

ホタル生息地での環境DNA技術を用いたゲンジボタルのモニタリング手法の検証

鹿島建設(株) 正会員 ○大野貴子 林 文慶 中村華子 山口毅志 越川義功
(公財) 熊本県環境整備事業団 出納由美子
鹿島環境エンジニアリング(株) 瀬戸口正海 古閑貴浩

1. はじめに

ホタルは、里山の指標生物の1つとして注目され、全国で生息地の保全や再生プロジェクトが多数実施されている。これらのホタル生息地を維持管理するためには、ホタルの生息状況の把握が重要である。ホタルの生息状況は、一般的に幼虫期ではなく、成虫期の飛翔状況のみで行われている。その理由は、ホタルの幼虫が孵化直後は1.5mm前後と小さいことに加え、日中は礫の下や草の根元等に隠れているため、正確な把握が困難なためである。ホタルの生活史の中で最も長い水中期の生息状況を把握できないことは、ホタル生息地の保全や維持管理の上での問題点を把握することが難しく、大きな課題である。

筆者らはこの課題を解決するために、環境DNA技術を用いたホタルのモニタリング手法(図-1)を開発し、ホタルの飼育水や生息地の水試料のDNAの検出が可能であることを明らかにした¹⁾。しかし、本手法でのホタル生息地での検証は上陸前のみであり、ホタルの幼虫期を通じての検出確認は行っていない。

本報では、環境DNAを用いたホタルのモニタリング手法の更なる適用拡大に向けて、幼虫期を通じてホタルDNAの検出を試みた結果について報告する。

2.ホタル生息地でのモニタリング方法

ゲンジボタルは若干の地域差はあるが、6月～7月に産卵する。卵は約30～40日で孵化し、孵化した幼虫は水中で約9ヶ月間過ごした後に、3月～4月にかけて上陸し、蛹となる²⁾。ホタルの幼虫の生息状況を把握するためのDNAサンプルを採取するために、採水調査はホタルの生活史に合わせて行った。採水時期は、幼虫が孵化した直後の夏(7～8月)、幼虫の成長期である秋(9～11月)、水温が低下する冬(12～2月)、蛹化前の初春(3月)の合計4回とした。

調査場所は、毎年ホタルが確認されている(平均目視確認数:25個体(踏査法))、熊本県南関町の水路(全長約100m)とした。採水地点は、周辺農地からの流入水による攪乱影響の生じにくい地点を2か所選択した。表-1に採水地点の環境条件を示す。採水を行った水路は、比較的狭い水路であるが、一年を通して水の流れは維持され、ホタルの幼虫やカワニナも確認されている。採水は、1地点あたり1Lの採水バックで2～



図-1 環境DNA技術を用いたホタルのモニタリング手法

表-1 採水地点の環境条件

	単位	平均値±標準誤差
水面幅	mm	34.8±3.1
水深	mm	3.6±0.6
流量	L/s	7.8±0.4
水温	℃	16.1±1.1
溶存酸素	mg/L	0.74±0.13

キーワード：環境DNA ホタル モニタリング 生息地 生物多様性

連絡先：〒182-0036 東京都調布市飛田給2-19-1 鹿島建設(株)技術研究所 TEL 042-489-6332

3 反復（合計 4～6 サンプル）採水し、採水後半日以内にカートリッジ式フィルターにてろ過した。ろ過処理サンプルは、環境 DNA 学会マニュアル³⁾に基づき、DNA の抽出作業を行った。得られた DNA サンプルは、開発したホタル専用 PCR プライマーを用いて定量 PCR 分析を行い、得られた DNA 濃度から平均 DNA 濃度を算出した。

採水調査は 2018 年の夏から 2019 年春までの約 2 年間行い、2018 年、2019 年のホタルの幼虫の生息状況の確認のため、翌年の 5 月下旬～6 月下旬にホタル成虫の飛翔調査を行った。

3. モニタリング結果および考察

図-2 に採水時期ごとのホタルの平均 DNA 濃度、表-2 にホタル生息地でのホタル飛翔確認数を示す。分析の結果、採水した全ての試料からホタルの DNA が検出され、平均 25 個体のホタルが飛翔する場所では、環境 DNA 分析が飛翔期前のホタル幼虫の生息確認に有効であった。

検出されたホタルの DNA 濃度は、夏は低く、秋から冬に増加し、春にまた低下する傾向がみられた。この傾向は 2018 年、2019 年ともに同じ傾向であり、ホタル幼虫の生息の有無の判断に適した採水時期は、秋から冬（9～2 月）であることが明らかになった。秋から冬の時期に DNA を最も検出しやすい要因は、夏に孵化をしたホタルの幼虫が秋から冬にかけて餌であるカワニナを食べて成長し、その過程で糞の排出量や脱皮する回数が多くなることで環境中に放出される DNA 量が多くなるためと推測される。

現地は水路流量が変動することから、その影響を排除するため、図-3 に 2019 年の採水時期ごとのホタル DNA フラックスを示す。DNA フラックスは、図-2 に示す平均 DNA 濃度と同様の傾向で変動し、その要因は前述の通り、ホタル幼虫の生活史に連動していると考えられた。

4. まとめ

ホタル生息地にてホタルの環境 DNA によるモニタリング手法の検証を行った結果、ホタルの水中幼虫期を通じて DNA の検出が可能であることが確認できた。また、ホタルの DNA 濃度が最も高い時期は、秋から冬（9～2 月）であり、この時期が採水に適することも明らかになった。ホタル幼虫期の生息状況を把握するために、今後も継続的なモニタリングによるデータの拡充を図り、モニタリング技術の精度向上を図る見込みである。

参考文献

1) 大野ら：環境 DNA 技術を用いたホタルのモニタリング手法；第 74 回土木学会年次学術講演集，VII-01，2019
2) 板当沢ホタル調査団編：日本産ホタル 10 種の生態研究；板当沢ホタル調査団，pp.76-83，2006
3) 宮，佐土ら；カートリッジ式フィルターからの DNA 抽出；環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会（編），環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2. 34-46，2020

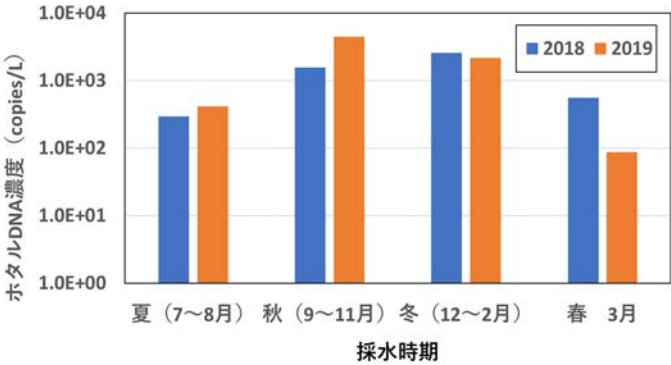


図-2 採水時期ごとのホタルの平均 DNA 濃度

表-2 ホタル生息地でのホタル飛翔確認数

	2018	2019
調査回数	12	10
平均目視確認数（個体）	24.8	23.1
ピーク時確認数（個体/2分）	57	71

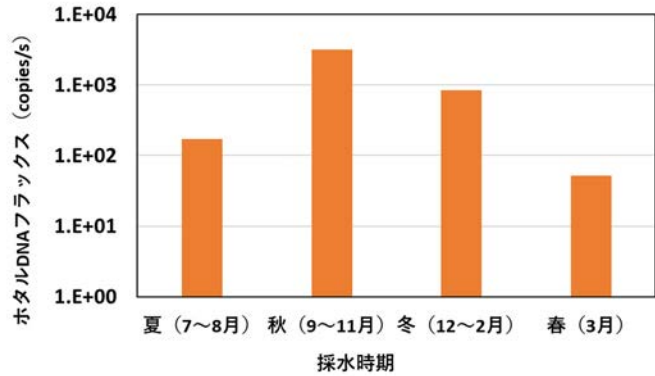


図-3 採水時期ごとの平均 DNA フラックス（2019）