

環境 DNA を用いた土壌繊毛虫相の解析  
 ～家畜スラリーを投与した畑土壌について～

三部 光夫<sup>1</sup>, 島野 智之<sup>1</sup>, 笠原 康裕<sup>2</sup>, 橋本 知義<sup>3</sup>, 高橋 忠夫<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>宮教大・EEC, <sup>2</sup>北大・低温研, <sup>3</sup>九州沖縄農研センター, <sup>4</sup>西九州大・生物)

Characterization of soil ciliates diversity in upland soils treated with cattle manure  
 slurry using small subunit rDNA sequence analysis.

Mitsuo SANBE<sup>1</sup>, Satoshi SHIMANO<sup>1</sup>, Yasuhiro KASAHARA<sup>2</sup>, Tomoyoshi HASHIMOTO<sup>3</sup> and  
 Tadao TAKAHASHI<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>EEC, Miyagi Univ. of Education, <sup>2</sup>Inst. Low Temp. Sci. Hokkaido Univ.,  
<sup>3</sup>NARC Kyushu-Okinawa Reg. and <sup>4</sup>Biol. Lab. Nishikyushu Univ.)

SUMMARY

Over the past few years, the use of molecular techniques to detect cultivation-independent, protistan diversity has proven to be a powerful approach. We compared the species composition of the ciliate community in four soil samples with different levels of slurry application (300, 150, 60, and 0 tonnes per hectare per year) in 2005 and 2006. For each soil samples, the total DNA was extracted and used to construct an SSU rRNA gene clone library after nested PCR amplification of a ca. 600-bp fragment. The ciliate communities were estimated by random sequencing of several clones per library. Our results show that ciliate diversity is very high. Most of the sequences corresponded to the Colpodea and Spirotrichea taxon groups (class). We showed that our molecular approach could be able to estimate and compare the ciliate species composition of soil samples. Changes in species composition of these communities were found, but no evident increase in the diversity. These changes did not depend on different levels of slurry application.

[目的] 原生生物である繊毛虫が土壌生態系において重要な役割を演じていることが、これまでしばしば指摘されてきた。しかし、土壌繊毛虫の生息数の推定のために用いられる MPN 法では培養を行わなければならない。また全種組成の推定では、培養による活動体の顕微鏡同定をおこなうというプロセスが不可欠である。近年、これらの培養を経ることなく、分子生物学的手法を用い SSU rDNA に基づく原生生物の群集構造解析に解析が試みられている (例えば Gast et al., 2004; Slapeta et al., 2005 など)。しかしこれらの報告では、真核生物用ユニバーサル・プライマーをもちいているため、不特定多数の真核生物によってターゲットとする原生生物相、または、繊毛虫相が PCR においてマスキングされる可能性がある。ツンジュンほか(2005)による繊毛虫特異的の

プライマーは、土壌繊毛虫相をある程度特異的に検出することが可能である。本研究ではこのプライマーを用いて、SSU rDNA のクローン・ライブラリーによる繊毛虫相の解析を試み、高橋ほか (2003) による 2004 年及び 2005 年の土壌について行われた MPN-SIPs 法による顕微鏡による繊毛虫群集解析の結果との比較を行った。

[材料と方法] 供試土壌: 土壌サンプルは 15 年以上、同じ管理が行われている宮崎県都市九州沖縄農業研究センターの実験圃場の 4 区画から表層土を 2005 年度、2006 年度に採取し、合計 8 処理区とした。1 年あたり 4 処理区の各々における家畜スラリー投与量は 0 t/, 60 t, 150 t, 300 t (ha<sup>-1</sup> y<sup>-1</sup>) であった。採取した土壌は 5 mm のふるいを通してから、4°C で保存し

た。

環境 DNA の抽出及びクローンライブラリーの作成: 液体窒素と65℃ウォータバスを用いて三回繰り返し凍結融解処理に続いて、超音波洗浄器(100W)に5分間投与による処理を行った後、土壌 DNA 抽出キット ISOIL for Beads Beating (NIPPON GENE CO., LTD.) をもちいて DNA 抽出を行った。抽出後、PEG 6000を用いて精製した。DNA 溶液を鋳型とし、真核生物ユニバーサル・プライマー (EU1F 及び EU929R) で増幅後、繊毛虫門に特異的なプライマー (CS322F) 及び EU929R を用いて、得た PCR 産物をクローニングしてクローン・ライブラリーを作成した。各処理区から、約20クローンの SSUrDNA の部分塩基配列を決定し解析を行った。

[結果および考察] 2005, 2006年度の8処理区のクローン・ライブラリー解析の結果, Stichotrichia, Colpodea, Oligohymenophorea, Litostomatea, Heterotrichea, Phyllopharyngea の6網の繊毛虫のグループ (Lynn, 2003) に属する塩基配列を得た。また、どの処理区においても, Stichotrichia, Colpodea, に属すると考えられるクローン体が多くを占めていた。この傾向は高橋ほか (2003) の顕微鏡観察の結果と同様であった。顕微鏡観察の結果から確認された家畜スラリー投入量と、繊毛虫相の変化

に関する相関は、クローン・ライブラリー法の結果からは見いだせなかった。

クローンライブラリー法で検出されず、顕微鏡観察で見いだされたのは、1網 Nassophorea であった。一方、顕微鏡観察で見いだせず、クローンライブラリー法で検出されたものは2網 Heterotrichea と Litostomatea であった。このうち Heterotrichea は、2005年度の0 t 処理区のみを検出され、また、Phyllopharyngea は、2006年度の150 t 処理区にのみ検出された。それぞれ1, 2クローンではあるが、今後クローン数を増やすことで、処理区間の偏りが改善されることが推察されるとともに、顕微鏡観察に比べてより広範囲な繊毛虫群集の把握に結びつく可能性が予想された。

#### [文献]

- 1) Gast, R.J. et al. (2004) *App. Environ. Microbiol.* 70: 2028-2037.
- 2) Lynn, D.H. (2003) *Eur. J. Protistol.* 39: 356-364.
- 3) Slapeta, J. et al. (2005) *Proc. R. Soc. B* 272: 2073-2081.
- 4) 高橋忠夫 ほか (2003) *日本原生動物学雑誌* 36: 18-19.
- 5) ツンジュン・プイティカほか (2006) *日本原生動物学雑誌* 39: 142-143.