

野洲川河口部ヨシ帯再生箇所における環境DNA分析によるコイ・フナ類の検出

○パシフィックコンサルタンツ株式会社 正会員 上月 佐葉子
 パシフィックコンサルタンツ株式会社 正会員 渡部 健
 神戸大学大学院人間発達環境学研究科 源 利文

1. はじめに

琵琶湖に流入する野洲川河口部では重要な水産資源であるコイ・フナ類の産卵場・成育場としてヨシ帯の再生が進められてきた。現在、ヨシ帯の整備が終了し、長期的な順応的管理へ移行する段階にある。

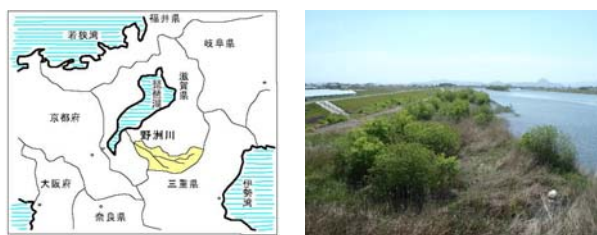


図1 野洲川の位置と再生されたヨシ帯

これまでヨシ帯の整備効果を把握するため、専門家による産卵調査や仔稚魚調査、魚類相調査が行われてきた。労力・コストがかかる上、卵・仔稚魚への調査圧もあることから、平成28年度には琵琶湖河川事務所の業務として、環境DNA分析による調査の簡略化検討として、魚類相の調査方法について、従来の標準手法である「河川水辺の国勢調査マニュアル」に準拠した捕獲調査と環境DNA分析（メタバーコーディング法）を比較し、環境DNA分析の有効性を示した¹⁾。

本稿では、琵琶湖河川事務所の協力を得て、環境DNA分析（リアルタイムPCR法）を用いたコイ・フナ類の検出を試行し、当該地で実施されてきた仔稚魚調査と比較した結果を報告する。

2. フナ類を検出するプライマー開発

今回の環境DNA分析は、種（あるいは種群）に特異的プライマーを用いてDNAを増幅させて検出するリアルタイムPCR法を用いる。コイの種特異的プライマーは開発されていたが²⁾、フナ類については未開発だった。

野洲川河口に生息するフナ類は主にギンブナ、ゲンゴロウブナ、ニゴロブナであるので、この3種全てを同時に検出可能なプライマーを開発した。開発したプライマーは、各種複数個体の組織サンプルを用いて、3種全てが検出可能であることを確認した。

3. 研究方法

仔稚魚調査と同時期に同じ場所で採水した試料水について環境DNA分析を行い、仔稚魚調査結果と比較した。

1) 調査箇所

ヨシ帯の整備年度と植生分布を踏まえ、調査側線を15ライン設定した。

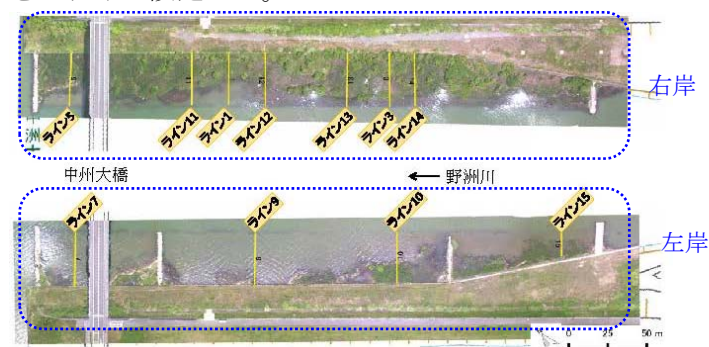


図2 調査側線

2) 調査期日

コイ・フナ類の産卵状況を踏まえ、5月に実施した。

調査項目	1回目	2回目
仔稚魚調査	2017. 5. 8	2017. 5. 30
環境DNA分析用採水	2017. 5. 7	2017. 5. 31

3) 仔稚魚調査の方法

測線の両側1mの範囲でコイ・フナ類の仔稚魚を金魚網を用いて採集し、2m×2mのコドラートごとに確認数を整理した。（琵琶湖河川事務所よりデータを提供して頂いた）。

4) 環境DNA分析の方法

＜採水＞右岸はヨシ帯が発達しているため、各側線においてヨシ帯の内部と外縁部の2箇所では採水した。左岸はヨシ帯の外縁部1箇所とした。各地点で表層から1L/箇所を採水し、DNAの減少を抑えるために、10%塩化ベンザルコニウム溶液を1ml加えて固定した。



採水箇所ヨシ帯内部



ヨシ帯外縁部

キーワード：環境DNA、コイ・フナ類、ヨシ帯再生、仔稚魚、PCR

発表者連絡先：北海道札幌市北区北七条西一丁目2番地6 TEL:011-700-5227 FAX:011-727-1012

＜分析＞試料水をガラスフィルターGF/Fでろ過し、フィルター上の試料からDNeasy Blood & Tissue KitでDNA抽出した。開発したフナ類及び既存のコイに特異的なプライマー・プローブセットを用いてリアルタイムPCRによりDNAを増幅し、フナ類の検出及び銑型DNA濃度の定量を行った。PCRのネガティブコントロールとしてサンプルDNAの代わりに超純水を銑型とするチューブを3回繰り返し用意し、サンプルと同様にPCRを行った。

4. 調査・分析結果

仔稚魚調査結果及び環境DNA分析結果を図3に示す。仔稚魚調査結果は、仔稚魚確認数を調査時に水域を有したコドラート数で除した値(仔稚魚密度)とし、環境DNA分析結果は、1mLあたりの環境DNAのコピー数で表現した。

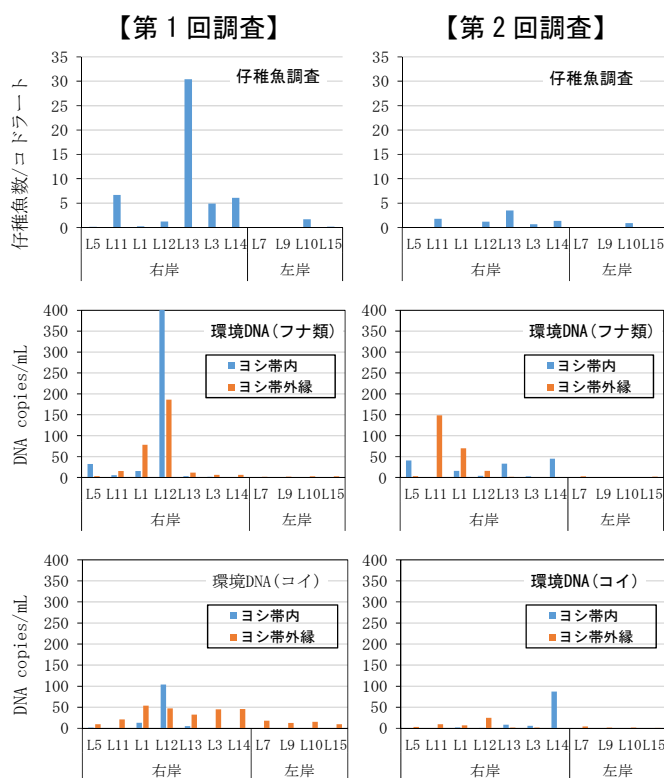


図3 調査・分析結果

仔稚魚密度は、ライン13で高く、全体に1回目より2回目の方が低かった。ヨシ帯が発達した右岸のほうが左岸よりも密度が高かった。なお、左岸のライン7、9では調査2回ともに仔稚魚の確認はなかった。

環境DNA分析では、調査2回とも全採水地点でコイ及びフナ類の環境DNAが検出された。コイ及びフナ類ともに1回目にはライン12の環境DNA濃度が突出して高かった。また、仔稚魚確認数と同様に右岸のほうが

左岸よりも環境DNA濃度が高い傾向があった。コイは1回目のライン12を除き、両岸で外縁部のほうが環境DNA濃度が高く、比較的左岸でも検出された。

5. 考察

仔稚魚密度も環境DNA濃度も、調査側線や調査日で結果のばらつきが大きかった。これはヨシ帯の植生分布や水深、水域が多様であることが要因と考えられる。

側線単位で仔稚魚密度と環境DNA濃度を比較すると、明瞭な対応関係はみられなかった。その要因としては、仔稚魚の調査日と採水日が異なっているため、仔稚魚の分布が変化していた可能性が考えられた。また仔稚魚は逃避行動をとるため、捕獲調査の結果には、植生の状態や水深等、捕獲しやすさに関係する環境条件が影響を与えていた可能性も考えられた。

一方、左岸全体に対する右岸全体という比較では、仔稚魚密度も環境DNA濃度も、左岸よりも右岸で高く、1回目に比べ2回目で低下する傾向は整合的であった。整備箇所全体という大きなスケールでは環境DNA濃度が仔稚魚密度の指標となる可能性が考えられた。

6. 今後の課題と研究

今回の結果は、開発したフナ類を検出するプライマーにより、野外でコイとフナ類の環境DNA濃度の調査が可能になったことを示すものである。

今後、従来の調査手法に代わる簡略化手法として、環境DNA分析を活用するためには、コイ・フナ類の仔稚魚の個体数・バイオマスと環境DNA濃度の関係を明らかにする研究データの蓄積が課題と考える。

謝辞：仔稚魚調査データを提供して頂いた近畿地方整備局琵琶湖河川事務所に謝意を表す。

＜参考文献＞

- 1) 渡部, 上月, 土居, 帰山ほか, (2017) 環境DNA多種同時検出法(メタバーコーディング)による淡水域の魚類相調査, 土木学会第72回年次学術講演会II-2069.
- 2) Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, Kawabata Z (2012) Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. PLoS ONE 7(4):e35868.