平成26年11月28日
農環研　研究成果発表会2014

農耕地eDNA データベース（eDDASs）の開発とその活用の方向性

独立行政法人　農業環境技術研究所
生物生態機能研究領域
吉田　重信

本日の内容

- 核酸情報に基づく土壌微生物相解析の必要性
- 土壌微生物相と土壌病害発生との関連
- 農耕地eDNAデータベース（eDDASs）

農地の生産力（地力）

土壌の物理性・化学性・生物性が関係

「今後の環境保全型農業に関する検討会」報告書
（平成20年　農林水産省生産局）より抜粋

2　農地土壌が有する公益的機能と今後の土壌管理のあり方

(1) 農地土壌の現状

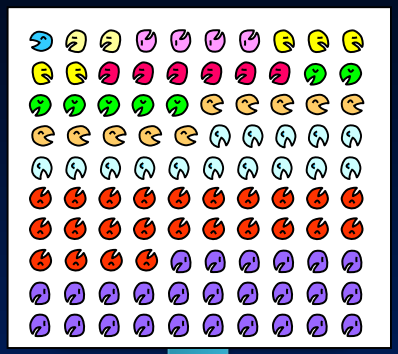
我が国では、特に畑土壌を中心に火山灰土が多く、母材の化学的性質が不良であることに加え、温暖多雨な気候、急峻な地形等の影響で有機物の分解や塩基の流亡等が生じやすく、自然のままでは地力が低い不良土壌が広く分布している。

農地土壌は作物生産の基礎であり、たい肥の施用等による土壌の性質（物理的性質、化学的性質、生物的性質）の改善を通じて地力を増進していくことは、農地の生産力を高め、農業経営の安定化を図る上で極めて重要であることから、「地力増進法」において、土壌の改善目標等を定めた「地力増進基本指針」（以下、「指針」という。）を策定し、たい肥の施用等による土壌改良を進めること等により、生産力の確保を図ってきたところである。

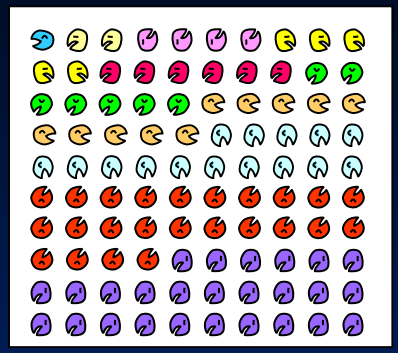
土壌の物理性・化学性は評価できるが、生物性（土壌微生物相）の評価は困難

土壌微生物相の評価の問題点

土壌微生物の培養が困難



核酸（DNA）情報の活用



ほぼ全ての土壌微生物の解析が可能

培養法で調べられる割合

土壌中の核酸（DNA）を用いれば、培養を経ずに土に含まれる微生物に関する情報が得られる

↓

どんな種類の微生物がどのくらいの割合でいるのかが分かる

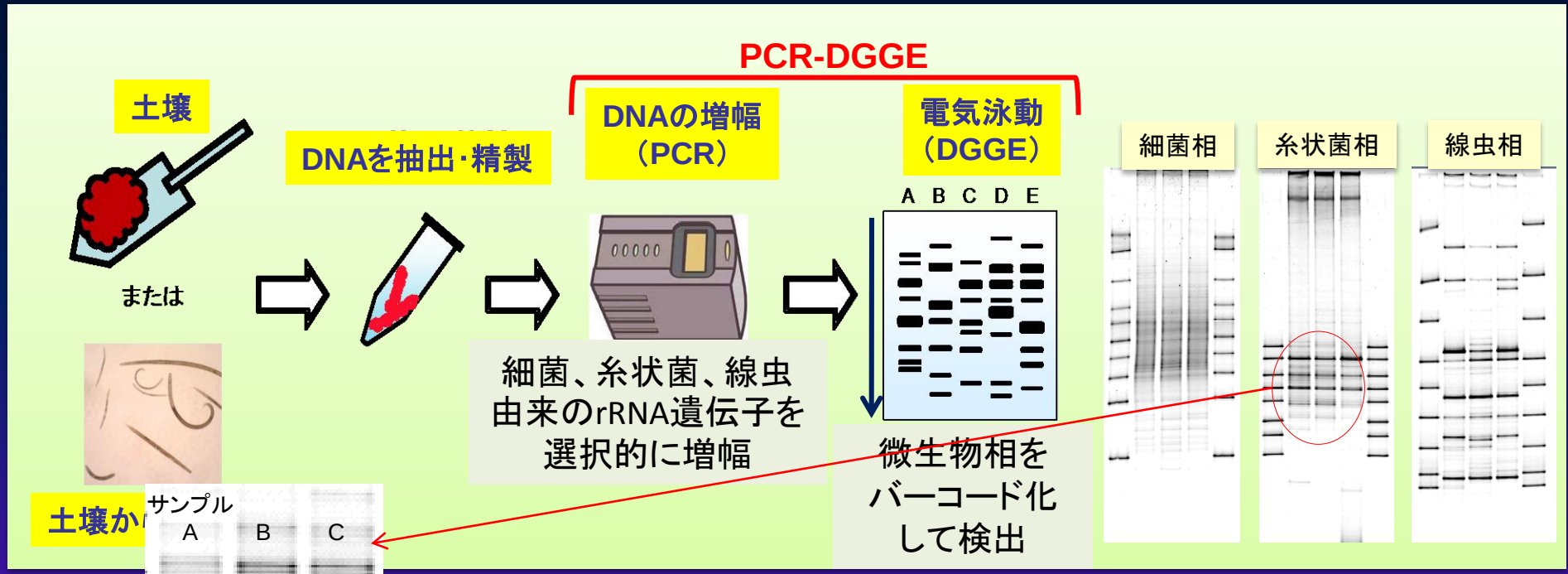
全土壌微生物の1%以下しかわからない

土壌中の核酸情報に基づく解析により、土壌微生物相の解析が可能

核酸情報に基づく土壌微生物相解明のための解析法

PCR-DGGE（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動）法

➡ 土壌微生物相を低コストで俯瞰的に調べられるメリット



バンドの数　⇒ 微生物の種類の豊富さ

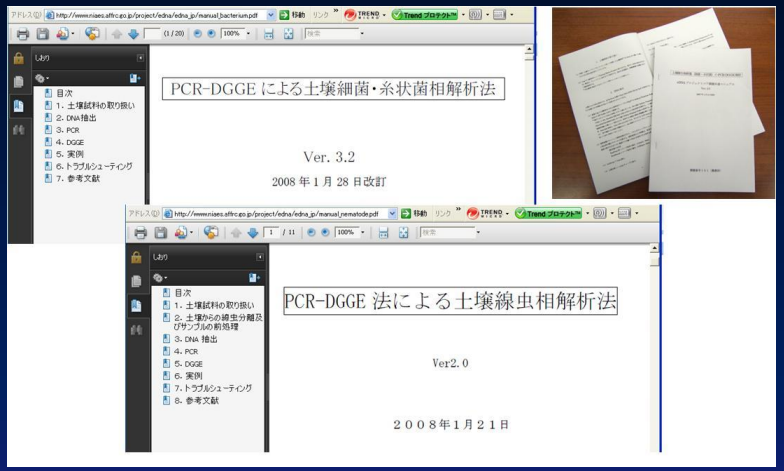
バンドの位置　⇒ 微生物の種類

土壌微生物相と土壌病害

PCR-DGGE法を用いた土壌微生物相の標準的な解析法

H18年～　農水省 eDNAプロ研究の成果
（民間企業も本手法を導入）

PCR-DGGE標準解析マニュアル
（webでダウンロード可能）



土壌微生物相と土壌病害の関連が解明

土壌病害

- 防除が難しく、経済的損失の大きい重要病害
  → 対策技術の開発・充実が必要
- 土壌の理化学性等と関連（pH、土壌水分など）
  → 土壌微生物相との関連？

土壌糸状菌相と土壌病害発生

セルリー萎黄病

土壌消毒後に糸状菌相の多様性が回復しにくい土壌で、発病程度が高くなる傾向

（藤永ら、2012　日植病報）

圃場	根の発病程度	PCR-DGGEによる糸状菌バンドの数		
		消毒前		消毒28日後
A	21．7	10	クロピク処理	8
B	50．0	16		6 → 回復しにくい
C	28．3	8		7
D	43．3	17		4 → 回復しにくい

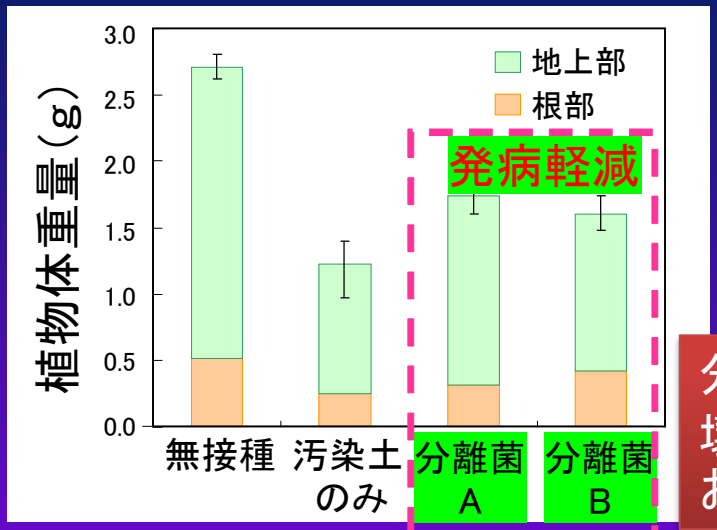
PCR-DGGEバンドと土壌病害発生

トマト褐色根腐病

北海道等で発生・被害大

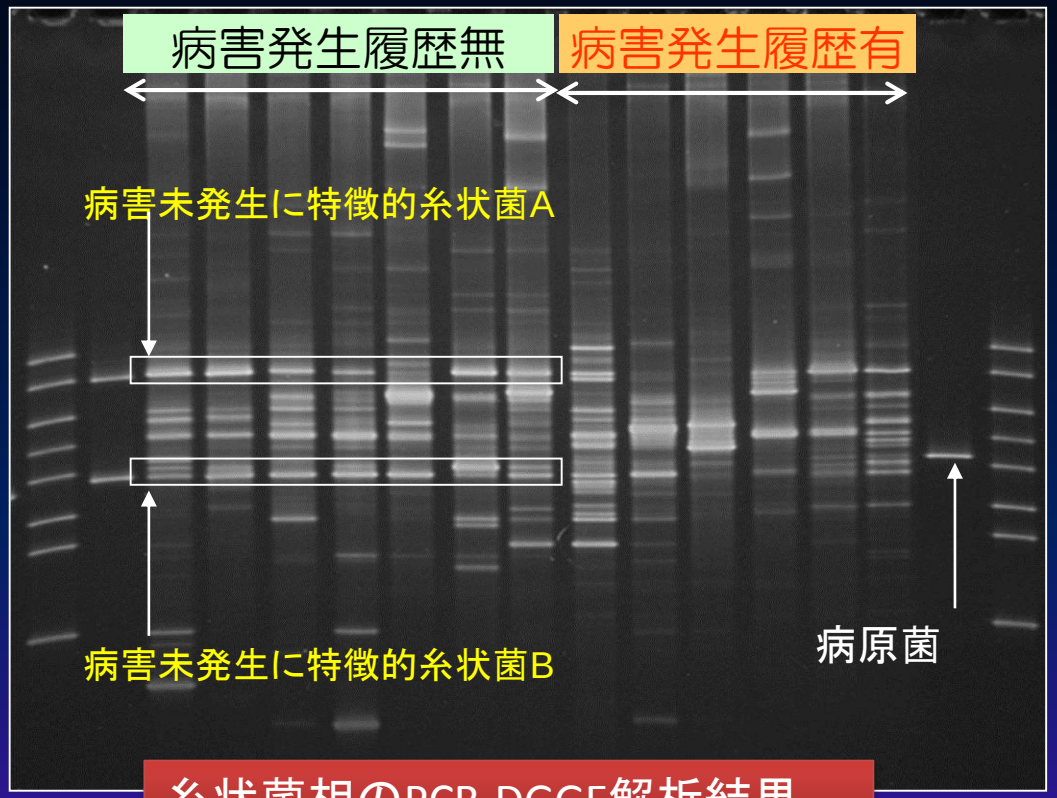
根のコルク化

地上部が萎凋



分離菌A、B混和土壌での栽培トマトにおける植物体重量

（近中四農研　関口、2011 植物防疫）



糸状菌相のPCR-DGGE解析結果

未発生圃場に特徴的な糸状菌バンドが存在、発病抑制に関係

土壌糸状菌相
土壌細菌相
PCR-DGGEバンド
・・・等

関連

土壌病害の発生

土壌微生物相の解析を土壌病害の診断・対策に役立てられるのでは・・？

検証に着手

診断への活用の検証

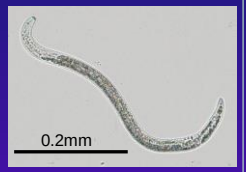
ハクサイ黄化病の総合的な防除に向け、土壌微生物相の解明等により、防除時期や要否判断のための指標を選抜し、その利用可能性を解明

土壌の物理・化学性＋微生物相の解析技術
→　病害診断への適用可能性の検証

ハクサイ黄化病：下葉が黄化、全体が黄化・枯死

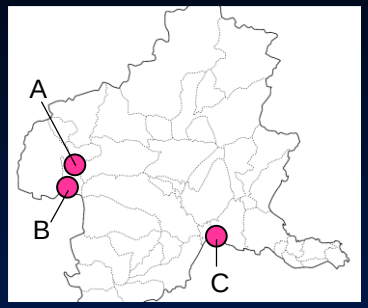
・病原菌：*Verticillium dahliae*
V longisporum

・発病助長生物因子：
キタネグサレセンチュウ
（*Pratylenchus penetrans*）



試験内容

✓ 試験圃場



群馬県内のハクサイ3圃場)、計19試験区(2011、2012栽培年の2年にかけて実施)

土壌採取時期 (2011栽培年の場合)

	前年9月	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9
圃場 A	●			●				●	●	ハクサイ栽培			
										定植		収穫	
B	●			●				●	●				
C		●		●				●					

(● の時期に非根圏土壌を採取)

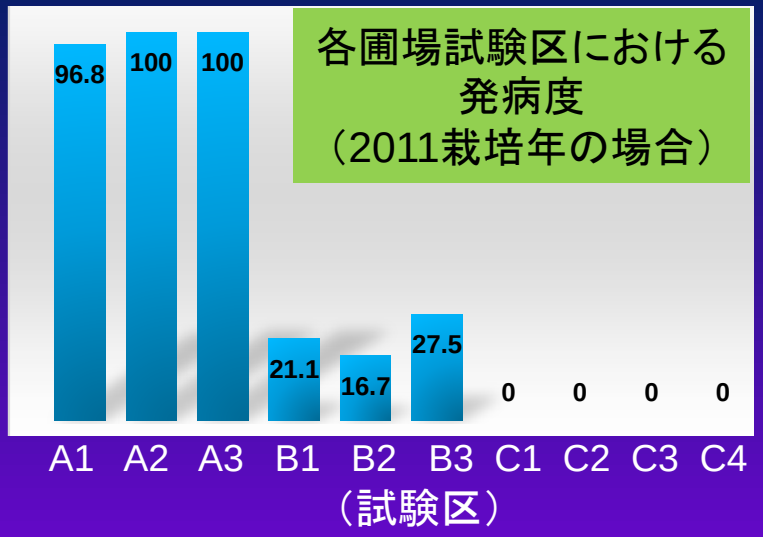
✓ 解析項目

- 糸状菌相
- 細菌相
- 一般線虫相

Shannon-Wiener 多様性指数

- バンドの相対強度
  - 黄化病菌バンド
  - キタネグサレ線虫バンド

各圃場試験区の黄化病の発病程度との相関性を解析

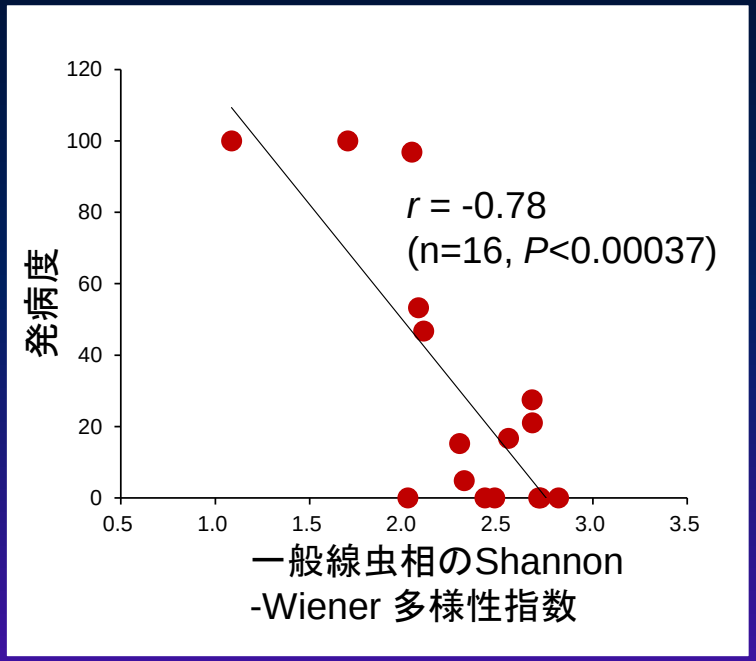


多様性と発病程度との関係

土壌の採取時期別の各微生物の多様性指数と発病度の間の相関係数

土壌採取時期	糸状菌	細菌	一般線虫
前年9-10月	0.17	0.07	**-0.78****
前年12月	0.10	0.38	-0.17
4月	0.40	0.20	0.33
5-7月	0.12	0.36	0.11

前年9-10月採取土壌における一般線虫相の多様性指数と発病度の関係

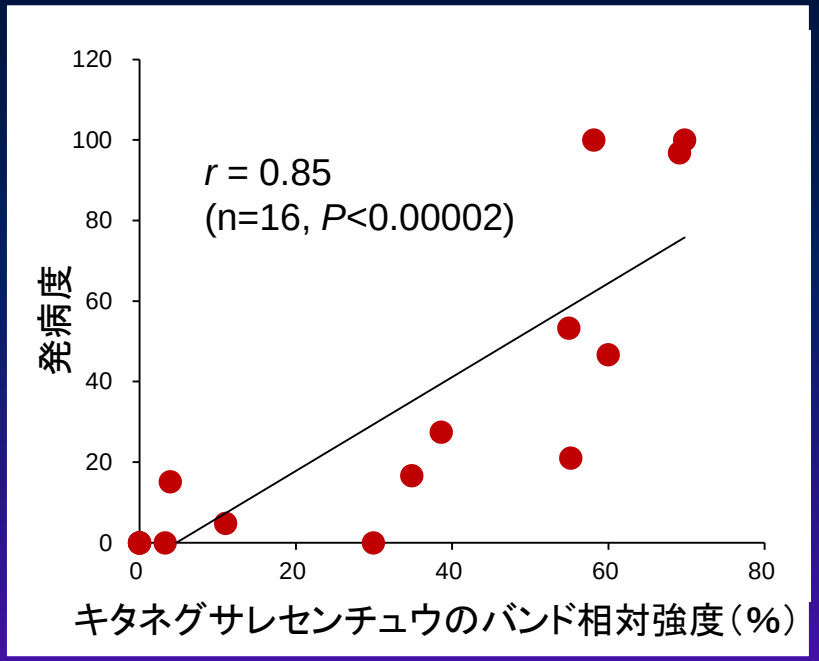


バンド相対強度と発病程度との関係

土壌の採取時期別の病原菌・キタネグサレ線虫バンドの相対強度と発病度の間の相関係数

土壌採取時期	黄化病菌	キタネグサレ線虫
前年9-10月	**0.54***	**0.85****
前年12月	0.43	**0.90****
4月	0.44	**0.71****
5-7月	**0.71****	**0.77****

前年9-10月採取土壌におけるキタネグサレセンチュウのバンドの相対強度と発病度の関係



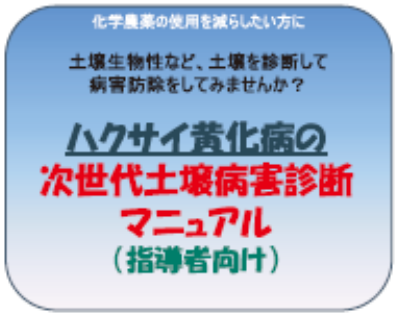
線虫相と病原体の解析は病害の診断に役立つ

発病と関連

栽培前年9-10月
（前作の収穫後）

- 一般線虫の多様性
- 黄化病菌バンド
- キタネグサレ線虫バンド

診断マニュアルの診断項目として活用を提案



マニュアル(ver.1.0)の 表紙

診断項目１
（黄化病菌、キタネグサレバンド）

診断項目２
（前作の発病度）

診断項目３
（一般線虫相・栽培履歴等）

診断項目４ （土壌タイプ）

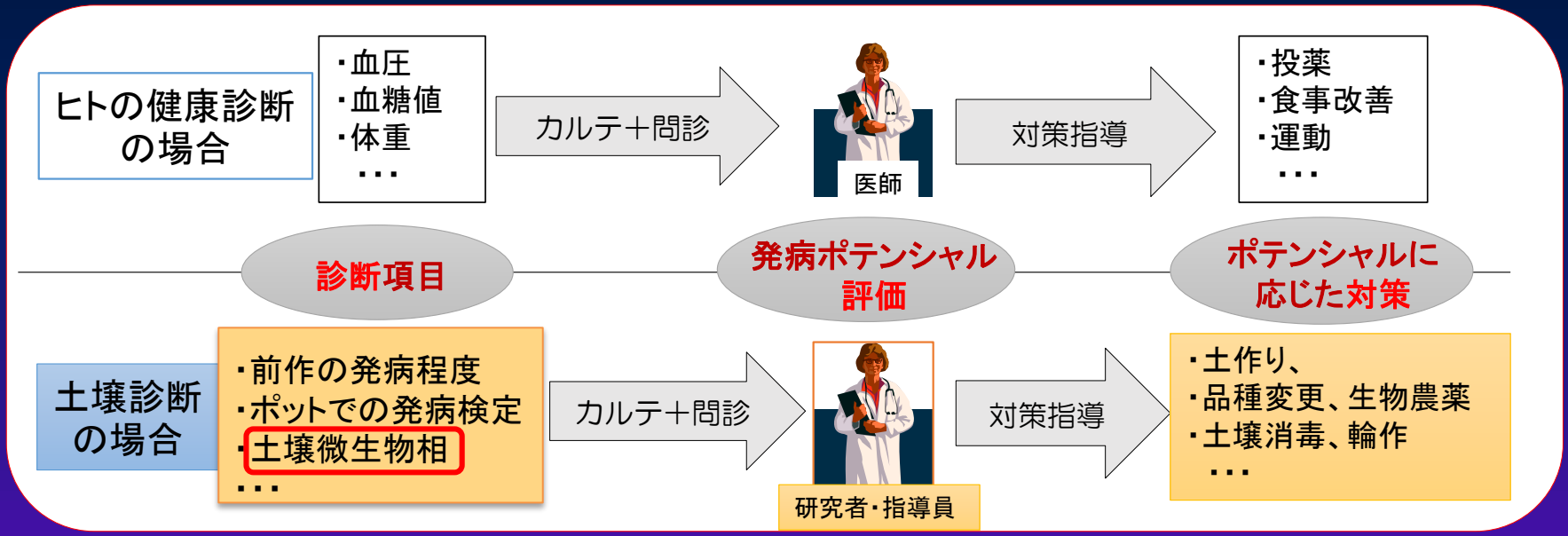
総合評価

診断項目５
（ポット試験での発病検定）

病害診断の結果に基づく土壌病害管理

ヘソディム（HeSoDiM）
Health checkup based soil borne disease management

ヒトの簡易健康診断（発病ポテンシャル評価）の発想で土壌病害を管理（＝診断、評価、対策支援）



土壌微生物相の解析は、ヘソディムの開発・高度化にも重要な役割

データベース構築の必要性

土壌微生物相と病害発生等との関係性を、さらに活用してもらうためには・・・

関係性の解析に用いた生データを多くの人が参照でき、自身の研究目的に活用出来るデータベースが重要

⇒　農耕地eDNAデータベース「eDDASs」を構築

バイオサイエンスデータベースセンター（NBDC）で、
アーカイブデータとして公開中（一部解析機能等が制限）

農耕地eDNAデータベース（eDDASs）
environmental DNA Database for Agricultural Soils

・土壌の理化学性・栽培歴・微生物相情報を併せ持つ世界初のデータベース

・国内26県の2724件の農耕地土壌サンプルの微生物相情報（計5550件）が蓄積
・理化学性情報等が付随（土壌群、位置情報、有機・化学肥料の投入量等）

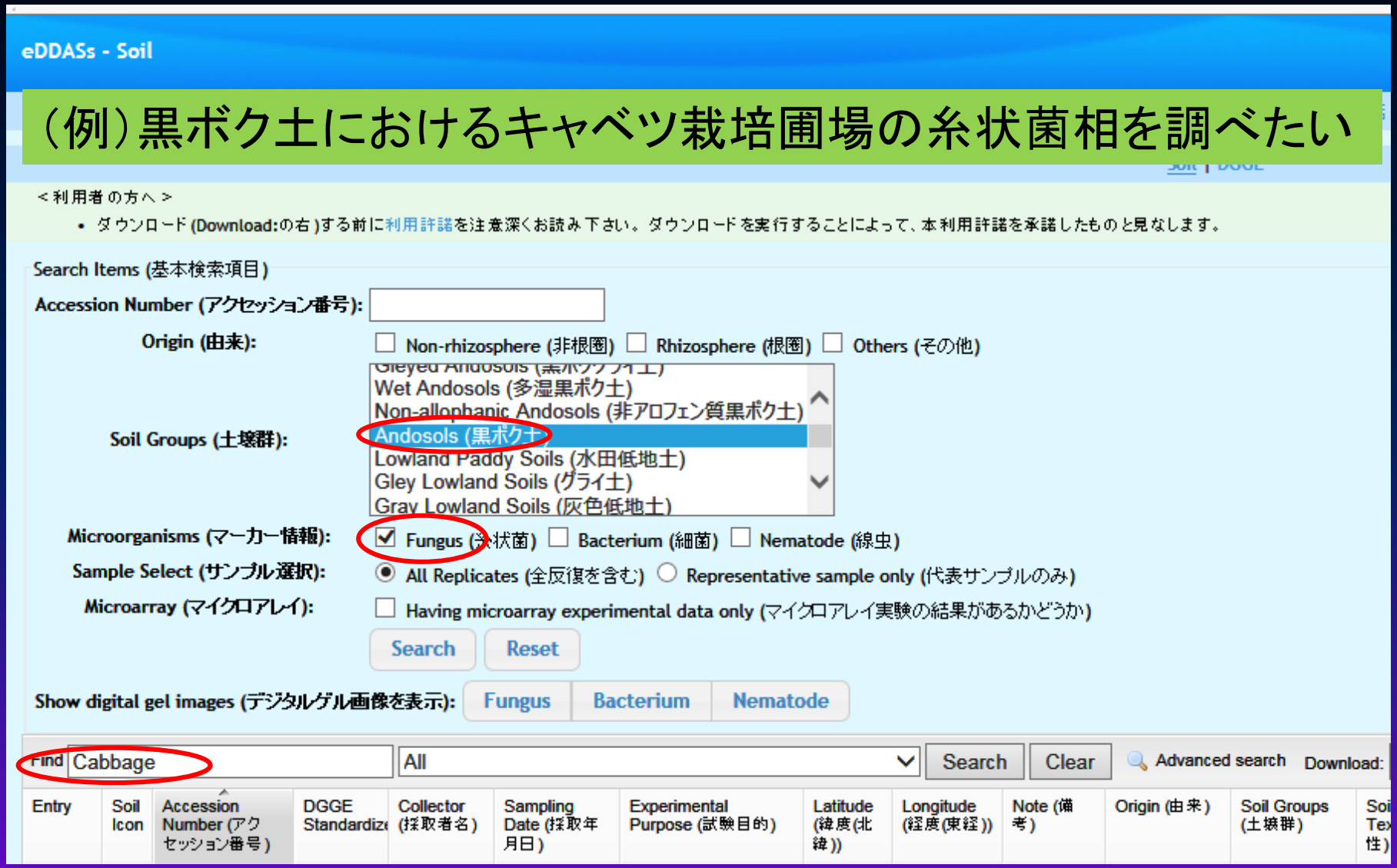
・使いやすいデータ検索・解析機能

・ユーザー（研究者・営農指導者等）が興味のある情報を検索・抽出することが可能
・クラスター解析等のデータ間の比較解析が行えるシステムも装備

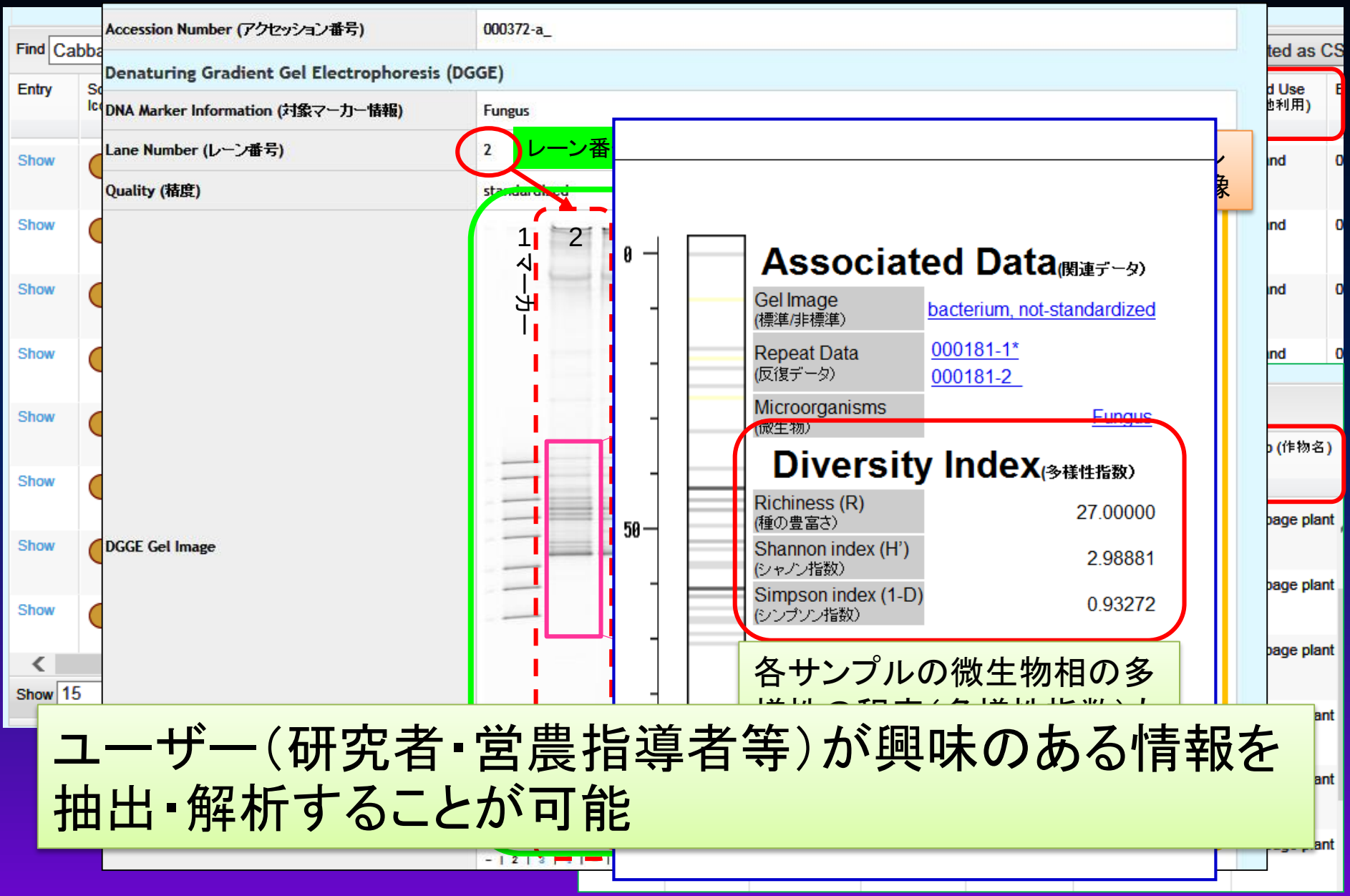
・ユーザー自身のデータも登録できる体制

・誰でも登録できるシステムとすることで、情報蓄積量の増加を期待
・土壌サンプルの理化学性情報等も登録必須事項とすることで、データの質を確保

データの検索画面


eDDASs - Soil
（例）黒ボク土におけるキャベツ栽培圃場の糸状菌相を調べたい
＜利用者の方へ＞
• ダウンロード(Download:の右)する前に利用許諾を注意深くお読み下さい。ダウンロードを実行することによって、本利用許諾を承諾したものと見なします。
Search Items (基本検索項目)
Accession Number (アクセッション番号):
Origin (由来): Non-rhizosphere (非根圏) Rhizosphere (根圏) Others (その他)
Soil Groups (土壌群):
Wet Andosols (多湿黒ボク土)
Non-allophanic Andosols (非アロフェン質黒ボク土)
Andosols (黒ボク土)
Lowland Paddy Soils (水田低地土)
Gley Lowland Soils (グライ土)
Gray Lowland Soils (灰色低地土)
Microorganisms (マーカー情報): Fungus (糸状菌) Bacterium (細菌) Nematode (線虫)
Sample Select (サンプル選択): All Replicates (全反復を含む) Representative sample only (代表サンプルのみ)
Microarray (マイクロアレイ): Having microarray experimental data only (マイクロアレイ実験の結果があるかどうか)
Search
Reset
Show digital gel images (デジタルゲル画像を表示): Fungus Bacterium Nematode
Find Cabbage
All
Search
Clear
Advanced search
Download:
Entry
Soil Icon
Accession Number (アクセッション番号)
DGGE Standardize
Collector (採取者名)
Sampling Date (採取年月日)
Experimental Purpose (試験目的)
Latitude (緯度(北緯))
Longitude (経度(東経))
Note (備考)
Origin (由来)
Soil Groups (土壌群)

データの検索結果



ユーザー（研究者・営農指導者等）が興味のある情報を抽出・解析することが可能

eDDASsに蓄積された情報の活用により

病害発生と微生物相との関係の解明の基となったデータが多数蓄積

eDDASsの活用促進のための課題

- より多くの（魅力的な）データの蓄積
- より一層のPR活動
- 技術的進歩、ニーズの変化に柔軟に対応

謝辞

本研究は、

・農林水産省プロジェクト研究「土壌微生物相の解明による土壌生物性の解析技術の開発 （eDNAプロ）」
・農林水産省レギュラトリーサイエンス新技術開発事業「ハクサイ土壌病害虫の総合的病害虫管理（IPM）体系に向けた技術確立」
・農林水産省プロジェクト研究「気候変動に対応した循環型食料生産等の確立のためのプロジェクト（土壌病害虫診断技術等の開発）、（低投入型農業のための生物農薬等新資材及びその利用技術の開発）」
・農林水産省　農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「次世代型土壌病害診断・対策支援技術の開発」

による助成を受けて行った。

解析データを提供して頂いた
各研究プロジェクトの参画メンバー
（公設試験場、大学、民間企業関係者）に
心より厚くお礼を申し上げます。