

流水域における環境 DNA 分析を用いたオオカナダモの検出及び生物量推定

山口大学	創成科学研究科		学生会員	○児玉 貴央
山口大学	創成科学研究科	学術研究員	正会員	宮園 誠二
山口大学	創成科学研究科	教授	正会員	赤松 良久
山口大学	創成科学研究科	特命 助教	正会員	中尾 遼平
山口大学	創成科学研究科	学術研究員	正会員	斎藤 稔

1. はじめに

南米原産の外来沈水植物であるオオカナダモ *Egeria densa* は、切れ藻による栄養繁殖で大規模な群落を形成し、河川内において様々な問題を引き起こすことからオオカナダモの適切な防除・管理手法の開発が求められる。そのためにはオオカナダモの生息場所及び生物量の効率的なモニタリング手法を確立することが課題となる。近年、野外において採水のみで生物調査が行える環境 DNA 分析が注目されている。しかし、流水域におけるオオカナダモの在/不在及び生物量を環境 DNA 分析により定量化した研究例は不足している。本研究では、河川内を流れるオオカナダモの断片(切れ藻、葉片)と環境 DNA を、サーバーネットを用いた採集及び採水によりサンプリングし、目視により得られた上流のオオカナダモ被度と比較することで、オオカナダモの検出及び生物量推定に対する環境 DNA 分析の有効性について検討した。

2. 方法

(1) 現地調査

調査区間は、中国地方の1級河川である江の川の土師ダム～坂木川合流部までの約28 kmとし、2019年8月5日と12月3日に調査区間内の支流18地点において現地調査を行った(図-1)。現地調査では、まず環境DNAサンプル1L(表層水)の採水を行った。次に、支流内にサーバーネットを10分間設置し、切れ藻及び葉片の採集を行った。このとき、採集と並行してサーバーネット内の流量を算出するため、平均流速及び平均水深を測定した。採集物のうち同定が可能な切れ藻は乾燥重量を測定するためフリーザーパックへ、同定が不可能な葉片は環境DNA分析を

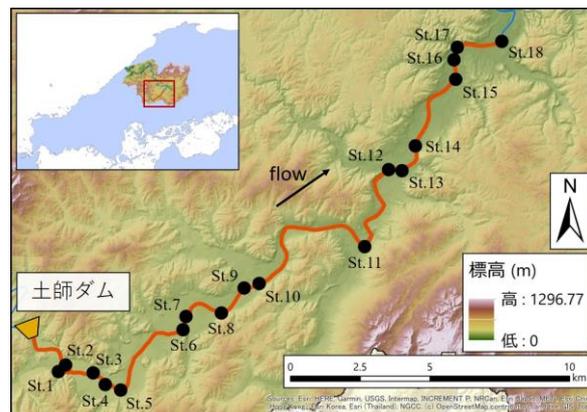


図-1 調査地点

行うためイオン交換水とともに500 mLのボトルにいれ保存した。最後に、調査地点の100 m上流のオオカナダモ被度を目視により0～5の6段階のランク(0:不在, 5:最も多い)に分類した。

(2) 分析方法

サンプル水は、GF/Fガラスフィルターでろ過した後、ろ紙をアルミホイルに包み約-20℃で冷凍保存した。ろ紙からのDNA抽出はサリベットチューブ及びDNA抽出キットを用い、抽出したDNAサンプルは、CFX Connect Real-Time PCR Detection System(BIO-RAD)を用いて、リアルタイム定量PCRにより環境DNA濃度を分析した。切れ藻は同定を行った後、乾燥炉に入れ95℃で12時間以上乾燥し、乾燥重量を測定した。葉片サンプルは、ろ過を行った後、フィルター上のサンプルを乳鉢及び乳棒を用いてすりつぶし、乳鉢内のサンプルをイオン交換水で洗い流すことで再度ろ過を行い、採水サンプルと同様にDNA抽出、定量PCRを行った。サーバーネットの浸水面積の違いによる採集物の量の差を考慮するため、切れ藻の乾燥重量、葉片及び採水の環境DNA濃度にサーバーネット内の流量を乗じて、切れ藻フラックス、葉片及び採水の環境DNAフラックスを算出した。

キーワード オオカナダモ, 環境DNA, 外来生物, 流水域, 定量PCR

連絡先 〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1 山口大学工学部社会建設工学科 TEL0836-85-9339

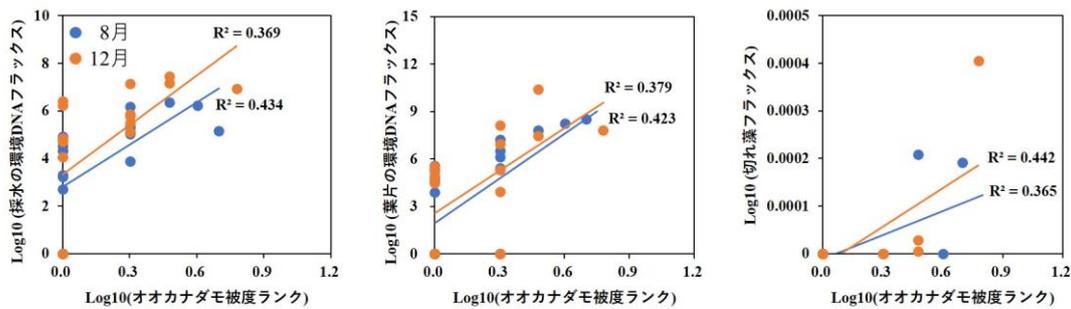


図-2 8月, 12月におけるオオカナダモ被度と各フラックスの関係

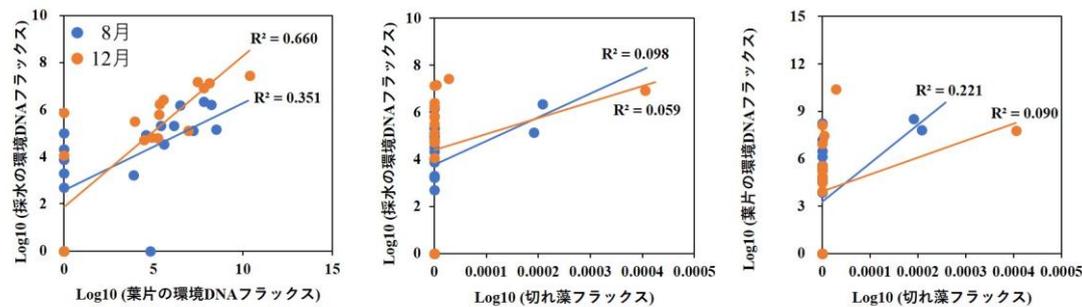


図-3 8月, 12月における各フラックス間の関係

(3) 統計解析

統計解析では, 8月, 12月の各月におけるオオカナダモ被度のランクと切れ藻フラックス, 葉片の環境 DNA フラックス, 採水の環境 DNA フラックスの関係及び各フラックス相互の関係を単回帰分析を用いて解析した. 単回帰分析では, 変数は正規分布が仮定されるため, skewness が 1 以上の変数に関しては対数変換を行った.

3. 結果と考察

(1) サンプルング方法ごとの検出率

サーバーネットを用いたオオカナダモ断片の採集では, 切れ藻の場合 8月で 2/18 地点, 12月で 3/18 地点において採集でき, 葉片の場合 8月で 11/18 地点, 12月で 12/18 地点において採集できた. 最も検出率が高かったのは採水の場合で, 8月で 15/18 地点, 12月で 14/18 地点において検出された. また, オオカナダモは 8月で 9/18 地点, 12月で 8/18 地点において目視により確認でき, これらの地点における検出率をサンプルング方法ごとに比較すると切れ藻は 29.4%, 葉片は 82.4%, 採水は 100%であった. これにより, 支流におけるオオカナダモの在/不在の検出には採水によるサンプルング方法が最も有効であることが示唆された.

(2) サンプルング方法ごとの生物量の推定

図-2 に各月における目視により推定されたオオカナダモ被度と各フラックスの関係を, 図-3 に各月における各フラックス間の関係を示す. 単回帰分析の結果, オオカナダモ被度と各フラックスの R^2 は 0.4 前後と, 調査した季節, サンプルング方法の違いによらず正の相関がみられた. この結果, どのサンプルング方法においても調査地点上流の被度を反映することが示唆された. また各フラックス間の関係では, 採水の環境 DNA フラックスと葉片の環境 DNA フラックスに 8月で $R^2=0.351$, 12月で $R^2=0.660$ と正の相関がみられた. これにより, 採水により得られる環境 DNA は葉片などオオカナダモの小さな断片からきていると考えられる.

4. 結論

本研究では, オオカナダモのモニタリングに対する環境 DNA 分析の有効性について検討するため, 異なるサンプルング方法を用いてオオカナダモの在/不在及び生物量を調査した. その結果, オオカナダモの検出率は, 採水による環境 DNA サンプルングを行った場合が最も高いことが明らかとなった. また, 上流のオオカナダモ被度と採水の環境 DNA フラックスの間に他のサンプルング同様, 正の相関がみられたことから, オオカナダモの生物量推定に対する環境 DNA 分析の有効性が示唆された.