

有機農業ほ場における土壌微生物フローラの決定

生命工学科 教授

澤 嘉弘

目 的

有機農業は有機物や有機質肥料の施用を行うことから慣行農業と比較し、土壌中の微生物フローラが生産性に大きく関与することが予想される。そのため有機ほ場の土壌微生物フローラを把握し管理することは、有機農業における安定生産に繋がることを期待される。

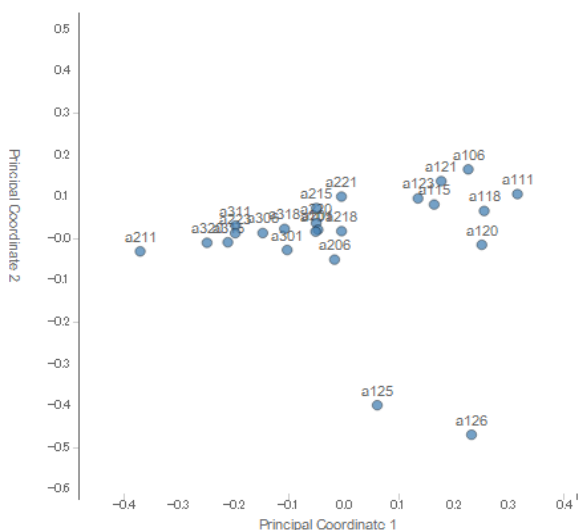
分子生物学的微生物フローラ解析法として、これまでに FISH 法、クローン化ライブラリー法、DGGE 法、マイクロアレイ法、T-RFLP 法、メタゲノム解析などが用いられてきている。T-RFLP 法は、微生物の SSU (16S-, 18S-rDNA) の制限酵素断片サイズの T-RF プロフィールを簡便に得ることのできる解析法であるが、微生物種の特定は困難であると考えられていた。当研究室では、これまでに 16S-rDNA T-RFLP の断片サイズの精度を飛躍的に向上する方法を考案し、属レベルでの同定に成功している。近年注目されている次世代 DNA シーケンサーを用いるメタゲノム解析は低存在量である珍しい個体群でさえも種レベルで同定することを可能にし、正確な微生物群集構造を説明することができるが、16S-rDNA には対応しているが 18S-rDNA には対応していない。

そこで本課題では、各種有機農業ほ場サンプルの微生物フローラを決定するために、細菌 (16S rDNA) についてはメタゲノム解析法で、真菌 (18S rDNA) については T-RFLP 法で行うことにした。なお、18S rDNA T-RFLP 法は新たに解析条件を最適化する必要があったため、島根大学ほ場ダイコン栽培土壌を用いてクローン化ライブラリー法で 147 種の真核生物を同定すると共に解析用データベース、ソフトウェアの開発も同時に行った。スペースの関係でメタゲノム解析の一部のみの報告にとどめる。

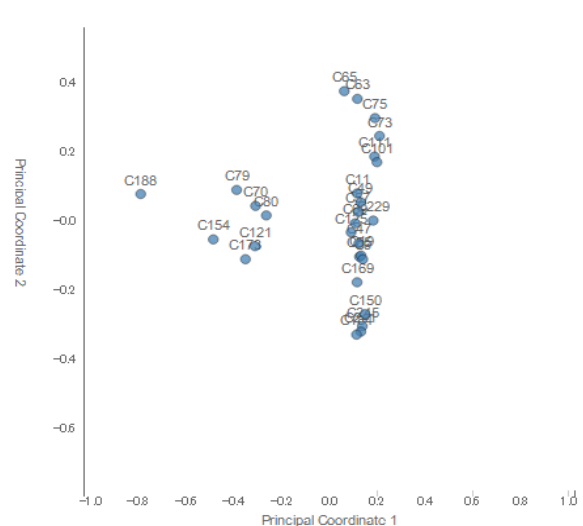
研究成果

Illumina MiSeq を用いて、各種ほ場土壌 88 サンプルの 16S rDNA メタゲノム解析を行った。平均リード数 122,879, 平均 Genus 決定率 72.81%, 平均 Species 決定率 45.78%, 決定数 1236 種であった。

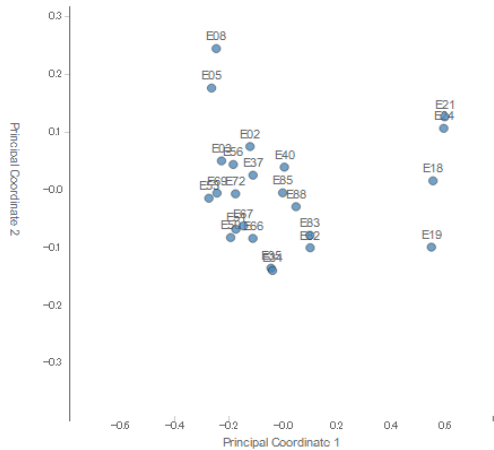
Group a



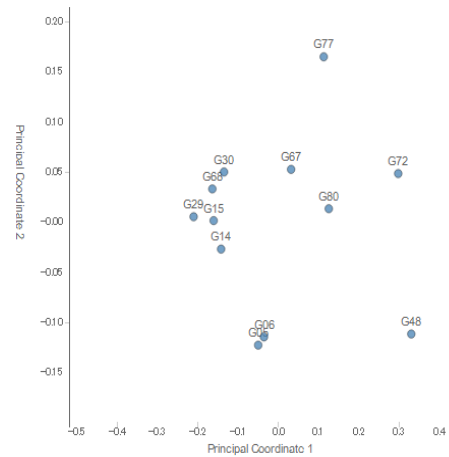
Group C



Group E



Group G



a: プランター試験 1 回目, C: 農業技術センター有機転換ほ場土壌, E: 農業技術センター新規ほ場土壌, G: 県内現地有機ほ場土壌

図は各試験区の Genus level 主座標分析 (PCoA) を示したものである。詳細な解析は、今後、農業技術センターで行われる予定であるが、各試験区内で 2-3 にクラスタリングされている等、PCoA 分析はかなり有用であるように思われる。また、今回は示していないが、クラスター解析も情報量が多く有用であると思われる。今後の種レベル解析で作物に影響のある病原菌やその拮抗菌、窒素循環に関する菌をはじめ多くの微生物の動態を高精度で捉えることが可能になるものと思われる。

社会への貢献

有機農業における栽培品目による土壌微生物フローラの動態の詳細が明らかになり、土壌微生物を指標としたほ場管理指針（作物生産性向上、効率施用によるコスト削減、温室効果ガス N₂O 発生の抑制等）の作成などに活用されることが期待される。

次年度に向けた検討状況

メタゲノム解析は当初 305 サンプルを予定していたが、予算の関係で 88 サンプルに下げざるを得なかった。今回予想以上にメタゲノム解析が有用であることが判明したので、残りのサンプルの解析も行う予定である。一方、今回最適化した 18S rDNA T-RFLP 法は、メタゲノム解析に比べると情報精度が低く有効性は低いと言わざるを得ないので、次年度、18S rDNA メタゲノム解析に挑戦する予定である。

学会発表等

1. 曾我夏実, 芦田裕之, 丸田隆典, 石川孝博, 澤 嘉弘: T-RFLP 法による 18S-rDNA フラグメント解析の最適化, 日本農芸化学会中四国支部第 40 回講演会 (2014 年 9 月 徳島)
2. 曾我夏実, 澤 嘉弘, 仲谷 敦志, 有機農業ほ場における土壌微生物フローラの決定, 生物資源科学部ミッション研究課題成果報告会 (2015 年 3 月飯南町)

外部資金

共同研究: 澤 嘉弘, 島根県農業技術センター「有機栽培及び転換ほ場における土壌微生物相の実態と変化の把握」