

土壌DNAによる土壌生物相解析マニュアルの作成

生物生態機能研究領域 岡田 浩明 森本 品 星野(高田) 裕子

はじめに

作物の生育、病害発生や温室効果ガス発生などの農業生産に関わる諸現象と、微生物や線虫など土壌生物相との関連性を明らかにするためには、多くの土壌サンプルについてその中の生物相の種構成などの情報を蓄積し、相互に比較することが必要です。そのためには、各生物群の群集構造(種構成や密度など)を分析するための標準的な手法の開発が不可欠です。90年代以降、DNA情報に基づいて微生物群集の構造を分析するPCR-DGGE法(PCR増幅-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法)が普及しています。しかし、実験条件が研究者によって異なるため、サンプルを相互に比較するための情報の蓄積が進んでいません。そこで、手法の共通化、標準化を図ることを目的とし、農耕地土壌の細菌、糸状菌、線虫各々について土壌生物相解析法のマニュアル(図1)を作成しました。

解析条件の標準化

解析条件の中で最も重要なプライマーセット(DNAの増幅範囲を決める試薬のセット)の選択については、糸状菌および細菌用セットの場合、サンプル土壌から抽出した鋳型DNAをいくつかのセットでPCR増幅し、電気泳動して得られたDGGEバンドの数や、バンドパターンに基づいて算出した群集の多様度をセット間で比較するなどして検討しました(図2)。線虫用プライマーの場合、電気泳動像の鮮明さなどを検討してあらかじめ1つに絞りました。このような検討により、細菌、糸状菌、線虫各々について最適のプライマーセットを選択しました。また、各々に適したPCR増幅条件や電気泳動条件なども検討し、マニュアルに記載しました。さらに、ゲル間のバンドパターンの相互比較を可能にするためのマーカ(既知の生物種のDNA断片のセットで、バンドの位置の基準になる)も開発しました。このマーカは製品化され既

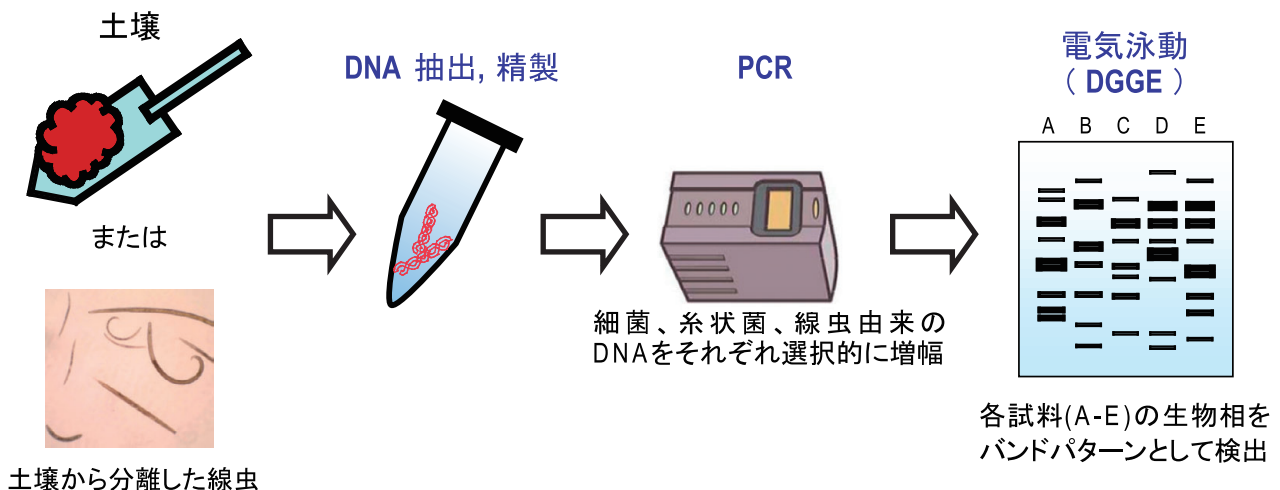


図1 PCR-DGGEによる土壌生物相解析マニュアルの概要

土壌または線虫から抽出したDNAをもとに、対象とする生物群のリボソームRNA遺伝子断片をPCRによって選択的に増幅します。得られた産物を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)にかけることで、土壌中の多様な生物種を個々のバンドとして検出することができます。

に市販されています。このようにして確立した標準的な手法により図3のような鮮明なDGGEバンドパターンが得られます。

おわりに

今後、本マニュアルに基づいて得られた相互に比較可能な土壌生物相のDNA情報が蓄積されることにより、農業生産活動において土壌生物が主因となる、あるいは土壌生物が影響をおよぼす様々

な現象と、土壌生物相との関連がより明らかにされることが期待されます。現在当研究所では、北海道から九州に至る全国の様々な栽培管理条件下の農耕地の土壌、あるいはそれから抽出したDNAを収集し、このマニュアルに基づいた解析で得たDGGEバンドパターンを生物相の情報として蓄積、データベース化し、土壌の理化学性や栽培管理条件とこれらの情報との関係を解明する作業を進めています。

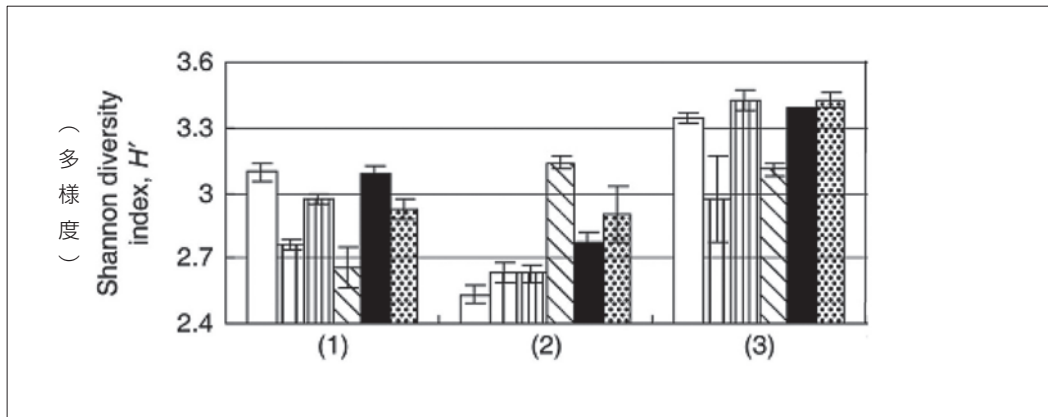


図2 プライマーセット(1)、(2)、(3)を用いたDGGEのバンドパターンによる糸状菌群集の多様度
カラムの様子は土壌の種類を示す。多様で再現性が高いバンドパターンが得られることなどから(1)を選択。

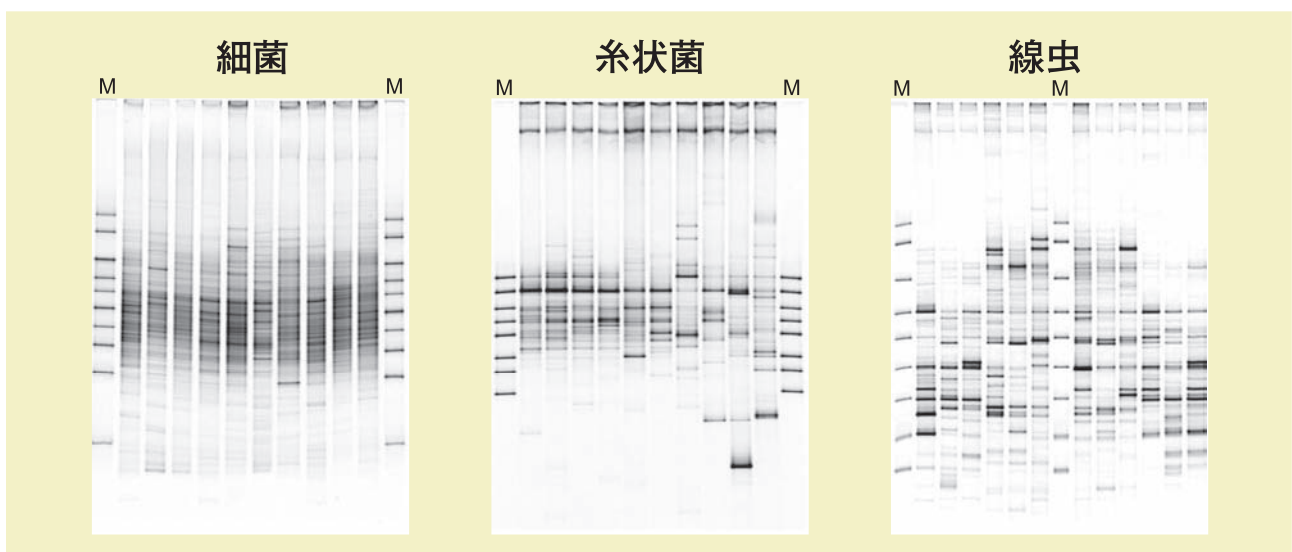


図3 PCR-DGGEによる土壌生物相解析の例

各レーンには異なる土壌に由来するDNAを泳動し、それぞれの生物相をバンドパターンとして検出。「M」はサンプル間の比較を行うためのマーカ。