

農業用ため池における両生類の環境 DNA の空間分布 Spatial distribution of environmental DNA of amphibians in farm pond

○渡部恵司*・竹村武士*・濱田康治*・小出水規行*

WATABE, K., TAKEMURA, T., HAMADA, K. and KOIZUMI, N.

1. はじめに

農業用ため池（以下、「ため池」）の防災工事（廃止工事を含む）における適切な生態系配慮の実施に向け、ため池の生息種を効率的に把握するための手法として環境 DNA 調査が注目されている。ため池の水には、そこに生息する生物の細胞組織等に由来する DNA（環境 DNA）が含まれ、環境 DNA 調査では採水サンプル中の環境 DNA の抽出・分析により、生物種の在否や多寡を推定する。近年、両生類の種を網羅的に把握するためのユニバーサルプライマー Amph16S¹⁾ が公開されたが、適用事例が少なく、ため池に適用する際の採水場所に関する知見が不足している。そこで、ため池の貯水部と上流の土水路において環境 DNA 調査を行い、両生類の検出種を比較した。

2. 材料と方法

調査地は、千葉県内のため池とした（図 1）。希少種の生息地の特定を避けるため、ため池の名称や位置等の詳細は伏せた。ため池の上流には土水路があり、調査時にはわずかに水が流れていた。

環境 DNA 調査は 2023 年 4 月 13 日に行った。貯水部 3 地点 (St.1~3) および土水路 3 地点 (St.4~6) の計 6 地点（図 1）において、水 1L をそれぞれ採水した。サンプルは、塩化ベンザルコニウム 1mL を添加・混和し、クーラーボックスで保冷して分析機関に輸送した。また、目視調査を 3 月 17 日および 4 月 13 日に行った。ため池の水際や土水路のうち安全に立ち入れる場所を踏査し、両生類の卵囊・卵塊、幼生、成体等の数と位置を記録した。

環境 DNA 分析は、いであ株式会社に依頼し、環境 DNA 調査・実験マニュアル²⁾ に従ってメタバーコーディング法により実施した。ただし、ユニバーサルプライマーセットは Amph_16S_1070F/Amph_16S_1340R¹⁾ のセットを基本とし、これらの配列に、続く 2ndPCR のプライマーがアニーリングするための配列およびサンプル識別のためのタグ配列を付加したものを使用した。次世代シーケンサーには MiSeq (イルミナ社) を使用した。データ解析では、fastq ファイルを作成し、プライマー配列の除去、デノイジング等を行った後、各 ASV (Amplicon Sequence Variant) のリード数 (取得された配列数) の集計および各 ASV と最も相同性の高い生物種名の併記等の相同性検索を行った。

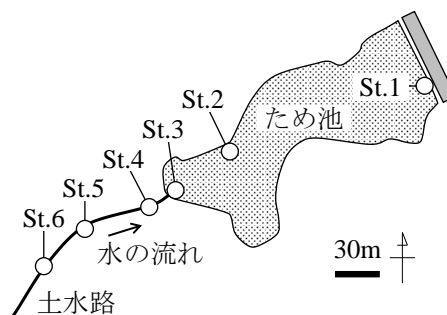


図 1 調査地の概形および採水地点
Outline of survey area and water sample collection sites

*農研機構 (NARO)

キーワード：環境 DNA メタバーコーディング，カエル，サンショウウオ，生態系配慮

表 1 環境 DNA 分析による検出種および地点別のリード数

Detected species and its read counts using environmental DNA metabarcoding.

種名	貯水部			土水路			合計
	St.1	St.2	St.3	St.4	St.5	St.6	
両生類 合計	807	158	36	5,270	10,199	6,294	22,764
トウキョウサンショウウオ	0	0	0	5,133	9,649	5,788	20,570
アズマヒキガエル	0	0	0	137	550	506	1,193
ニホンアカガエル	807	0	36	0	0	0	843
ウシガエル	0	158	0	0	0	0	158
両生類以外 合計	41,946	97,928	39,380	20,322	26,446	14,897	240,919
合計	42,753	98,086	39,416	25,592	36,645	21,191	263,683

3. 結果とまとめ

環境 DNA 分析による検出種は貯水部と土水路で異なり，ニホンアカガエル *Rana japonica* およびウシガエル *Lithobates catesbeianus* は貯水部のみで，トウキョウサンショウウオ *Hynobius tokyoensis* およびアズマヒキガエル *Bufo formosus* は土水路のみで検出された(表 1)。DNA 配列と DNA データベース登録配列の一致率はいずれも 100%)。トウキョウサンショウウオのリード数は土水路では 5,133~9,649 と大きかったが，貯水部ではため池の流入口に近い St.3 でも 0 となった。これは，貯水部に流入すると急激に希釈され，貯水部では検出できなかつたと推測される。なお，目視調査では，St.3 付近の陸上でニホンアカガエルの成体 1 個体が確認され，St.5~6 の土水路内でトウキョウサンショウウオの卵囊 3 対が確認された。

分析に用いたユニバーサルプライマー¹⁾では，両生類以外の種にも 40 種の真核生物(哺乳類 13 種，鳥類 12 種，魚類 4 種等)が，一致率 98.5%以上で検出された。6 地点で検出された両生類のリード数の合計は，全真核生物のリード数のうち 9% (22,764/263,683) に過ぎなかつた(表 1)。すなわち，両生類以外の DNA が多かったことにより，相対的に両生類のリード数が少なく，両生類が検出されにくかつたと考えられる。一方で，環境 DNA 分析を外注する場合，対象とする分類群以外は報告書に記載されないことが一般的であろうが，希少種や外来種等の検出種の報告を依頼すると，希少種の保護や外来種の駆除等の活動に有用と考えられる。

以上，ため池の貯水部と上流の土水路では環境 DNA の検出種が異なつた。ため池の生態系配慮に際し，ため池に流入する水路や後背地等の上流域の生息種を把握できるように，環境 DNA 調査では貯水部とともにため池への流入地点より上流でも採水する必要があると考えられる。

謝辞：ため池を所管する市のご担当者には，調査地の情報を提供いただき，現地調査の許可をいただいた。いであ株式会社の中村匡聡室長・白子智康主査研究員には，環境 DNA 分析を実施いただき，結果について有益なコメントをいただいた。ここに記して深謝する。

引用文献：1) Sakata et al. (2022): Development and evaluation of PCR primers for environmental DNA (eDNA) metabarcoding of Amphibia, *Metabarcoding and Metagenomics* 6, 15-26. 2) 環境 DNA 学会 (2020)：環境 DNA 調査・実験マニュアル (ver. 2.2).