

## DNA分析を利用した土壌微生物の調査方法

農業・園芸総合研究所

### 1 取り上げた理由

普及に移す技術第86号（参考資料）では、土壌中の微生物量を推定するためのATP量測定について取り上げた。土壌間の微生物量の差を考察するには、さらに微生物相についての情報が必要である。そこで、土壌中のDNAを分析することで微生物相を調査する方法を検討した結果、土壌微生物の調査方法として有効であったことから参考資料とする。

### 2 参考資料

- 1) 生土の土壌試料を採取し、2mm目の篩に通し植物残さ等を取り除く。その後、大きめのビニール袋に篩った土壌を入れて十分に混和する。
- 2) 0.4gの生土からDNAを抽出する（図1）。このDNA中には、土壌微生物のDNAが混在している。PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法を基本技術としたDNA分析、すなわちクローンライブラリ法（図2）、PCR-DGGE法（PCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法、図3）、t-RFLP法（末端制限酵素断片長多型法、図4）により、DNAに含まれる細菌（バクテリア）と糸状菌類のDNAを選択的に増幅し分離する。その後、分離したDNAの配列情報から種を推定する。
- 3) DNA分析による調査結果から、土壌試料間の微生物相の比較や差別化ができる。培養技術を介さないため、難培養性微生物の存在も推定できる。

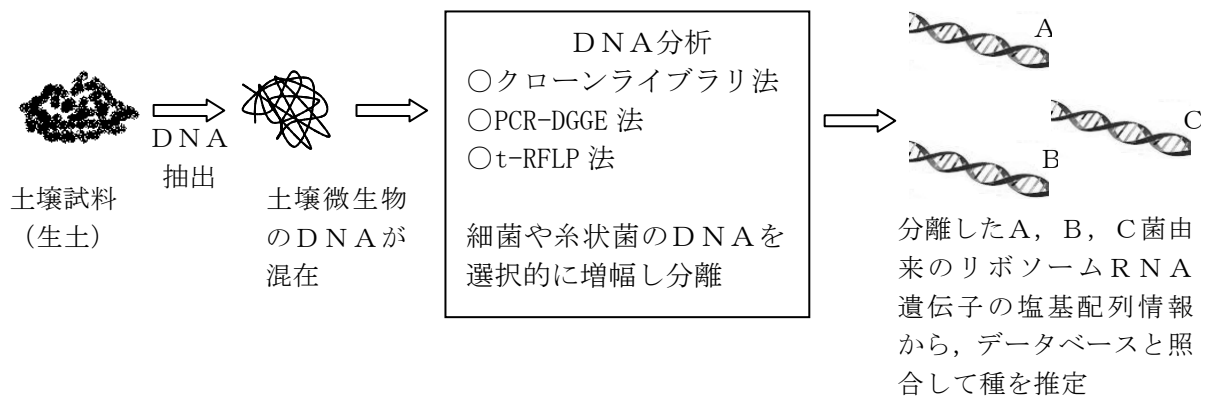


図1 DNA分析の概略

### 3 利活用の留意点

- 1) 堆肥、土壌改良資材の施用、除塩や土壌消毒を施したほ場で、土壌微生物の変化を調査する際に活用できる。
- 2) 環境DNA分析は、農業・園芸総合研究所バイオテクノロジー開発部において分析できる。クローンライブラリ法は2週間程度、PCR-DGGE法とt-RFLP法は2~3日間を要する。
- 3) 多数の生物種のDNAが混在するDNAは、メタゲノムや環境DNA（eDNA、eはenvironmentalの略）とも呼ばれる。

（問い合わせ先：農業・園芸総合研究所 バイオテクノロジー開発部 電話022-383-8131）

#### 4 背景となった主要な試験研究

- 1) 研究課題名及び研究期間 環境にやさしい農業定着促進事業（平成22～23年度）  
農業の早期復興に向けた試験研究連携プロジェクト（平成23年度）
- 2) 参考データ

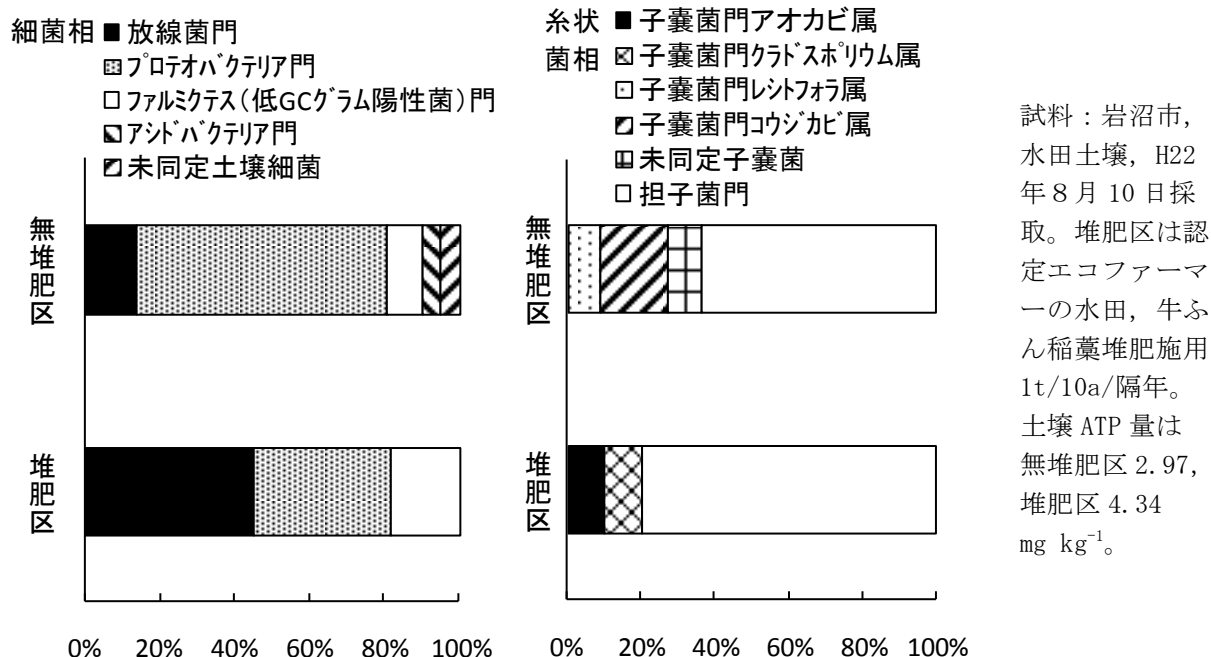


図2 クローンライブラリ法で分析した水田の土壌細菌相(左)と糸状菌相(右)

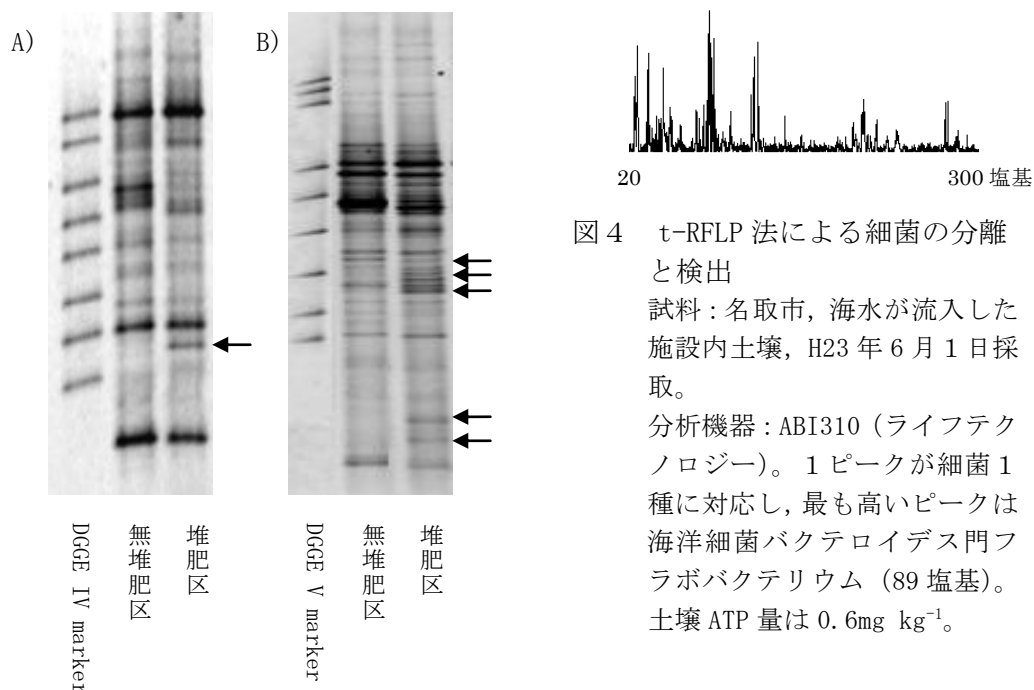


図3 PCR-DGGE法による畑地の糸状菌相の電気泳動写真

矢印は，堆肥区で特異的な種を示すバンド。

分析機器：DCode微生物群集解析システム(バイオ・ラッド)。

A) 試料：所内畑地土壌，牛ふん粉殻堆肥10t/10a/年，H23年2月25日採取。土壌ATP量は無堆肥区0.58，堆肥区0.90mg kg<sup>-1</sup>。

B) 試料：名取市，海水が流入した施設内土壌をH23年6月1日に採取，所内で除塩後にバーク堆肥(2t/10a)を施用，作付無しで5ヶ月後に分析。土壌ATP量は無堆肥区1.6，堆肥区1.6mg kg<sup>-1</sup>。

- 3) 発表論文等 なし。
- 4) 共同研究機関 なし。