収量性のみを求めるのではなく, まずは生物が共に生きていけるよう環境を改善し, 食糧を持続的に生産していくことを考えなければならない。

一方, AMF の純粋培養は AMF を単独で生長させることが可能になったので, 植物と AMF との共生メカニズムの解明ができるものと考えている。共生という「持ちつ持たれつ」の関係は私たち人類にとっても非常に重要な課題であり, この共生メカニズムの解明は私たちの心の豊かさを得る方策ではないかと思われるからである。

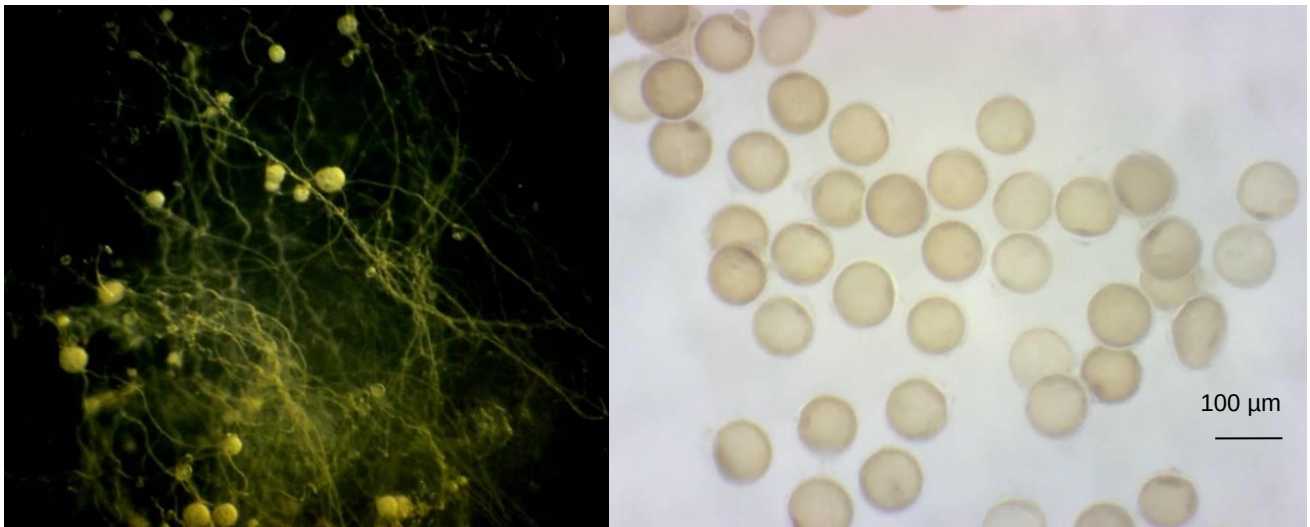
おわりに

現在, 筆者らの AMF 純粋培養技術は充実した AMF 胞子を大量に生産できる事業化レベルの段階にあるが, 宿主植物による安価で大量に胞子を生産できる技術も確立しているので, 現時点では純粋培養による胞子生産の事業化は控えているのが現状である。しかし, 純粋培養では土壤を一切使っていないので, 国外に AMF 接種源を輸出できるという利点がある。また, 植物工場などの施設栽培で病原菌などの侵入が危惧される場所では AMF とそのパートナー細菌の利用は大いに役立つであろう。現在, 菌根菌の有効性が徐々に認知され始めているので, AMF の純粋培養の事業に着手していかなければならないと考えている。

さらに重要な AMF の純粋培養技術の活用場面として, AMF を遺伝子組み換え(GM)作物による汚

染から防ぐための保護技術があげられる。わが国や世界の AMF が GM 作物に汚染されないように、また化学合成農薬や化学肥料の使用によって多様性が失われないように、自然から授けられた宝である AMF を、未来の人々のために保存しておかなければならないと考えている。古くから地球に存在し、私たち人類や動物の生存を助けてくれた AMF を守るためにも。

近い将来、私たちはこの純粋培養技術（第 8 図）を活用して AMF のジーンバンクを創設してみたいと思っています。ご協力の程、よろしくお願い致します。



第8図 筆者らの純粋培養技術によるAMF (*Glomus clarum*)胞子の大量生産

左: 純粋培養中の菌糸と胞子

右: 正規のサイズまで大きくなった非常にきれいな胞子(ピュアな胞子)

引用文献

1. Akiyama, K., Matsuzaki, K. and Hayashi, H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824-827.
2. Asai, T. 1944. Über die mykorrhizenbildung der Leguminosen-Pflanzen. *Japan. J. Bot.* 13: 463-485.
3. Bécard, G. and Fortin, J.A. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218.
4. Bécard, G. and Piché, Y. 1989. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2320-2325.
5. Carr, G. R., Hinkley, M. A., Le Tacon, F., Hepper, C. M., Jones, M. G. K. and Thomas, E. 1985. Improved hyphal growth of two species of vesicular-arbuscular fungi in the presence of suspension-cultures plant cells. *New Phytol.* 101: 417-426.
6. El Ghachtouli, N., Paynot, M., Martin-Tanguy, J., Morandi, D. and Gianninazzi, S. 1996. Effect of polyamines and polyamine biosynthesis inhibitors on spore germination and hyphal growth of *Glomus mosseae*. *Mycol. Res.* 100: 597-600.
7. Geil, R. D., Peterson, R. L. and Guinel, F. C. 2001. Morphological alterations of pea (*Pisum sativum* cv. Sparkle) arbuscular mycorrhizas as a result of exogenous ethylene treatment. *Mycorrhiza* 11: 137-143.
8. Geil, R. D. and Guinel, F. C. 2002. Effects of elevated substrate-ethylene on colonization of leek (*Allium porrum*) by the

- arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus aggregatum*. Can. J. Bot. 80: 114-119.
9. Gianninazzi-Pearson, V., Brazanti, B. and Gianninazzi, S. 1989. In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. Symbiosis 7: 243-255.
 10. Hepper, C. M. 1984. Isolation and culture of VA mycorrhizal (VAM) fungi. In VA Mycorrhiza. Eds. C. L. Powell and D. J. Bagyaraj. pp. 95-112. CRC Press, Boca Raton, FL.
 11. 堀井幸江, 倉本 誠, 佐藤健司, 石井孝昭. 2004. ペプチドは VA 菌根共生に作用する. 園芸学会雑誌 73(別 1): 249.
 12. 堀井幸江, 石井孝昭. 2007. 純粋培養によって生産されたアーバスキュラー菌根菌の感染性および継代培養. 園芸学研究 6(別 2): 137.
 13. 堀井幸江, 松村 篤, クルス アンドレ フレイリ, 石井孝昭. 2007. バヒアグラスを用いたアーバスキュラー菌根菌の簡便な孢子生産技術の開発. 農業生産技術管理学会誌 14: 25-30.
 14. 堀井幸江, 石井孝昭. 2008. 核酸が純粋培養におけるアーバスキュラー菌根菌の孢子形成に及ぼす影響. 園芸学研究 7(別 1): 242.
 15. Horii, S., Matsumura, A., Kuramoto, M. and Ishii, T. 2009. Tryptophan dimer produced by water-stressed bahia grass is an attractant for *Gigaspora margarita* and *Glomus caledonium*. World J. Microbiol. Biotech. 25: 1207-1215.
 16. Ishii, T. and Kadoya, K. 1994. Effects of charcoal as a soil conditioner on citrus growth and vesicular-arbuscular mycorrhizal development. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63: 529-535.
 17. 石井孝昭, 松本 勲, ヨゲシュ ハリ シュレスタ, 村田博和, 門屋一臣. 1995. VA 菌根菌の人工培養と培養菌糸体による数種類の植物への感染性. 園芸学会雑誌 64(別 1): 190-191.
 18. Ishii, T., Shrestha, Y. H., Matsumoto, I. and Kadoya, K. 1996. Effect of ethylene on the growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and on the mycorrhizal formation of trifoliate orange roots. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 65: 525-529.
 19. Ishii, T., Narutaki, A., Sawada, K., Aikawa, J., Matsumoto, I. and Kadoya, K. 1997. Growth stimulatory substances for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in Bahia grass (*Paspalum notatum* Flügg.) roots. Plant Soil 196: 301-304.
 20. Ishii, T., Kitabayashi, H., Aikawa, J., Matsumoto, I., Kadoya, K. and Kirino, S. 2000. Effects of alginate oligosaccharide and polyamines on hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and their infectivity of citrus roots. Proc. Int. Soc. Citriculture 2: 1030-1032.
 21. 石井孝昭, 堀井幸江. 2007a. 菌根菌培養方法. 特許第 4979551 号. 日本国特許庁.
 22. 石井孝昭, 堀井幸江. 2007b. アーバスキュラー菌根菌の純粋培養の確立. 園芸学研究 6(別 2): 136.
 23. Ishii, T., Motosugi, H., Nakano, M., Matsumura, A. and Horii, S. 2008. Flower abscission contributes to arbuscular mycorrhizal development in trifoliate orange and peach roots. Acta Hort. 773: 57-61.
 24. 石井孝昭, 松原智子, 米田基人, クルス アンドレ フレイリ. 2011. アーバスキュラー菌根菌は宿主から細胞核を奪い, その多様性を高める. 園芸学研究 10(別 1): 59.
 25. 石井孝昭. 2012a. 菌根菌の培養方法, 菌根菌の孢子形成促進方法および菌根菌孢子形成促進用組成物. 特許第 6030908 号. 日本国特許庁.
 26. 石井孝昭. 2012b. アーバスキュラー菌根菌およびその菌に関連する微生物とパートナー植物を活用した土壌管理に関する研究. IFO Research Communications 26: 87-100.
 27. 石井孝昭. 2014. 菌根菌の働きと使い方. 農村漁村文化協会. 東京.
 28. Kameoka, H., Tsutsui, I., Saito, K., Kikuchi, Y., Handa, Y., Ezawa, T., Hayashi, H., Kawaguchi, M. and Akiyama, K. 2019. Stimulation of asymbiotic sporulation in arbuscular mycorrhizal fungi by fatty acids. Nature Microbiol. DOI: 10.1038/s41564-019-0485-7.

29. Kleinschmit, G. D. and Gerdemann, J. W. 1972. Stunting of citrus seedlings in fumigated nursery soils related to the absence of endomycorrhizae. *Phytopathol.* 62:1447-1453.
30. Kuwada, K., Kuramoto, M., Utamura, M., Matsushita, I., Shibata Y. and Ishii, T. 2005. Effect of mannitol in *Laminaria japonica*, other sugar alcohols, and marine alga polysaccharides on in vitro hyphal growth of *Gigaspora margarita* and root colonization of trifoliate orange. *Plant Soil* 276: 279-286.
31. Kuwada, K., Kuramoto, M., Utamura, M., Matsushita, I. and Ishii, T. 2006. Isolation and structural elucidation of a growth stimulant for arbuscular mycorrhizal fungus from *Laminaria japonica* Areschoug. *J. Appl. Phycol.* 18: 795-800.
32. Maeda, M. 1954. The meaning of mycorrhiza in regard to systematic botany. *Kumamoto J. Sci. Ser. B*, 3: 57-84.
33. 松村 篤, 堀井幸江, クルス アンドレ フレイリ, 石井孝昭. 2006. 活性炭素繊維がアーバスキュラー菌根菌の生長に及ぼす影響. *園芸学会雑誌* 75(別 2): 112.
34. Menge, J. A., Johnson, E. L. V. and Platt, R. G. 1978. Mycorrhizal dependency of several citrus cultivars under three nutrient regimes. *New Phytol.* 81: 553-559.
35. 村松秀則, 石井孝昭, 松本 勲, 門屋一臣. 1995. *In vitro* における VA 菌根菌菌糸の生長に及ぼす培地条件の探索. *園芸学会雑誌* 64(別 2): 106-107.
36. Nagahashi, G., Douds Jr., D.D. and Buee, M. 2000. Light-induced hyphal branching of germinated AMFungal spores. *Plant Soil* 219: 21-29.
37. Nagahashi, G. and Douds Jr., D.D. 2003. Action spectrum for the induction of hyphal branches of an arbuscular mycorrhizal fungus: exposure sites versus branching sites. *Mycol. Res.* 107: 1075-1082.
38. Nair, M. G., Safir, G. R. and Siquiera, J. O. 1991. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhizae-stimulatory compounds from clover (*Trifolium ripens*) roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 434-439.
39. Nemec, S. 1979. Response of six citrus rootstocks to three species of *Glomus*, a mycorrhizal fungus. *The citrus industry* 5: 5-14.
40. Ochiai, S. and Ishii, T. 2008. Production of bio-ethylene using dead grape leaf. *J. Japan Institute Energy* 87: 744-748.
41. Reed, H.S. and Fremont, T. 1935. Factors that influence the formation and development of mycorrhizal associations in citrus roots. *Phytopathol.* 25:645-647.
42. Rutto, K. L., 石井孝昭, Cruz, A. F., 門屋一臣. 1999. 脂質が VA 菌根菌の菌糸生長に及ぼす影響. *園芸学会雑誌* 68(別 2): 113.
43. 柴田雄亮, 堀井幸江, 松村 篤, 石井孝昭. 2005. リン脂質がアーバスキュラー菌根菌の生長に及ぼす影響. *園芸学会雑誌* 74(別 1): 457.
44. 戸田雄太, 余 東, 堀井幸江, クルス アンドレ フレイリ, 石井孝昭. 2009. アーバスキュラー菌根共生におけるシグナル物質としてのトリプトファンダイマーの普遍性. *園芸学研究* 8(別 1): 61.
45. 谷内義信, 石井孝昭, 岡本研正, 堀井幸江. 2001. 光が in vitro での VA 菌根菌の菌糸生長に及ぼす影響. *園芸学会雑誌* 70(別 2): 250.
46. 谷内義信, 笈田幸治, 石井孝昭. 2003. VA 菌根菌の純粋培養技術の改善. *園芸学会雑誌* 72(別 1): 191.