

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658012

研究課題名（和文）自然栽培リンゴ樹の自然免疫獲得機構と葉・根圏微生物相互作用の大規模塩基配列解析

研究課題名（英文）Large scale sequencing analysis of microbial diversity in phyllo- and rhizo-spheres of apple trees for investigation of the mechanism to acquire natural immunity under natural farming practices

研究代表者

佐野 輝男 (SANO TERUO)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：30142699

研究成果の概要（和文）：無農薬・無肥料（堆肥含む）の自然農法で30年近く継続して栽培管理されているリンゴ樹の一部に顕著な病害虫発生抑制現象が観察される事例が知られている。長期間の自然農法栽培実践の過程でリンゴ樹に未解明の獲得自然免疫現象が生じて病害虫耐性を獲得した可能性が示唆されているが、科学的な検証が必要である。本研究はこのリンゴ園を含む自然農法栽培園と慣行防除園の合計4園を対象として、リンゴ樹葉圏と根圏の微生物群の多様性とその特徴を次世代シーケンサーによる大規模塩基配列解析で分析し、微生物群の多様性とその適応・進化の観点から、微生物種の存在によって宿主植物が自然免疫を獲得する可能性について科学的な解析と評価を試みたものである。

まず葉圏の真菌では、全ての園地で菌類は *Aureobasidium pullulans*、*Cladosporium tenuissimum*、*Cystofilobasidium macerans*、*Cryptococcus victoriae* などが生息し、自然農法栽培園ではそれに加えて *Venturia inaequalis*（黒星病菌）、*Alternaria mali*（斑点落葉病菌）、*Diplocarpon mali*（褐斑病菌）等の病原菌も検出された。病害虫発生抑制現象が見られる自然農法栽培 K 園では他の3園で最優占種であった *Aureobasidium* が有意に少ない特徴が見られた。K 園の最優占種は *Cladosporium* と病原菌の *Venturia* であったが、慣行栽培園と類似した少数の微生物種（2-3種）が寡占するパターンを示した。一方、2年前に K 園を模倣して自然農法栽培に転換したばかりの MS 園ではより多数（4-5種）の微生物種が拮抗して生息していた。葉圏の細菌は、どの園地でも *Sphingomonas echinoides*、*Methylobacterium radiotolerans*、*Pseudomonas syringae* などが優占して生息していた。各園地とも6月の細菌類生息量は極めて少なかったが、自然農法栽培2園では8月に種数と生息量が20倍以上に増加し、慣行栽培園ではほとんど変化しなかった。慣行栽培園では化学農薬散布により細菌の生息が大きく制限されている状況が明らかになった。自然農法栽培2園（K園とMS園）の8月の細菌種の多様性を解析した結果、門或は属のレベルで多様度には大きな違いは見られず、生息する細菌類の多様性だけで病害虫発生抑制を説明できないことが判明した。個々の種に注目すると、K園では *Pseudomonas* 属、MS園では *Pantoea* 属の生息量が有意に豊富であった。

次に根圏の真菌では、自然農法栽培 K 園で50属、慣行防除 O 園で55属が検出された。K 園では *Emericella*、*Fusarium*、*Mortierella*、*Cordyceps*、*Leohumicola* の順に、O 園では *Fusarium*、*Cryptococcus*、*Dipodascus*、*Leohumicola*、*Mortierella* の順に多数検出された。根圏細菌では、K 園で327属、O 園で356属が検出され、K 園では *Nirospira*、*Bradyrhizobium*、*Cupriavidus*、*Burkholderia*、*Pseudomonas* の順に、O 園では *Nirospira*、*Bradyrhizobium*、*Ktedonobacter*、*Bacillus*、*Methylosinus* の順に多数検出された。真菌、細菌共に優占種には明らかな違いが認められ、慣行防除 O 園の種類が若干多様であった。

調査リンゴ園に自生しているナズナを採集し、ポリ A-RNA を調製して次世代シーケンサーによる大規模塩基配列解析を行ない、得られたデータをシロイヌナズナ DNA データベースに登録された遺伝子と照合して、自然農法栽培 K 園と慣行防除園間における各遺伝子の発現頻度の違いを可視化するプログラムを試作した。

研究成果の概要（英文）：It is known that apple trees in an orchard managed under natural farming practices for more than 30 years without applying chemical fertilizer and pesticide exhibit prominent disease suppression effect. It is suggested that such a long years of natural farming practices in the orchard might have incited unknown phenomena in which some of the trees have

acquired natural immunity preventing them from severe disease damages, however, science-based analysis is essential. In this research, we have performed large-scale sequencing analysis using next generation DNA sequencer on the microbial diversity of phyllosphere and rhizosphere of apple trees managed under natural and conventional farming conditions, and evaluated how microbial diversity in the orchard plays important roles on the induction of natural immunity in the plants.

From analysis of fungi in the phyllosphere, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium tenuissimum*, *Cystofilobasidium macerans*, *Cryptococcus victoriae* were predominated in all the four orchards, and *Venturia inaequalis* – the causal pathogen of apple scab, *Alternaria mali* – alternaria blotch, and *Diplocarpon mali* – marsonina blotch, were also detected from the two natural farming orchards. It was noted that *Aureobasidium* – the most predominant fungal inhabitant in the other three orchards, were significantly less abundant in the natural farming orchard K where a certain disease suppression phenomenon was prominent. Although the most predominant species in the orchard K was *Cladosporium* or *Venturia*, but not *Aureobasidium*, relatively small numbers (2-3 species) of fungi was predominated in the orchard K, as well as the two conventional farming orchards O and MK. In contrast, more diverse fungal species (4-5) were inhabiting in the other natural farming orchard MS, where the natural farming practices similar to K has just started two years before and has not yet reached the stable level as K in the disease suppression. From the analysis of bacteria in the phyllosphere, *Sphingomonas echinoides*, *Methylobacterium radiotolerans*, and *Pseudomonas syringae* were predominating. The diversity and abundance of bacterial species were jumped up in August in the two natural farming orchards K and MS; i.e, the number of species (or sequences) increased more than 20-times in August comparing to June. Since the diversity as well as the abundance was not increased in the two conventional farming orchards O and MK, it was suggested that abundance of non-pathogenic bacterial inhabitants in the phyllosphere was severely restricted by chemical fungicide sprays. Comparative analysis on the bacterial diversity revealed that statistically significant difference was not observed in the two natural farming orchards K and MS in August, suggesting that microbial diversity in the phyllosphere was not the key factor to induce disease suppression observed only in orchard K. It was noted that the genus *Pseudomonas* and the genus *Pantoea* was abundant in orchard K and MS, respectively.

Next, from the analysis of fungi in the rhizosphere, 50 and 55 genera were detected in the natural farming orchard K and the conventional farming orchard O, respectively. The genera *Emericella*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Cordyceps*, and *Leohumicola* orderly predominated in the orchard K, and *Fusarium*, *Cryptococcus*, *Dipodascus*, *Leohumicola*, and *Mortierella* in the orchard O. From the analysis of bacteria in the rhizosphere, 327 and 356 genera were detected in the orchards K and MS, respectively. The genera *Nirospira*, *Bradyrhizobium*, *Cupriavidus*, *Burkholderia*, and *Pseudomonas* orderly predominated in the orchard K, and *Nirospira*, *Bradyrhizobium*, *Ktedonobacter*, *Bacillus*, *Methylosinus* in the orchard O. The predominant bacterial inhabitants were apparently different between the two orchards.

Furthermore, we have collected *Nazuna* () naturally growing in the orchards K and O, extracted poly-A RNAs, and used for the large-scale sequencing analysis using next generation DNA sequencer. The sequence data obtained were refer to those in Arabidopsis cDNA Library in the public DNA data bank, and successfully visualized the differential expression of each genes between those obtained from the orchard K and the orchard MS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：葉圏微生物、根圏微生物、大規模塩基配列解析、自然栽培、病害虫発生抑制

1. 研究開始当初の背景

農作物、特に果樹類の栽培には病害虫防除が必須で、防除暦を基準に定期的な農薬散布で予防する防除体系が確立されている。しかし、近年、環境への配慮と食の安全に対する意識の高まりにより、化学農薬の使用を削減することが求められている。一方、古くから化学農薬・化学肥料に頼らない自然農法の考え方に基づいた栽培の実践も根強く、いくつかの成功例も知られるようになったが、近年、自然農法と呼ばれる農薬や肥料を一切使用しない栽培法で、今まで考えられない程、病害虫の被害を抑制することに成功した例が報告され、注目を集めている。

申請者は、自然農法を30年近くにわたって実践しているリンゴ園を対象として、数年来、その病害虫発生状況と葉面微生物相の多様性を調査・分析してきた。その結果、確かに、化学農薬を中心とした慣行防除園とは全く異なる機構で、病害虫被害が有意に抑制される現象が存在することを認めた。しかし、そこには極めて多数の要因が複雑に絡み合った高次の生命現象が存在し、現時点において、この現象を科学的に説明することは困難で、新たな視点からの科学的分析データの蓄積が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、この自然農法栽培リンゴ園で見られる特異な病害虫発生抑制現象を科学的に分析するための指標と手法を検討し、この現象を科学的に説明するための関連の基礎情報を収集することを目的として実施した。

すなわち、このリンゴ樹に見られる病害虫発生抑制状態にはいわゆる植物に生来的に備わった自然の病害抵抗力（自然免疫力）が関与し、生育環境（葉圏環境・根圏環境・両園の微生物環境・地力など）と樹体の生理状態（活力など）が高次に結びついて、それぞれが絶妙なバランスに至った時に出現する現象ではないかと考えた。

そのために、樹体の自然免疫力を誘導する要因として葉圏や根圏に生息する微生物群を想定し、根圏・葉圏微生物種の多様性とそれらが刺激となって植物体に誘導される病害抵抗性を、微生物群集及び抵抗性関連遺伝子トランスクリプトームの大規模シーケンス解析という最新の手法で分析・評価するための基礎情報収集し、より発展的な研究推進のための基盤構築を目指すものである。

3. 研究の方法

30年近く継続して無農薬・無肥料（堆肥含む）の自然農法で栽培管理されているリンゴ樹を研究対象として、まず、リンゴ樹葉圏と根圏の微生物群の多様性とその特徴を次世代シーケンサーによる大規模塩基配列解析で分析する。次に、それがリンゴ樹の自然免疫関連遺伝子群の活性化に及ぼす影響を、次世代シーケンサーを用いた大規模塩基配列解析で分析する。

具体的には、研究代表者（佐野）が既に調査中のリンゴ園とその対照園の病害虫発生状況に基づいて、大規模塩基配列解析に最適な時期を選定し、次世代シーケンス解析試料を調製する。1年目は葉圏微生物群、2年目は根圏微生物群とリンゴ樹トランスクリプトームを分析する。得られた大規模塩基配列データを分担者（種田）がバイオインフォマティクスを用いて分析し、代表者及び分担者（柏木）が、自然免疫機構の活性化及び微生物群の適応・進化の観点から解析・評価する。

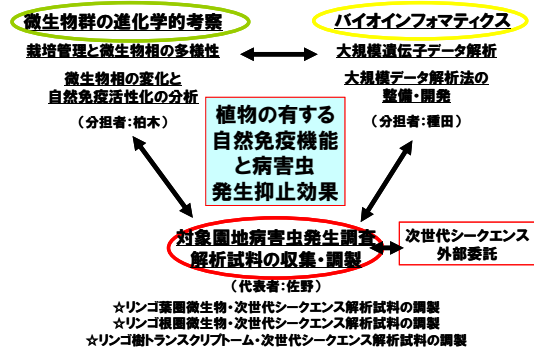


図 1. 研究全体の概略図

A. リンゴ樹葉圏微生物群の大規模塩基配列解析

平成 22 年度

- ① 対象園地（自然農法栽培と慣行栽培）のこれまでの調査結果（研究代表者保有）を基に、病害発生量増加のキーとなる時期・地点を各園地 2 点選定し、リンゴ樹の葉を採集する。
- ② 各試料（合計 4 点）から DNA と RNA を抽出する。
- ③ 抽出した DNA 試料から PCR 法で、菌類はリボソーム DNA-ITS 領域の一部を、細菌類はリボソーム遺伝子の一部を増幅し、シー

クエンス解析試料とする。

④ 解析データからバイオフィオマティクスにより菌類と細菌類の該当遺伝子配列を抽出し、DNA データベースに登録された配列と照合して、各微生物の種類と各シーケンスの検出頻度を分析する。

⑤ 各園地、各試料から分離された微生物の種類と頻度を比較して、対象園地の微生物群の多様性と特徴を明らかにする。

B. リンゴ樹根圏微生物群の大規模塩基配列解析の試料調製準備

平成 22 年度

① 対象園地（自然農法栽培と慣行栽培）の今までの調査結果を基に、病害発生量増加のキーとなる時期・地点を各園地 2 点選定し、リンゴ樹の根圏（主幹から半径 1 メートルの地点）から土壌試料を採集する。

② 各試料（合計 4 点）を前処理した後、DNA と RNA を抽出する。

③ 抽出した DNA 試料から PCR 法で、菌類はリボソーム DNA-ITS 領域の一部を、細菌類はリボソーム遺伝子の一部を増幅し、シーケンス解析試料とする。

平成 23 年度

① 初年度の結果を引き継ぎ、解析データからバイオフィオマティクスにより菌類と細菌類の該当遺伝子配列を抽出し、DNA データベースに登録された配列と照合して、各微生物の種類と各シーケンスの検出頻度を分析する。

② 各園地、各試料から分離された微生物の種類と頻度を比較して、対象園地の微生物群の多様性と特徴を明らかにする。

C. リンゴ自然免疫関連遺伝子群の発現解析；平成 23 年度

① 対象園地（自然農法栽培と慣行栽培）の過去 4 年間の調査結果を基に、病害発生量増加のキーとなる時期・地点から各園地 2 点選定し、リンゴ樹の葉試料を採集する。

② 各試料（合計 4 点）からポリ A-RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを構築し、次世代シーケンスの大規模解析を行なう。

③ 解析データからバイオフィオマティクスにより抵抗性関連遺伝子群、シグナル伝達関連遺伝子群、及びハウスキーピング遺伝子群などの遺伝子配列を抽出し、DNA データベースに登録された配列と照合して、各シーケンスの検出頻度を分析する。

4. 研究成果

A. リンゴ樹葉圏微生物群の大規模塩基配列解析；自然農法栽培 2 園と慣行栽培 2 園、合計 4 園の病害発生状況を定期的（2010 年 5 月～11 月）に観察し、採集した葉からリンゴ葉

圏微生物診断用マクロアレイ法（赫&佐野 2010、He et al 2011）で、時期別の葉面微生物の多様性を分析した。分析結果を基に 6 月 12 日と 8 月 6 日の採集試料を選定し、各園 3 反復、合計 12 サンプルから全 DNA と全 RNA を抽出した。

PCR 法で、菌類はリボソーム DNA-ITS 領域の一部（約 500bp）を、細菌類はリボソーム小サブユニット遺伝子の一部（約 500bp）を増幅し、ノーマルシーケンス（ABI）解析を行なった。PCR 産物をクローニング後、各試料（細菌と真菌で合計 12 サンプル）から 50 個ずつ合計 600 個の cDNA クローンを選抜して、順じ塩基配列を解析し、バイオフィオマティクスにより DNA データベースに登録された菌類と細菌類の該当遺伝子配列と照合し、各微生物の種類とその検出頻度を分析した。その結果、全ての園地から菌類は *Aureobasidium pullulans*、*Cladosporium tenuissimum*、*Cystofilobasidium macerans*、*Cryptococcus victoriae*、細菌は *Sphingomonas echinoides*、*Methylobacterium radiotolerans*、*Pseudomonas syringae* などが優占して検出された。自然農法栽培園では *Venturia inaequalis*（黒星病菌）などの病原菌も検出された。細菌のシーケンス解析からは寒天平板培養法で分離されなかった種、すなわち、マクロアレイに採用しなかった種が複数検出されたが、いずれも検出頻度は低く、葉圏に生息する種の中ではマイナー種と判断された。また、細菌 rDNA 特異的 PCR プライマーセット（Bac-27F & Bac-519M）で葉圏から抽出した DNA を微生物の培養を経ずに直接分析することで、培養できない或は難培養性の真菌、細菌、放線菌などが検出されるのではないかと期待された。しかし、得られたシーケンスの BLAST 解析の結果、上記のもの以外は原核生物型 rDNA を有する植物の葉緑体かミトコンドリア rDNA と一致するものばかりであった。細菌 rDNA の PCR 増幅に一般に使用されている Bac27F と Bac519R プライマーは原核生物由来と考えられている植物の葉緑体或はミトコンドリア rDNA も増幅するので、葉から調製した DNA を使用する場合には注意が必要である。実際に、DDBJ 等の国際的な DNA データベースの中にも「unclutred bacteria」のカテゴリーで明らかに葉緑体或はミトコンドリア由来の DNA が登録されている。大規模シーケンス解析の際にも誤同定のないように細心の注意が必要であることが明らかになった。

そこで次に、同じ DNA 試料を用いて次世代シーケンサー（ロシュ GS FLX）による大規模塩基配列解析を行った。自然農法栽培園と慣行栽培園各 2 園、それぞれ 6 月 12 日と 8 月 6 日の 2 試料、合計 8 試料について、真菌と細菌、各試料約 10,000 リード（平均リ

ード長 500 塩基) のデータを得た。真菌類は既に研究代表者らが開発したリンゴ葉圏微生物診断用マクロアレイ法及びノーマルシーケンス法で分析した結果とよく一致し、どの区でも、*Aureobasidium pullulans*、*Cladosporium tenuissimum*、*Cystofilobasidium macerans*、*Cryptococcus victoriae* などの非病原菌が優占して検出され、自然栽培園ではそれに加えて *Venturia inaequalis* (黒星病菌)、*Alternaria mali* (斑点落葉病菌)、*Diplocarpon mali* (褐斑病菌) なども検出された。検出された真菌類の種数は 20 種程度で 4 つの園地間で種数の多様性に大きな違いはなかったが、慣行栽培 2 園と自然農法栽培 1 園 (K 園) では 2,3 の種が寡占しているのに対し、自然農法栽培 1 園 (MS 園) では数種が拮抗して存在していた。興味深いことに、慣行栽培園と同様に 2,3 種が寡占していた自然農法栽培 K 園は 30 年以上に渡って、無化学肥料・無化学農薬で栽培を継続してある程度の病害虫の発生の抑制に成功している園地であった。ただし、自然農法栽培 2 園では *Aureobasidium* と *Cladosporium* の 2 種が寡占していたのに対して自然農法栽培 K 園で寡占していたのは *Cladosporium* と病原菌の *Venturia* であった。また、自然栽培 K 園では他の園地で最優占する *Aureobasidium* の生息量が有意に少なかった。自然農法栽培 MS 園は 2009 年に慣行栽培から自然農法栽培に切替えた園地で、まだ K 園のように安定した病害虫発生抑制効果の見えない園地である。この園地だけが、他の 3 園と異なる葉面真菌類生息パターンを示したことは興味深い点である。

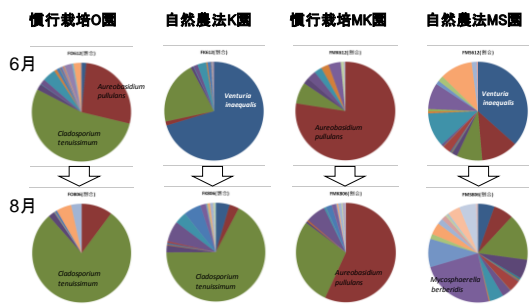


図 2. 葉圏真菌類の生息種数と量の比較解析結果

また、細菌もマクロアレイ及びノーマルシーケンスの結果とよく一致し、*Sphingomonas*、*Methylobacterium*、*Pseudomonas* などが優占し、一部の区で *Bacillus*、*Pantoea* などが検出された。細菌は 6 月 12 日の試料ではどの区も極めて少なく、得られた塩基配列のほとんど (95%以上) は植物の葉緑体或はミトコンドリアに由来するものであった。一方、8 月 6 日の試料では、自然農法栽培 2 園では爆発的に菌量が増加し 6 月 12 日の 20

倍以上の種数が検出された。一方、慣行栽培 2 園では 8 月になっても依然として細菌量は少なく、6 月 12 日とほぼ同じ種数であった。慣行栽培園では化学農薬の散布により細菌生息数に大きな影響が出ていることが明らかになった。

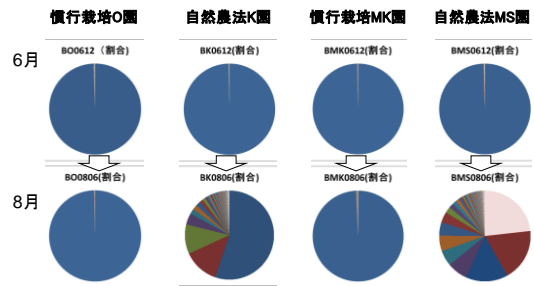


図 3. 葉圏細菌類の生息種数と量の比較解析結果

二つの自然農法栽培園 (K 園、MS 園) で 8 月に豊富な葉面細菌群が検出されたので、種の多様性を分析した結果、両園で多様性に大きな違いは認められなかったが、自然農法栽培 MS 園のほうが若干多様度が高かった。前述のように MS 園では未だに安定した病害虫発生抑制効果が見られていないことから、単純に微生物種の多様性が高いことが病害虫発生抑制効果の要因ではないことが明らかであった

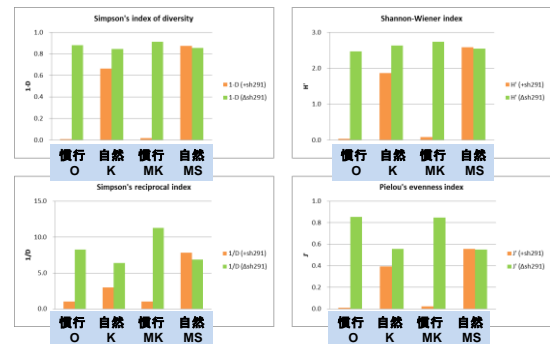


図 4. 葉圏細菌類の多様度の比較解析結果

B. リンゴ樹根圏微生物群の大規模塩基配列解析； 葉圏微生物群で分析したものと同一自然農法栽培 2 園と慣行栽培 2 園、合計 4 園において、2010 年 7 月に各園地 1 樹を選定し、リンゴ樹の根圏 (主幹から半径 1 メートルの地点) から 5 箇所、3 点ずつの土壌試料を採集した。各試料を定法に従って処理後、樹毎に試料を混合し、土壌から高純度の DNA 試料を調製する手法を確立し、各サンプル 3 回ずつ DNA 抽出を行い、各 DNA 試料につき 3 回ずつ PCR 増幅を行った。PCR は、菌類ではリボソーム DNA-ITS 領域の一部 (約 500bp) を、細菌類ではリボソーム小サブユニット遺伝子の一部 (約 500bp) を増幅し、

各増幅量を定量してから、PCR 9 回分の増幅 DNA を等量ずつ混合し、まず、ノーナルシーケンス (ABI) 解析を行なった。PCR 産物をクローニング後、各試料 (細菌と真菌で合計 8 サンプル) から 50 個ずつ合計 400 個の cDNA クローンを選抜して塩基配列を解析し、パイオインフォマティクスにより DNA データベースに登録された該当遺伝子配列と照合し、各微生物の種類とその検出頻度を分析した。その結果、まず真菌では、慣行栽培園では *Ascomycota* (*Cladosporium* sp.)、*Zygomycota* (*Mortierellas* sp.)、*Basidiomycota*、*Chromista*、*Glemoromucota*、*Rhizaria* に属するものが検出され、特に *Ascomycota* が優占していた。自然農法栽培園では *Ascomycota*、*Zygomycota*、*Basidiomycota*、*Viridiplantae*、*Glemoromucota*、*Rhizaria* に属するものが検出され、*Zygomycota* (*Mortierellas* sp.) と *Rhizaria* (*Polymixa graminis*) が多数検出された。両区とも未培養の未知種を含んでいた。一方、細菌では、慣行栽培園では *Acidobacteria*、*Actinobacteria*、*Alpha-proteobacteria*、*Beta-proteobacteria*、*Gamma-proteobacteria*、*Proteobacteria*、*Bacteroidetes/Chlorobi group*、*Caulobacter* sp.、*Chlamydiae/Verrucomicrobia group*、*Gemmatimonadetes*、*Uncultured bacteria* などが検出され、大半が既知登録配列と相同性を示さない未知種であった。自然農法栽培園でも同様に、*Acidobacteria*、*Actinobacteria*、*Gamma proteobacteria* などの他、*Proteobacteria*、*Burkholderia xenovorans*、*Chitinophaga pinensis*、*Comamonadaceae* bacterium、*Nitrosovibrio* sp.、*Ralstonia solanacearum*、*Rhodocyclaceae* bacterium、*Roseomonas* sp.、*Uncultured bacteria* などが検出され、やはり、大半は未知種であった。

そこで次に、葉圏微生物と同様に、上記と同じ DNA 試料を用いて次世代シーケンサー (ロシユ GS FLX) による大規模塩基配列解析を行った。自然農法栽培園と慣行栽培園各 2 園、合計 4 試料について、真菌と細菌、各試料約 10,000 リード (平均リード長 500 塩基) のデータを得た。次に根圏の真菌では、自然農法栽培 K 園で 50 属、慣行防除 O 園で 55 属が検出された。K 園では *Emericella*、*Fusarium*、*Mortierella*、*Cordyceps*、*Leohumicola* の順に、O 園では *Fusarium*、*Cryptococcus*、*Dipodascus*、*Leohumicola*、*Mortierella* の順に多数検出された。根圏細菌では、K 園で 327 属、O 園で 356 属が検出され、K 園では *Nitrospira*、*Bradyrhizobium*、*Cupriavidus*、*Burkholderia*、*Pseudomonas*、*Methylibium*、*Flavobacterium* の順に、O 園では *Nitrospira*、*Bradyrhizobium*、*Ktedonobacter*、*Bacillus*、*Methylosinus*、*Thermosporothrix*、*Methylocystis* の順に多数検出された。真菌、細菌共に慣行

防除 O 園の種類が若干多様であった。優占種にも明らかな違いが認められた。

細菌の属レベルの暫定的な解析結果のみを示した。

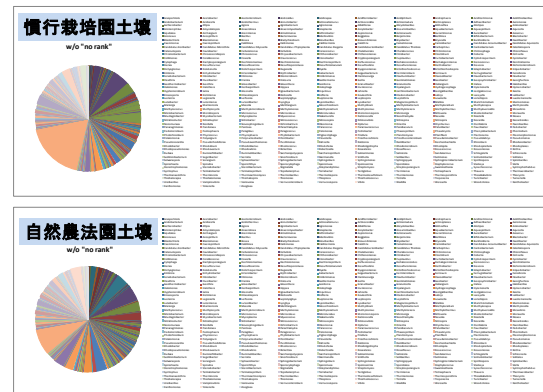


図 5. 根圏細菌の生息種数と量の比較解析結果

C. リンゴ自然免疫関連遺伝子群の発現解析; 自然栽培リンゴ園 K 園に見られる病害虫発生抑制現象を解明するために、特に自然免疫に関わると考えられている抵抗性遺伝子群、シグナル伝達関連遺伝子群及びハウスキーピング遺伝子群などの発現量を比較・分析し、栽培法の違いと関連付けて評価することを最終目的として、上述の葉圏及び土壤微生物群を分析した 4 園地のうち、自然農法栽培 K 園と慣行栽培 O 園を選定し、6 月上旬、7 月上旬、8 月上旬に採集したリンゴ葉からポリ A-RNA を調製し、各リンゴ葉で発現しているメッセンジャー RNA の発現解析を試みた。しかし、リンゴ成葉から高純度のメッセンジャー RNA を調製することが困難で、現時点まで、次世代シーケンサーによる大規模塩基配列解析に耐える cDNA ライブラリーの構築に至っていない。

そこで、一部予定を変更し、モデル実験として、両園に自生するナズナを採集し、ポリ A-RNA を調製して次世代シーケンサーによる大規模塩基配列解析を行った (東京大学・渡辺雄一郎教授、東京農工大学・佐々木信光准教授との共同研究)。得られたデータを基にパイオインフォマティクスによりシロイヌナズナ DNA データベースに登録された遺伝子と照合して、それぞれのリード数を基に各遺伝子の発現頻度を分析し、グラフとして可視化するプログラムを試作した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① He Y-H, Isono S, Shibuya M, Tsuji M, Adkar Purushothama C-R, Tanaka K, Sano T.*

(2012) Oligo-DNA Custom Macroarray for Monitoring Major Pathogenic and Non-Pathogenic Fungi and Bacteria in the Phyllosphere of Apple Trees. PLoS ONE 7(3): e34249. doi:10.1371/ journal.pone.0034249

- ② 藤田有紀, 鴫田美穂, 三浦佑水, 清野佳子, 田中和明, 佐野輝男, 岡部敏弘 (2011) 未利用資源の活用例: バイオ抗菌剤-微粒子化した水溶性青森ヒバ油-を用いたリンゴ腐らん病治療への応用 コンバーテック 2011年2月号 No 455: 101-105.
- ③ 赫英紅, 佐野輝男 (2011) リンゴ葉圏に生息する非病原菌と病原菌の動態—慣行栽培園と有機栽培園の比較—土と微生物 (Soil Microorganisms) Vol. 65: 104~108.

[学会発表] (計7件)

- ① He Y-H, Isono S, Shibuya M, Tsuji M, Shirakawa A, Adkar Purushothama CR, Tanaka K, Sano T.: Oligo-DNA macroarray for monitoring major pathogenic and non-pathogenic fungi and bacteria in the phyllosphere of apple trees managed under organic and conventional cultural conditions, The 2nd Korea-Japan Joint Symposium, March 27, 2012, Fukuoka Internatinal Congress Center, Fukuoka, Japan
- ② 佐野輝男: 奇跡のリンゴ: 有機リンゴ園の葉面微生物及び病原菌の動態. 日本土壤微生物学会 2011年度大会・シンポジウム (招待講演) (宮城県大崎市、鳴子公民館) 2011年11月25日
- ③ 赫英紅・田中和明・伊藤大雄・佐野輝男: リンゴ樹葉圏に生息する病原性および非病原性真菌・細菌類の季節変動のオリゴDNAマクロアレイ解析. 平成23年度日本植物病理学会 (東京・東京農工大学) 2011年3月27日
- ④ 赫英紅・伊藤大雄・田中和明・佐野輝男: オリゴ-DNAマクロアレイ法によるリンゴ葉圏に生息する病原性及び非病原性真菌・細菌のモニタリング. 平成23年度北日本病害虫研究会 (青森市・青森市民ホール) 2011年2月9日
- ⑤ 赫英紅・田中和明・佐野輝男: マクロアレイ法による異なる病害虫管理条件下で栽培されたリンゴ樹の葉圏微生物相の多様性の比較解析 (2009年). 平成22年度日本植物病理学会 京都国際会議場 (京都市) 2010年4月19日
- ⑥ 佐野輝男: 木村園にみるリンゴの病気と害虫発生抑制メカニズムの科学. 木村興農社 講演 (黒石市) 2010年3月18日
- ⑦ 赫英紅・田中和明・佐野輝男: リンゴ葉圏微生物群モニタリングのための真菌・細

菌マクロアレイ解析, 平成21年度日本植物病理学会東北部会 宮城県立大学 (仙台市) 2009年9月29日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/3/plapath/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野輝男 (SANO TERUO)
弘前大学・農学生命科学部・教授
研究者番号: 30142699

(2) 研究分担者

柏木明子 (KASHIWAGI AKIKO)
弘前大学・農学生命科学部・准教授
研究者番号: 40362652

種田晃人 (TANEDA AKITO)
弘前大学・理工学研究科・准教授
研究者番号: 70332492