

皇居吹上御苑の森のアーバスキュラー菌根菌群集

大和政秀^{1*}・中里祐香²・日下部亮太³・保坂健太郎⁴

¹千葉大学教育学部 〒263–8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1–33

*E-mail: myamoto@chiba-u.jp

²千葉大学大学院教育学研究科 〒263–8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1–33

³千葉大学大学院園芸学研究科 〒271–8510 千葉県松戸市松戸648

⁴国立科学博物館植物研究部 〒305–0005 茨城県つくば市天久保4–1–1

Community of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Fukiage Garden Forest of the Imperial Palace

Masahide Yamato^{1*}, Yuka Nakazato², Ryota Kusakabe³ and Kentaro Hosaka⁴

¹Faculty of Education, Chiba University,
1–33, Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263–8522, Japan

*E-mail: myamoto@chiba-u.jp

²Graduate School of Education, Chiba University,
1–33, Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba 263–8522, Japan

³Graduate School of Horticulture, Chiba University,
648 Matsudo, Matsudo-city, Chiba 271–8510, Japan

⁴Department of Botany, National Museum of Nature and Science,
4–1–1 Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305–0005, Japan

Abstract. The community of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi was examined in the Fukiage Garden forest in the Imperial Palace. The AM fungal community was clearly distinguished from those of the Japanese temperate forests studied previously. Some of the dominant AM fungi in the Fukiage Garden forest were phylogenetically closely related to species-described fungi, which contrasts with those in the Japanese temperate forests. Since AM fungal species have been described based on spore morphology, the present result suggests that the dominant AM fungi may have relatively higher spore productivity. The Imperial Palace had been the Edo Castle until the latter half of the 1800s, after which the Fukiage Garden forest was developed. Accordingly, it is likely that the AM fungi with higher sporulation in the past environment may have been retained in the current AM fungal community of the isolated forest.

Keywords: arbuscular mycorrhiza, Fukiage Garden, Glomeromycota, Illumina sequencing, Imperial Palace, MaarjAM, SSU rDNA.

はじめに

多くの陸上植物にみられるアーバスキュラー菌根(AM)共生では、宿主特異性が他の菌根共生に比べて低いことが知られている。一方でAM菌は種あるいは菌株間に機能面での違いがあることが

知られており (van der Heijden *et al.*, 1998; Powell and Rillig, 2018), 多様な陸上生態系とともに様々なAM菌群集が報告されている (Öpik *et al.*, 2010, 2013)。日本の温帯林を対象としたAM菌の群集調査では、根抽出DNAを対象としたAM菌リボソームRNA遺伝子 (rDNA) 小サブユニット領域(SSU)

の部分塩基配列の解析によって、いくつかのAM菌操作的分類群(OTU)が、様々な林地で共通して優占することが報告された(Miyake *et al.*, 2020). この研究では主要OTUのほとんどが既知種の配列とは一致せず、さらにAM菌DNAのデータベース(MaarjAM; Öpik *et al.*, 2010)に対する照合から、これらのAM菌が世界の森林に広く分布していることも明らかにされた。また、Miyake *et al.* (2020)で明らかにされた森林の主要AM菌群の一部は、日本のスギ植林地にも優占していることが確認され(Djotan *et al.*, 2022), さらに、Kusakabe *et al.* (2024)は、これらのAM菌群が林床植物にも優占していることを明らかにした。これらの結果は、未記載のAM菌によって主に構成される森林環境に適性を持つAM菌群の存在を示唆している。

東京の中心に位置し、主に常緑広葉樹によって構成される皇居の吹上御苑の森は、戦後、管理を制限して自然環境の回復を図ってきた。本研究では、この吹上御苑の森においてAM菌群集を調査し、結果を先行研究で明らかにされた日本の温帯林のAM菌群集と比較することによって、吹上御苑の森のAM菌群集の特徴を立地特性と関連づけて考察した。

材料および方法

吹上御苑で1997~1999年に行われた森林植生調査では50 x 50 mの調査区が2カ所(A調査区, B調査区)設定された(近田ら, 2000)。本研究ではモチノキ、イチヨウ、タブノキ、ムクノキなどのAM菌共生樹種が多く見られるA調査区を試験地とし、2021年8月12日、調査区内に南東から北西にかけて50 mのトランセクトを設置し、5 mごとに10のサンプリング点(FG-01, FG-03, FG-04, FG-05, FG-06, FG-07, FG-08, FG-09, FG-10, FG-11)を定めた(1点FG-02は、遊歩道上のためスキップした)。各サンプリング点で、リターを取り除いた後、ステンレス管を使用して土壌コア(直径5 cm, 深さ10 cm)を採取し、得られたすべての細根(約200~800 mg, 生重)を植物とAM菌の分子同定に供試した。

採取した細根からDNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用いて全DNAを抽出し、Nextera Transposase Adapter Readsを5'末端に付加した2組のプライマーセット【ITS2F/ITS3R (Chen *et al.*, 2010)およびAMV4.5NF/AMDGR (Sato *et al.*, 2005)】を用いた1st

PCRを行い、植物のITS2 rDNAとAM菌のSSU rDNAをそれぞれ増幅した。各PCR産物についてNextera XT Index Kit (Illumina)を用いた2nd PCRを行った後、シーケンシングサービス(Rhelixa)を利用してIllumina NovaSeq 6000による2 x 250 bpのペアエンドリードを実施した。得られたDNA塩基配列のFASTQ形式ファイルはDDBJ配列アーカイブ(DRA)に寄託した(PRJDB19865)。

FASTQファイルに対する解析は、QIIME 2 ver. 2024.2 (Bolyen *et al.*, 2019)を用いて実施した。植物のITS2 rDNA配列について、プライマー配列を、cutadaptプラグイン(Martin, 2011)を用いてトリミングした。一部の配列でペアエンド配列がマージされなかったため、アンプリコン配列バリエーション(ASV)は、DADA2プラグイン(Callahan *et al.*, 2016)を使用して順方向配列からのみ生成した。さらにこのASVをVSEARCHプラグイン(Rognes *et al.*, 2016)のcluster-features-de-novoコマンドで97%の類似性閾値を使用してOTUにクラスター化した。非植物OTUを除去した後、QIIME 2用にフォーマットされた国立バイオテクノロジー情報センターの植物ITS2 rDNAデータセット(Dubois *et al.*, 2022)を用いて、各OTUを植物の科に割り当てた。

AM菌のSSU rDNA塩基配列についても、同様にcutadaptプラグインを使用してプライマー配列をトリミングし、DADA2プラグインを用いてペアエンド配列をマージし、ASVを生成した。また、日本の8カ所の温帯林(栃木県船生、千葉県白井、神奈川県・足柄、真鶴、滋賀県大津、三重県平倉、岡山県蒜山、鹿児島県川内)から取得されたAM菌SSU rDNAのFASTQファイル(PRJDB8935)をダウンロードした(Miyake *et al.*, 2020)。このAM菌SSU rDNAは、本研究と同じプライマーを使用して増幅され、Ion PGM (Life Technologies)によって配列決定されたものである。

吹上御苑の森と日本の8カ所の温帯林から得られた2つのASVデータセットを組み合わせ、97%の類似性閾値に基づいてOTUにクラスター化し、10リード以下のOTUを削除した後、SILVA 138 (Quast *et al.*, 2013; Robeson *et al.*, 2021)を用いて分類した。classify-sklearnを使用して非AM菌OTUを除去した後、計1,383,268リードが132 OTUに区分されたが、Rのvegan package version 2.6.8 (Oksanen *et al.*, 2022)の「rrarefy」によって、すべてのサンプルを1,037リードに希薄化したところ、OTU数

は124となり、これらのOTUについて、検出サンプル数の降順に番号を付けた。このうち、吹上御苑由来のOTUは計40となっていた。

Phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013)のplot_heatmap関数を使用して、サンプル検出数の多い上位50のOTUの相対リード数に基づいてヒートマップを作成した。また、根サンプルのAM菌124 OTUの構成に対するBray-Curtis指数 (β 多様性) を非計量多次元尺度構成法(NMDS)によって視覚化した。吹上御苑由来の40 OTUのうち、希薄化後のリード数全体の1%を超える18の主要OTU (TABD01000001~TABD01000018) を、AM菌DNAデータベース MaarjAM (Öpik *et al.*, 2010)の仮想分類群 (VTX) に割り当て、特にリード数の多かったOTUが対応するVTXについては、MaarjAMの「生態系」の分類に記載されている説明に従って生態学的分布を調査した。この18 OTUの部分的SSU rDNA塩基配列について、近縁な既知種のAM菌SSU rDNAをGenBankデータベースからダウンロードし、さらに、Krüger *et al.* (2012)のSSU rDNAのデータセットにおける各属の代表配列をWebサイト amf-phylogeny.com (<http://www.amf-phylogeny.com>)からダウンロードした。このデータセットに対してMAFFT 7.525 (Katoh and

Standley, 2013)を用いて配列アライメントを実施し、GTR+G4を最適モデルとして、RAxML-NGバージョン 1.2.0 (Kozlov *et al.*, 2019)を使用した最尤法による分子系統解析を実施した。

結 果

植物ITS2 rDNA配列は、10サンプルから計656,543リードが得られ、136 OTUに区分された。これらのOTUは主に8つの科 (モチノキ科、アサ科、ミズキ科、ブナ科、イチョウ科、クスノキ科、ヤナギ科、ムクロジ科) に分類され (図1)、その構成はサンプリング点周辺の樹種を概ね反映していた。

AM菌の上位50 OTUのヒートマップ (図2) と、計124のOTU組成に対するBray-Curtis指数に基づくNMDSプロット (図3) は、いずれも吹上御苑と先行研究 (Miyake *et al.*, 2020)における日本の温帯林との間のAM菌群集の違いを明確に示した。

吹上御苑からは40 OTUが得られ、希薄リード全体の1.0%以上を有するOTUを選択したところ、18 OTUが主要OTUとして選抜された。この18 OTUのうち、15 OTUが MaarjAM のVTXに割り当てられ、OTU 16と37では、それぞれに2つの

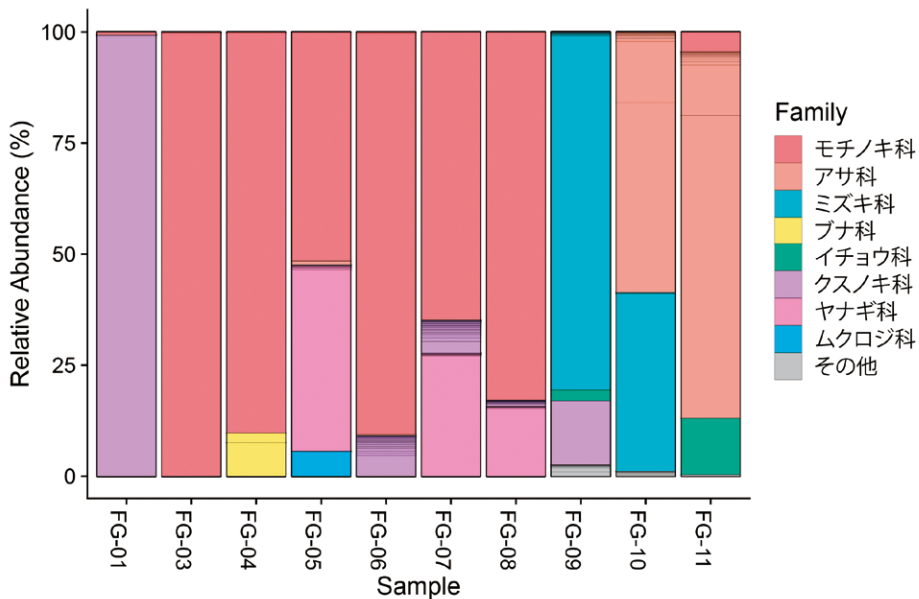


図1. 吹上御苑の森から採取した根サンプル (FG-01, FG-03, FG-04, FG-05, FG-06, FG-07, FG-08, FG-09, FG-10, FG-11) から得られたITS2 rDNAの植物科ごとのリード数 (%)を示すバースプロット。

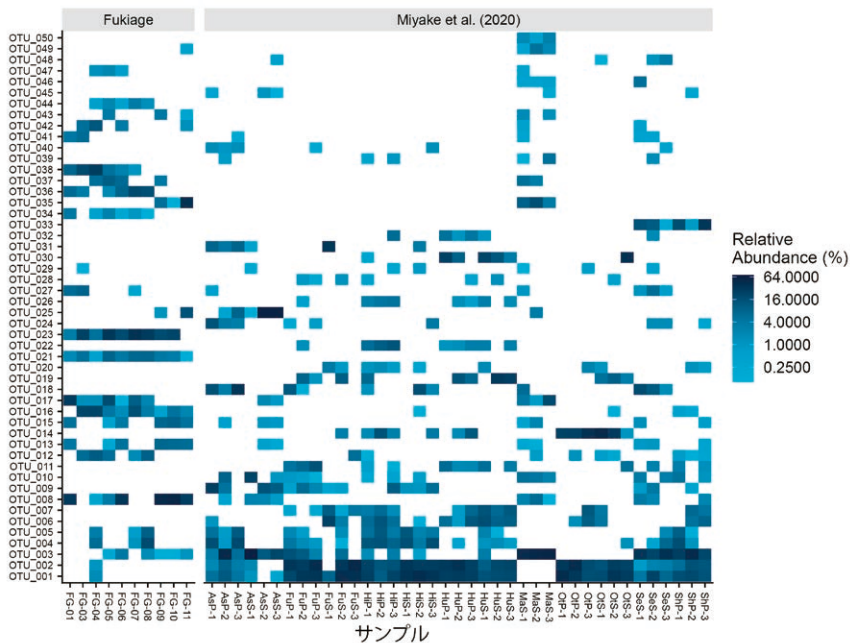


図2. 吹上御苑の森と日本の8カ所の温帯林（栃木県船生，千葉県白井，神奈川県・足柄，真鶴，滋賀県大津，三重県平倉，岡山県蒜山，鹿児島県川内；Miyake *et al.* 2020）から得られた部分的SSU rDNAの相対リード数(%)に基づくAM菌OTUのヒートマップ。リード数の多い上位50 OTUの結果を示す。FG:吹上御苑，AsP:足柄ヒノキ植林地，AsS:足柄二次林，FuP:船生ヒノキ植林地，FuS:船生二次林，HiP:平倉ヒノキ植林地，HiS:平倉二次林，HuP:蒜山ヒノキ植林地，HuS:蒜山二次林，MaS:真鶴二次林，OtP:大津ヒノキ植林地，OtS:大津二次林，SeS:川内二次林，ShP:白井ヒノキ植林地。

VTXが割り当てられた(Table 1)。また，系統解析の結果，主要18 OTUの代表的な配列は，グロムス科(15 OTU)，アカウロスボラ科(2 OTU)，ギガスボラ科(1 OTU)に区分された(図4)。また，3 OTU(OTU 8, 16, 38)の代表配列は，既知種の配列と高い相同性を有し(図4)，これらは，それぞれ1番目，3番目，4番目のリード数を有するOTUだった(Table 1)。

考 察

吹上御苑のA調査区において検出された40 OTUからなるAM菌群集は，先行研究(Miyake *et al.*, 2020)における日本の温帯林のAM菌群集とは明確に区別された。この先行研究では，主要なAM菌のほとんどは未記載種である可能性が高く，AM菌の種の記載は孢子形態と分子系統解析に基づいているため，森林内のAM菌群集は比較的孢子の生産性が低い種で構成されている可能性が考えられる。植物の根は常に森林土壤に存在するた

め，特に安定した森林環境では，AM菌の孢子生産性が低いのもかもしれない。対照的に，吹上御苑の森における主要AM菌OTUの一部は，既知種のAM菌に近縁な菌と同定された。

吹上御苑の森でリード数の多かったOTU 8, 23, 16について，対応するMaarjAMのVTX 222, 39, 41を検索したところ，これらのAM菌はゴム農園や熱帯および亜熱帯林で検出されていた。吹上御苑の森の植生は，暖温帯特有の常緑広葉樹種が優勢であるため，これらのAM菌は暖温帯の植生タイプに適性を持っている可能性が考えられる。また，OTU 8と16に対応するVTX 222と39は農地でもしばしば検出されている。孢子形成は農地の休閑期間中におけるAM菌の生残に必須であると考えられることから，この結果は，吹上御苑の森に分布するAM菌の一部が，Miyake *et al.* (2020)によって報告された日本の森林で報告されたAM菌群と比較して，高い孢子生産性をもつ可能性を示唆している。皇居は1800年代後半まで江戸城だったが，その後，さまざまな環境を経て，吹上御苑の

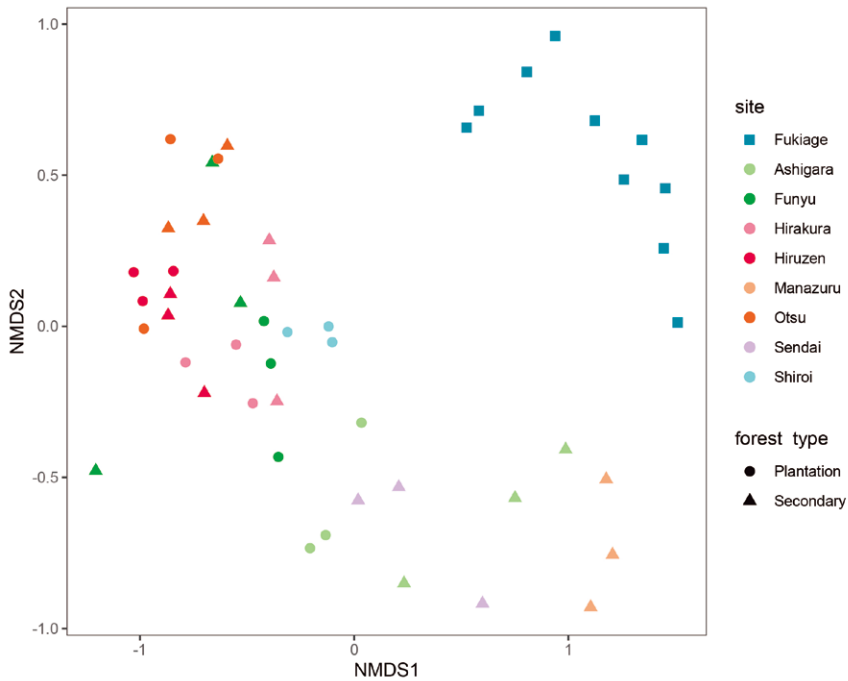


図3. 吹上御苑の森と日本の8カ所の温帯林（栃木県船生，千葉県白井，神奈川県・足柄，真鶴，滋賀県大津，三重県平倉，岡山県蒜山，鹿児島県川内；Miyake *et al.* 2020）から得られたアーバスキュラー菌根菌OTU組成のBray-Curtis指数（β多様性）を非計量多次元尺度構成法(NMDS)によって視覚化したプロット図。日本の8カ所の温帯林のサンプルは、植林地（○）と二次林（△）から採取した。

Table 1. 吹上御苑の森の各サンプルから得られた主要AM菌OTUのリード数。希釈化後の総リード数の1.0%を超える18OTUを主要OTUとし、対応するMaarjAMのVTXとAM菌の科(Glomeraceae (Glo), Gigasporaceae (Gig), Acaulosporaceae (Aca))を併せて示した。

Sample	AM fungal OTUs																	
	8	23	16	38	17	36	35	21	12	15	13	4	37	42	25	27	5	41
Sample	MaarjAM VTXs																	
	222	39	227	217	270	64		24	125		219	212	72	64	210	219	288	
Sample	AM fungal families																	
	Glo	Glo	Gig	Aca	Glo	Glo	Glo	Glo	Aca	Glo	Glo	Glo	Glo	Glo	Glo	Glo	Glo	Glo
FG-01	294	32	0	82	302	66	0	19	0	52	42	0	0	0	0	65	0	42
FG-03	0	246	216	199	14	35	0	52	63	0	0	0	0	56	0	87	0	64
FG-04	3	51	228	286	15	0	0	5	111	0	0	63	57	129	0	0	32	0
FG-05	37	339	44	51	185	20	0	83	60	4	2	0	102	0	0	0	0	0
FG-06	347	188	16	26	1	84	0	40	0	40	52	0	66	36	0	0	0	0
FG-07	0	396	167	11	98	200	0	75	18	0	0	12	0	0	0	3	7	0
FG-08	0	300	35	0	23	160	0	79	96	0	0	195	0	0	0	0	99	0
FG-09	497	187	4	0	0	0	57	41	0	79	80	0	38	0	12	0	0	0
FG-10	566	219	48	0	0	0	1	35	0	95	69	0	0	0	0	0	0	0
FG-11	266	0	22	0	0	0	408	1	0	49	62	0	0	14	151	0	0	0
	2010	1958	780	655	638	565	466	430	348	319	307	270	263	235	163	155	138	106

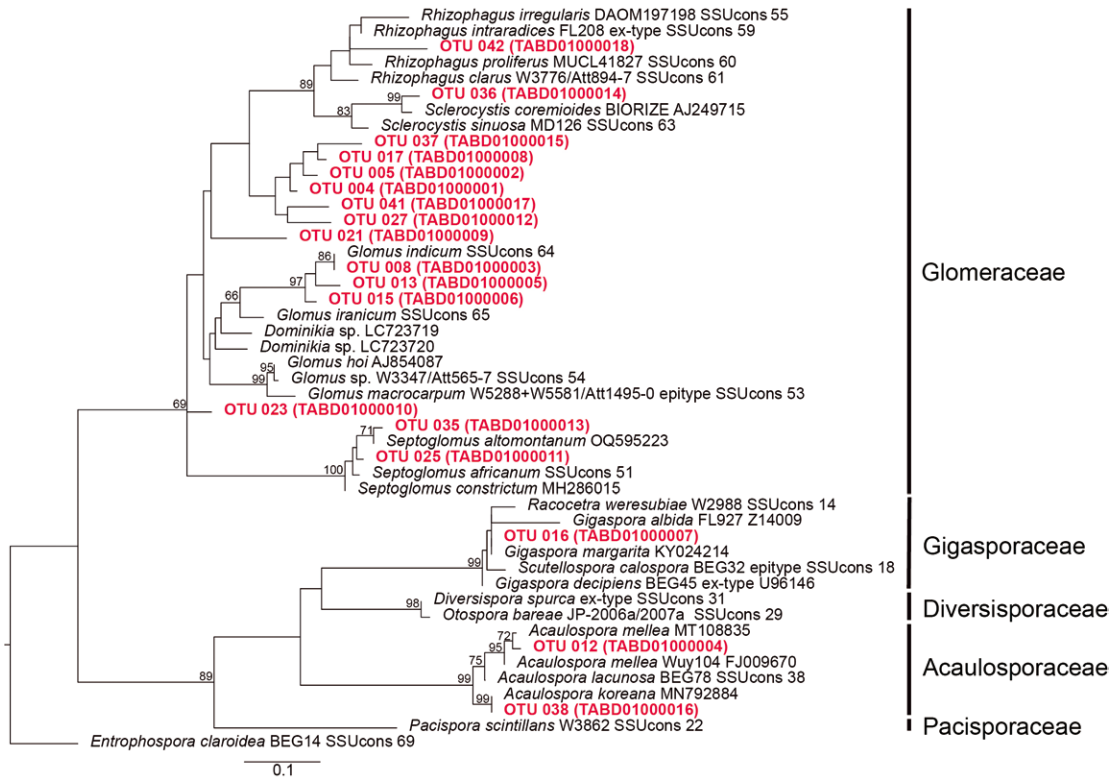


図4. アーバスキュラー菌根菌の部分的 SSU rDNA 塩基配列に基づく最尤系統樹。本研究で吹上御苑の森から得られた希釈化後のリード数全体の >1.0% を占める OTU の代表的な配列と、GenBank および Krüger *et al.* (2012) の SSU rDNA のデータセットからダウンロードされた既知種の配列で構成される。分枝上の数値はブートストラップ値 (60% 以上) を示す。

森が形成された。このような経緯のもと、過去の植生で孢子形成量の多かった AM 菌が、孤立した吹上御苑の森の現在の AM 菌群集に残っているのではないと思われる。調査区の樹木はいずれも旺盛に生育しており、AM 菌群集が過去の植生の影響を受けたとしても、植物の成長には特に悪影響はないように思われる。

尚、本研究の詳細については Yamato *et al.* (2025) に発表済みである。

謝 辞

本調査の実施に便宜を図っていただいた宮内庁管理部庭園課にお礼申し上げます。

引用文献

- Bolyen, E., J. R. Rideout, M. R. Dillon, N. A. Bokulich, C. C. Abnet, G. A. Al-Ghalith, H. Alexander, E. J. Alm, M. Arumugam, F. Asnicar, Y. Bai, J. E. Bisanz, K. Bittinger, A. Brejnrod, C. J. Brislawn, C. T. Brown, B. J. Callahan, A. M. Caraballo-Rodríguez, J. Chase, E. K. Cope, R. Da Silva, C. Diener, P. C. Dorrestein, G. M. Douglas, D. M. Durall, C. Duvallet, C. F. Edwardson, M. Ernst, M. Estaki, J. Fouquier, J. M. Gauglitz, S. M. Gibbons, D. L. Gibson, A. Gonzalez, K. Gorlick, J. Guo, B. Hillmann, S. Holmes, H. Holste, C. Huttenhower, G. A. Huttley, S. Janssen, A. K. Jarmusch, L. Jiang, B. D. Kaehler, K. B. Kang, C. R. Keefe, P. Keim, S. T. Kelley, D. Knights, I. Koester, T. Kosciolk, J. Kreps, M. G. I. Langille, J. Lee, R. Ley, Y.-X. Liu, E. Loftfield, C. Lozupone, M. Maher, C. Marotz, B. D. Martin, D. McDonald, L. J. McIver, A. V. Melnik, J. L. Metcalf, S. C. Morgan, J. T. Morton, A. T. Naimey, J. A. Navas-Molina, L. F. Nothias, S. B.

- Orchanian, T. Pearson, S. L. Peoples, D. Petras, M. L. Preuss, E. Pruesse, L. B. Rasmussen, A. Rivers, M. S. Robeson II, P. Rosenthal, N. Segata, M. Shaffer, A. Shiffer, R. Sinha, S. J. Song, J. R. Spear, A. D. Swafford, L. R. Thompson, P. J. Torres, P. Trinh, A. Tripathi, P. J. Turnbaugh, S. Ul-Hasan, J. J. J. van der Hooft, F. Vargas, Y. Vázquez-Baeza, E. Vogtmann, M. von Hippel, W. Walters, Y. Wan, M. Wang, J. Warren, K. C. Weber, C. H. D. Williamson, A. D. Willis, Z. Z. Xu, J. R. Zaneveld, Y. Zhang, Q. Zhu, R. Knight and J. G. Caporaso, 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, **37**: 852–857.
- Callahan, B. J., P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson and S. P. Holmes, 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, **13**: 581–583.
- Chen, S., H. Yao, J. Han, C. Liu, J. Song, L. Shi, Y. Zhu, X. Ma, T. Gao, X. Pang, K. Luo, X. Li, X. Jia, Y. Lin and C. Leon, 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLOS ONE*, **5**: e8613.
- Djotjan, A. K. G., N. Matsushita and K. Fukuda, 2022. Amplicon sequencing reveals the arbuscular mycorrhizal fungal community composition in *Cryptomeria japonica* at one local site. *Journal of Forest Research*, **27**: 399–407.
- Dubois, B., F. Debode, L. Hautier, J. Hulin, G. S. Martin, A. Delvaux, E. Janssen and D. Mingeot, 2022. A detailed workflow to develop QIIME2-formatted reference databases for taxonomic analysis of DNA metabarcoding data. *BMC Genomic Data*, **23**: 53.
- Katoh, K. and D. M. Standley, 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, **30**: 772–780.
- Kozlov, A. M., D. Darriba, T. Flouri, B. Morel and A. Stamatakis, 2019. RAXML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, **35**: 4453–4455.
- Krüger, M., C. Krüger, C. Walker, H. Stockinger and A. Schübler, 2012. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist*, **193**: 970–984.
- Kusakabe, R., M. Sasuga and M. Yamato, 2024. Ubiquitous arbuscular mycorrhizal fungi in the roots of herbaceous understory plants with hyphal degeneration in Colchicaceae and Gentianaceae. *Mycorrhiza*, **34**: 181–190.
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*, **17**: 10.
- McMurdie, P. J. and S. Holmes, 2013. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLOS ONE*, **8**: e61217.
- Miyake, H., S. Ishitsuka, T. Taniguchi and M. Yamato, 2020. Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in forest ecosystems in Japan's temperate region may be primarily constituted by limited fungal taxa. *Mycorrhiza*, **30**: 257–268.
- Oksanen, J., G. L. Simpson, F. G. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, P. R. Minchin, R. B. O'Hara, P. Solyomos, H. M. Stevens, E. Szöcs, H. H. Wagner, M. Barbour, M. Bedward, B. Bolker, D. Borcard, G. Carvalho, M. Chirico, M. De Cáceres, S. Durand, H. B. A. Evangelista, R. FitzJohn, M. Friendly, B. R. Furneaux, G. Hannigan, M. O. Hill, L. Lahti, D. McGlinn, M.-H. Ouellette, E. R. Cunha, T. W. Smith, A. Stier, C. ter Braak and J. Weedon, 2022. vegan: community ecology package. R package version 2.6–2.
- Öpik, M., A. Vanatoa, E. Vanatoa, M. Moora, J. Davison, J. M. Kalwij, Ü. Reier and M. Zobel, 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytologist*, **188**: 223–241.
- Öpik, M., M. Zobel, J. J. Cantero, J. Davison, J. M. Facelli, I. Hiiesalu, T. Jairus, J. M. Kalwij, K. Koorem, M. E. Leal, J. Liira, M. Metsis, V. Neshataeva, J. Paal, C. Phosri, S. Põlme, Ü. Reier, Ü. Saks, H. Schimann, O. Thiery, M. Vasar and M. Moora, 2013. Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, **23**: 411–430.
- Powell, J. R. and M. C. Rillig, 2018. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem function. *New Phytologist*, **220**: 1059–1075.
- Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies and F. O. Glöckner, 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, **41**: D590–D596.
- Robeson, M. S., II, D. R. O'Rourke, B. D. Kaehler, M. Ziemski, M. R. Dillon, J. T. Foster and N. A. Bokulich, 2021. RESCRIPt: Reproducible sequence taxonomy reference database management. *PLOS Computational Biology*, **17**: e1009581.
- Rognes, T., T. Flouri, B. Nichols, C. Quince and F. Mahé, 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for

- metagenomics. *PeerJ*, **4**: e2584.
- van der Heijden, M. G. A., J. N. Klironomos, M. Ursic, P. Moutoglis, R. Streitwolf-Engel, T. Boller, A. Wiemken and I. R. Sanders, 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, **396**: 69–72.
- Yamato, M., Y. Nakazato, R. Kusakabe and K. Hosaka, 2025. Community of arbuscular mycorrhizal fungi in a broad-leaved forest in the Fukiage Garden of the Imperial Palace, Tokyo Japan. *Mycoscience*, **66**: 189–194.
- 近田文弘・西川 肇・藤井寿生・工藤勝輝・村井 宏・伊藤忠夫, 2000. 皇居吹上御苑の森林植生. 国立科学博物館専報, No. **34**: 51–71.