



海草場を対象とした環境DNA検出方法と三次元数値解析の適用性に関する検討

赤塚, 真依子
高山, 百合子
伊藤, 一教
森本, 哲平
源, 利文

(Citation)

土木学会論文集. B2, 海岸工学, 74(2):I_1225-1230

(Issue Date)

2018

(Resource Type)

journal article

(Version)

Version of Record

(Rights)

© 2018 公益社団法人 土木学会

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/90005805>



海草場を対象とした環境DNA検出方法と 三次元数値解析の適用性に関する検討

赤塚 真依子¹・高山 百合子²・伊藤 一教³・森本 哲平⁴・源 利文⁵

¹正会員 大成建設株式会社 技術センター (〒245-0051 神奈川県横浜市戸塚区名瀬町344-1)

E-mail:aktmik00@pub.taisei.co.jp

²正会員 大成建設株式会社 技術センター (〒245-0051 神奈川県横浜市戸塚区名瀬町344-1)

³フェローメンバー 大成建設株式会社 技術センター (〒245-0051 神奈川県横浜市戸塚区名瀬町344-1)

⁴神戸大学大学院 大学院人間発達環境学研究科 (〒657-8501 神戸市灘区鶴甲3丁目11)

⁵神戸大学大学院 大学院人間発達環境学研究科 (〒657-8501 神戸市灘区鶴甲3丁目11)

水域における生物情報を入手する方法のひとつである環境DNA分析は、1L程の採水となる現地作業は簡便であるものの、広域に放出された希薄なDNAを対象とするため、様々な要因が環境DNAの検出結果に影響を及ぼすことが懸念される。著者らは、流動解析と環境DNAを組合せたアマモ場モニタリング手法の構築を目指している。次世代シーケンシングと定量PCRによる環境DNA分析を試み、各分析方法の現地調査との対応性評価を目的とした。11地点の現地調査では、次世代シーケンシングは数点の検出となり、定量PCRはアマモ場から離れるに従って、高い値から徐々に低下した。また、室内試験から得られた海草の環境DNA減衰特性を取り入れた三次元拡散解析を実施し、分析結果と相関が得られた。流動解析と環境DNA分析による分布評価について適用の可能性が示唆された。

Key Words : environmental DNA, Seagrass, Zosteraceae, PCR inhibitor, Advection diffusion

1. はじめに

建設工事に伴う環境影響評価やミチゲーションの適地選定においては、生物種の分布やその変化が重要な情報となる。生物情報を入手するひとつの手法として、土壤や水中など環境中に存在するDNA（環境DNA、以下eDNA）を検出する技術開発が進んでおり、水域では1L程の採水がサンプリング試料となる。eDNA分析では、特定の生物種のDNAを定量するリアルタイムPCR解析（以下、qPCR）と、特定の生物群の塩基配列結果から種を識別する次世代シーケンス解析（以下、NGS）の2つの方法が主流であり、生息地域の特定や生物量を算出する試みが始まっている¹⁾。しかしながら、水域におけるeDNA分析は現地採水作業は簡便であるものの、広域に放出された希薄なDNAを対象とするため、採水地点の選定、DNAの抽出・精製等の分析方法などがeDNAの検出結果に影響を及ぼすことが懸念される。影響する要因として挙げられるeDNAの存在形態²⁾やDNAの分解される減衰過程³⁾の報告は生物種が限られており、対象とする生物種毎にそれぞれ異なる可能性も考えられる。

アマモ場と呼ばれるアマモ、コアマモ等の海草群落に着目すると、日本全国の閉鎖性海域沿岸に広く分布し、水産生物の産卵や生育の場として重要な役割を果たして

いる。また、大気中のCO₂を海中に生育しているアマモが直接吸収することが実証され⁴⁾、ブルーカーボンとして重要視されている。アマモ場は、沿岸開発等の影響から植生面積が減少しており⁵⁾、保全や現存量の把握が重要となる。そのため、広範囲に分布するアマモ場を効率的に把握するモニタリング方法が求められている。

海草のeDNAに関する研究事例は少なく、アマモのITS領域とmatK領域を対象としたqPCRによる室内試験の報告⁶⁾や平面二次元の数値解析を用いて採水地点を選定し、海草のrbcL領域を対象としたNGSによる海草の有無に関する報告⁷⁾がある。しかしながら、実海域の分布と分析結果を定量的に比較した事例や現地海水を用いた海草の分析方法を詳細に検討した事例は見当たらない。

著者らは、流動解析とeDNAを組合せたアマモ場のモニタリング手法の構築を目指している。eDNA分析は試料毎に特性を考慮した処理が必要であり、モニタリング手法へ適用するためには出来るだけ分析方法を標準化する必要がある。本研究では、海草のeDNA分析の標準的方法を確立するため、アマモ、コアマモを検出できるqPCR分析方法の開発を行った。そして、現地観察結果と分析結果の相関を比較し、開発した分析方法の妥当性を検討した。さらに、三次元濃度拡散解析では、eDNAが時間経過とともに分解する減衰特性を考慮するため、

室内試験から求めた減衰特性を取り入れた解析を行い、11 地点における現地観察結果、eDNA 分析結果と比較し、eDNA の分布について数値計算の適用性を検討した。

2. 対象海域

対象海域は、湾奥にアマモ、コアマモの生育が確認されている三重県英虞湾である。図-1(a)に、対象海域の海底地形を示す。英虞湾は顕著なリアス式海岸であり、湾中央に大小の島々が位置する閉鎖性の強い湾である。2010 年度の三重県調査結果⁸⁾によると、アマモは、立神、神明、鵜方の入り江奥から海岸線に沿って水深の浅い領域に主に分布している。3 つの入り江のうち広範囲に生育が確認されている立神を現地調査と採水の対象とした。

3. 現地調査と eDNA 分析方法

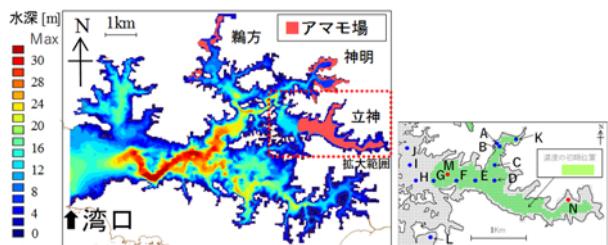
(1) 現地調査と採水方法

三重県英虞湾の 12 地点 (A~L) を eDNA 分析の採水地点に選定した (図-1(b))。A~K 点は、アマモ、コアマモが生育する湾奥から湾口に向かう約 3km の 11 点であり、2017 年 6 月と 2018 年 1 月に採水と潜水調査を実施した。また、一年生のアマモが発芽期である 2017 年 11 月に K 点と L 点で採水した。なお、A~K 点は一年生のアマモ、L 点は多年生のアマモが優占種である。

現地調査は、採水直後に船上からポータブル測深器 (HONDEX 製、PS-7) を用いて水深を測定し、多項目水質計 (アレック電子製、AAQ1186-pro) で水温、塩分、濁度を測定した。採水点直下の潜水による目視観察は、アマモ、コアマモの被度、草丈、株数 (50cm×50cm の枠内) とした。また、周辺海域に潜水しアマモの分布域を調査した。海水は、干潮時から約 1 時間に湾口側である J 点から湾奥の K 点に向かって順次、船上から採水した。採水水深は、船上から特別な器具を使わずに採水することを想定し、水面下 1 m とした。海水は 1L ずつ容器に分注し、DNA 分解を抑制するため⁹⁾塩化ベンザルコニウム 10w/v% 水溶液を 1ml 添加後、冷蔵輸送した。

(2) ろ過および抽出

eDNA の試験手順を図-2 に示す。採水した翌日にガラス纖維ろ紙 (0.7μm, Φ47mm) でろ過し、ろ紙を冷凍保存 (-20°C) した。抽出試薬として DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN 製) を用い、Yamamoto et al. の方法¹⁰⁾で 1L の海水から 100μl の DNA 抽出液を得た。抽出液の全 DNA 量を Qubit4 フルオロメーター (Thermo Fisher Scientific) で測定した。実験室でろ過や分析等に使用する器具は誤検出防止のため、採水地点が異なる毎に次亜塩素酸 5% 溶液に 5 分間浸漬させて洗浄した。



(a) 解析領域および海底地形、アマモ分布
(b) 採水地点および解析出力点

図-1 三重県英虞湾

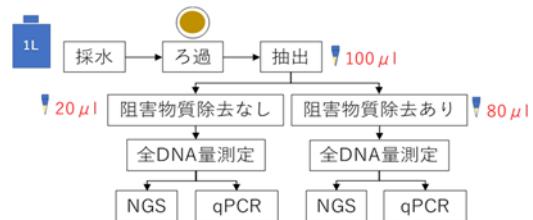


図-2 eDNA の試験手順

(3) プライマーの設計

本研究では、11 地点の現地試料に含まれるアマモ、コアマモの DNA 量を比較することを目的としており、qPCR による DNA の検出が必要となる。現存量の多いアマモに比べ、点在して生育するコアマモは分布域の把握が困難であるため、アマモ、コアマモの分離が重要となる。しかし、アマモ、コアマモは、種間変異が少ないアマモ科の近縁種であるため区別するプライマーの設計は困難である。そのため、海草の *rbcL* 領域を対象としてアマモとコアマモの総量を qPCR で検出し、アマモとコアマモの区別が可能な NGS⁷⁾による分析結果と組み合わせた方法を検討した。qPCR のプライマーは、NGS で対象とした領域について Reverse 側は同じ設計とし、Forward 側の位置を変えることで対象領域が短い設計とした。4 章にて後述するが、現地試料の *rbcL* 領域の海草を対象とした qPCR からは有意な結果が得られたものの、NGS では qPCR で DNA 量が高い地点のみの検出に留まったことから海草の区別が出来なかった。そのため、新たに *matK* 領域を対象とし、アマモ、コアマモを個別に増幅するプライマー、プローブを設計した。表-1 に各塩基配列情報と主な反応条件を示す。開発したプライマー、プローブは、採水時に現地で採取したアマモ、コアマモの草体を乾燥粉碎して粉末とし、3.(2)節の方法で抽出した DNA を用いて検証した。それぞれ対象とする海草の DNA 増幅曲線が得られていること、対象としない海草は増幅しないことをそれぞれ確認し、海草、アマモ、コアマモを個別に検出する方法を確立した。

(4) eDNA 分析 (NGS および qPCR)

DNA 分析は、NGS (illumina 製、MiSeq) による海草を対象とした分析とし、qPCR (Thermo Fisher Scientific 製、QuantStudio 6) は 3(3)節にて検討した海草、アマモ、コアマモを個別に検出する方法を確立した。

表-1 配列情報および反応条件

検出装置	次世代シーケンサー	定量PCR			
		対象生物	海草	海草	アマモ
対象領域	rbcL 領域	rbcL 領域	matK	matK	
Forward(5'→3')	CITATTATACTCTGAATATGAAACC	TTACAAAGCCGATGCTACC	GCTTCTTCTCCCTACACGAG	TATTCATGATTGTCGTGAGAATA	
Reverse(5'→3')	GTGGACCTTGGAAAGTTG	GTGGACCTTGGAAAGTTG	AACCTTCCCAACCCCGTT	TGCACACACGACTTCCCTATG	
Probe(5'→3')	—	—	FAM-TTCATGATTTGGTTGATATAT-MGB-NFQ	FAM-ACTGAGTAGTCTCTTATACTT-MGB-NFQ	
	1stPCR/2ndPCR	qPCR	qPCR	qPCR	
サイクル数	35回/12回	60回	55回	55回	
	温度	時間	温度	時間	温度
サイクル前	94°C	2min	95°C	1min	50°C
					95°C
熱変性	94°C	30s/cycles	95°C	60s/cycles	15s/cycles
アニーリング	50°C/60°C	30s/cycles	60°C	60s/cycles	95°C
伸長反応	72°C	30s/cycles	72°C	60s/cycles	15s/cycles

アマモを対象として分析を行った。海草を対象としたqPCR分析では、反応液は 2xSYBR premix Ex Taq 10uL, Primer F 1250nM, Primer R 1250nM, 50x ROX Dye II 0.4uL, DNA 1uL を SDW で 20uL とした。アマモ, コアマモの個別に対象とした qPCR 分析の反応液は 2xEnvironmental Master Mix 10uL, AmpErase 0.1uL, Primer F 900nM, Primer R 900nM, Probe 125nM, DNA 2uL を SDW で 20uL とした。

(5) DNA分析の阻害要因検討

DNA 分析で問題となる阻害物質のひとつとして腐葉土などに含まれる植物由来のフミン酸等が報告されており¹¹⁾、海草にも含まれることから影響の低減が重要と考えられる。一年生アマモの発芽期である 2017 年 11 月に海草の生育密度が異なる 2 地点 (K, L) の海水を用いて、分析方法が海草の eDNA 検出結果に及ぼす影響について検討した。3.(2)節の方法で抽出後、PCR の阻害物質除去を One Step PCR Inhibitor Removal Kit (ZYMO RESEARCH 製) を用いて行い、全 DNA 量を測定した。

(6) 海草DNAの減衰試験

採水時に現地で採取したアマモ, コアマモの株を用いて、放出された DNA が分解され、減衰する過程を室内試験により確認した。アマモ, コアマモは採取後、冷蔵で実験室に持ち帰り、目視で確認できる底泥や付着物を除去後に、-20°Cで冷凍保存した。冷凍保存したアマモ 50g, コアマモ 20g は容器外での解凍時の DNA 溶出を防ぐため速やかに 1L の蒸留水に浸漬させた。浸漬開始から 24 時間経過後、草体の混入を避けるため、74μm のふるいを通過させた溶液を eDNA 濃縮液とした。DNA の減衰を確認するための溶液として、蒸留水、蒸留水に 3%の NaCl (関東化学製、特級) を溶解させた NaCl 水、人工海水 (マリン・テック製、SEALIFE) の 3 種を 1L ずつ分析に必要な本数を用意した。eDNA 濃縮液 10ml

表-2 現地調査概要

	6月調査	11月調査	1月調査
調査日	2017年6月18日	2017年11月19日	2018年1月15日
天候	くもり	くもり	はれ
干潮時刻	6:14	11:56	10:54
採水時間	6:30~8:05	10:40, 12:30	10:53~12:04
採水	11地点	2地点	11地点
分析	10地点(K点なし)	2地点	11地点

をそれぞれの溶液に添加して室温に静置した。eDNA 濃縮液の添加後、経過日数が 0, 1, 2, 3, 5, 7 日にガラス纖維ろ紙 (0.7μm, Φ47mm) で容器内の溶液全量をろ過し、ろ紙を冷凍保存 (-20°C) した。DNA の抽出は 3.(3)節の eDNA 分析手順により抽出し、海草を対象とした qPCR 分析を行った。

4. 現地調査と eDNA 分析結果

(1) 現地調査結果

全 3 回の現地調査概要を表-2 に示す。潜水作業によるアマモの分布が確認できた 6 月の範囲を図-3 に示す。水深の大きい入り江中央で広くアマモの成育を確認した。アマモが枯死期となる 6 月は、一年生のアマモが抜け始め、水面に海草が浮遊していた。アマモ場の分布は、調査範囲の湾奥での被度が高く、F 点付近までの分布であった。一方、成長期となる 1 月は、6 月調査に比べ水深が大きい場所で発芽が確認でき、入り江中央では、G 点付近まで分布を確認出来た (図-1(b))。透明度が高い冬場に発芽が見られた G 点付近は、春以降の透明度低下にともない成長できず、分布域が狭くなると考えられる。発芽期の 11 月に調査した K 点, L 点の写真 (図-4) を見ると一年生のアマモが優占種である K 点では草丈 5cm 程の発芽体、多年生のアマモが優占種である L 点では、草丈 20cm の多年生と 5cm 程の発芽体を確認した。

(2) 阻害物質の影響検討

11月のeDNA分析結果を表-3に示す。NGSではアマモを検出した場合を○とし、qPCRでは海草のDNA増幅が確認出来たものを○とした。NGSでは、生育密度が高いL点において、阻害物質の除去なしの場合には検出されない結果となったが、阻害物質を除去することで検出することが出来た。一方、生育密度が低いK点では、除去なしの場合には検出できたが、除去によって抽出液の全DNA量は4.87ng/μlから0.34ng/μlと約1/10に減少し検出できなかった。海草を対象とするqPCRは、K点では除去によりqPCRの値が除去前に比べ半減したものの、L点では除去前後の差はなかった。阻害物質の除去は、生育密度が高いにもかかわらず非検出となる場合には有効である一方、生育密度が低い場合に、阻害物質とともに目的のDNAも除去される可能性が明らかとなった。また、NGSではqPCRに比べて阻害物質の影響が大きいと考えられる。

(3) eDNA分析結果

11点(A~K)の海水について、海草を対象としたqPCRの結果を図-5に示す。6月と1月でDNA量に差異はあるものの、湾奥であるA点が他の地点に比べて高い値を示した。海草の被度が高い湾奥ではDNA量が多く、直下で海草の目視確認できなかった地点(H~J)、すなわち移流してきたeDNAを採水したと考えられる地点ではDNA量が少なくなった。アマモ、コアマモを区別した検出方法を適用した結果が図-5(b)である。アマモとコアマモの合計DNA量の傾向は図-5(a)と同様であり、コアマモの生育を確認しているA点以外では、アマモのeDNAが主であることが確認できた。1月のアマモ調査結果(表-2)より、NGSの結果はqPCRでDNA量が高い地点のみの検出に留まり、qPCRでは海草の生育密度が高い湾奥から低くなる湾口にかけてDNA量の低下傾向が得られたため、qPCRは現地結果と対応性が高いことを確認した。また、1月の分析では、F点のqPCRでは海草、アマモとともに周辺の地点に比べて高い値を示し、NGSでもアマモが検出される結果となった。現地調査では、F点のみ濁度がわずかではあるが高かった。他の項目や海底の目視観察では大きな差はなかったことから、生育分布とは別に、移流等の影響によりeDNAが集積した可能性も考えられる。

(4) 海草DNAの減衰試験結果

海草の減衰試験の結果を図-6に示す。減衰率は、pPCRで得られた値を分子とし、各溶液の0日における値を分母として算出した。約2日の経過日数で半減し、4~7日の経過で8割ほどが減少する傾向は同じとなつた。また、30日以上経過後、7日と同程度検出するケー

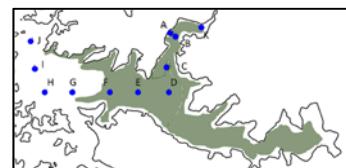
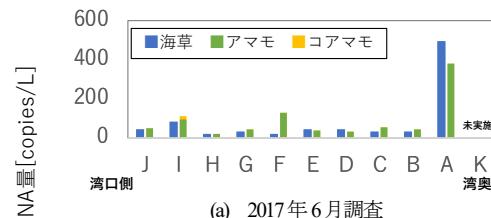


図-3 アマモ分布 (2017年6月調査)



図-4 アマモの生育状況 (2017年11月調査)



(a) 2017年6月調査

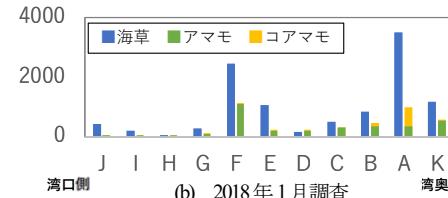


図-5 eDNA分析結果 (定量PCR解析)

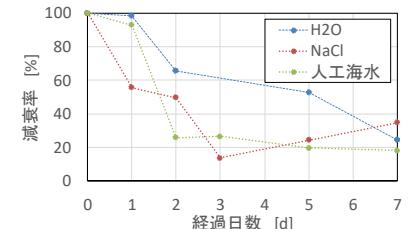


図-6 eDNAの減衰確認室内試験結果

表-3 2017年11月調査のeDNA分析結果

地點	水深[m]	アマモの目視観察		抽出液DNA量[ng/μl]	除去	除去後DNA量[ng/μl]	海草のeDNA分析	
		優占種	生育密度				NGS	qPCR [copies/L]
K	3.4	一年生 (発芽体)	低	4.9	なし	4.9	○	○ 1240
					あり	0.3	×	○ 680
L	5.4	多年生	高	7.3	なし	7.3	×	○ 1780
					あり	0.7	○	○ 1710

表-4 アマモの目視観察とeDNA分析結果 (NGS)

地点	J	I	H	G	F	E	D	C	B	A	K
水深[m]	14.2	12.2	11.3	10.5	9.6	8.7	8.4	7.5	5.1	1.2	3.4
6月被度[%]	0	0	0	5	5	20	10	10	10	20	40
NGS	○	×	○	×	○	×	○	○	×	×	×
1月被度[%]	0	0	0	5	5	20	10	10	10	20	40
NGS	×	×	×	×	○	×	×	×	×	○	○

表-5 コアマモの目視観察とeDNA分析結果 (NGS)

地点	J	I	H	G	F	E	D	C	B	A	K
6月被度[%]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
NGS	×	×	×	×	×	×	○	×	○	○	×
1月被度[%]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70	0
NGS	×	×	×	×	×	×	×	×	×	○	×

スもあり、植物片が混入した場合等に検出するものと考えられる。なお、試験結果では、蒸留水に比べ NaCl 水、人工海水では、qPCR で増幅する DNA 濃度が 4~5 倍高い値となった。蒸留水に比べ NaCl 水と人工海水では、ろ過速度が遅く、ろ紙上に回収される SS 分が目視により多いことを確認しており、塩分濃度によって、DNA 濃縮液の DNA や共存物質の性状が変化した可能性が考えられる。しかしながら DNA の分解の減衰率では溶媒による差は少ない結果となったため、3 つの試験結果の平均から減衰曲線を作成し、5 章の解析に用いた。

5. 流動解析

(1) 解析方法

アマモとコアマモのDNAが検出できる地点を予測することを目的として、3次元流動解析、および、流動解析結果に基づいた濃度の移流拡散解析を実施した。計算プログラムは、汎用水理プログラムDelft3D-flowを使用した¹²⁾。主な解析条件を表-6に示す。解析範囲は、図-1に示す英虞湾全体を対象とし、外海に面する湾口を開境界として潮位、塩分濃度、水温を与えた。移流拡散解析における濃度の初期分布は、鵜方および神明は前述の2010年度に調査されたアマモ場の平面分布情報⁸⁾、立神は2018年1月の潜水調査結果（図-1(b)）の範囲である図-1(a)の下層10%（10層目）に仮想物質濃度を設定した。濃度は助走計算後、採水日の5日前である2018年1月10から放出を与えた。放出は、放出時から濃度を与え続けた連続放出のケースと、干潮時の1時間に断続的に6回濃度を与えたケースを実施した。解析の対象期間は、2018年1月1日から採水日（1月15日）を含む16日までの15日間とした。海草のeDNAの減衰を確認した4.(4)節の結果から、アマモ場からeDNAが流れ出た場合、その5日後の平面分布がeDNAを検出できる範囲と考えた。

(2) 再現性の確認

流動解析の再現性は、著者らが観測しているA点、A点とは別の立神湾奥であるN点（図-1）の表層水温と公表されている英虞湾湾奥の観測水温¹³⁾（図-1、M点）の表層（0.5m）、底層（8m）を比較した。計算値では、いずれの点においても表層が日射や気温変化に伴い日に水温が上がる結果となった（図-7）。水深が浅く、気温の変化に応答しやすい湾奥（A、N点）では、観測値と計算値で水温の上昇傾向が概ね一致することを確認した（図-7）。図示はないが、M点の観測値は、助走計算期間は、A点、N点と同じく日に表層の気温が上がる傾向ではあったものの、濃度の放出が始まる1月10日から15日は、表層から底層まで温度分布がなく、直線的に下がった。平均気温が前週から3°C下がり、急激な水温

表-6 流動計算の解析条件

項目	内容	
計算領域	東西 10km×南北 8km	
平面座標系	座標系	直交直線座標系
	格子数/格子幅	18,997/40m
鉛直座標系	分割数	10層（σ座標系）
計算期間	2018年1月1日0時~1月16日0時	
水深	海図（海上保安庁）より作成	
計算時間間隔	3秒	
境界条件 (外洋)	潮汐	気象庁潮位実測値（尾鷲）
	水温	15°C
	塩分	表層 31% 底層 34% (Liner)
気象条件	気温/日射量	気象庁（南伊勢、名古屋）
	湿度/雲量	気象庁（津）
初期値	水温/塩分	9.5°C / 34%
濃度 (eDNA を模擬)	連続放出および断続放出 下層 10% (10層目)	

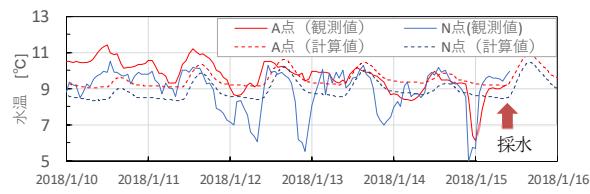


図-7 流動計算の出力値と観測値の比較（水温：表層 1m）

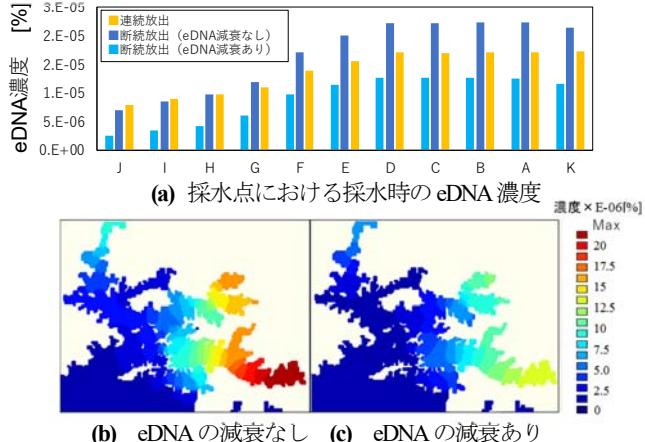


図-8 三次元濃度拡散解析結果（表層 1m）

低下により表層と底層が混合されたと考えられる。

(3) 三次元濃度拡散解析結果

三次元拡散解析結果の採水点における採水時のeDNA濃度と平面濃度分布を図-8に示す。図-8(a)から、eDNA濃度を連続放出したケースと断続放出したケースの傾向は同じであった。そのため、断続放出したケースに4.(4)節から得られたeDNAの減衰曲線の値を用いて断続放出した1回毎の濃度を一律に減衰させた。eDNAの減衰なしと減衰ありを比べると、湾奥から湾口に向かい濃度が低下する傾向は同じであった（図-8(b), (c)）。三次元拡散解析結果（図-8(a)）とアマモのeDNA分析結果（図-5(b)）を比べると傾向は類似しており、eDNAが減衰した場合でも拡散する傾向を確認することができた。拡散解析は、全体のeDNA濃度の分布を評価す

るには適用可能であると考えられるが、F点のような特異点の再現性は低いことが明らかとなった。

6. まとめ

1月のアマモ調査結果（表-4、図-5）から、NGSはqPCRでDNA量が高い地点のみの検出に留まり、qPCRでは海草の生育が多い湾奥から少なくなる湾口にかけてDNA量の低下傾向が得られたため、qPCRが現地結果と対応性が良いことを確認した。また、室内試験から得られたDNAの減衰過程を取り入れたeDNAの拡散解析では、分析結果と相関が得られた。流動解析とeDNA分析による分布評価について適用の可能性が示唆された。

eDNA分析は、DNA抽出方法、前処理方法の検討や分析機器の発展も目覚しいため、様々な技術の進歩に伴い検出感度は改善していくものと考えられる。存在形態や減衰期間などの把握を進め、得られたeDNA情報に適した数値解析モデルを検討することが重要となる。室内試験や現地調査と数値解析との比較を継続し、海草場のモニタリング手法の確立に向けて検討を続けて行きたい。

参考文献

- 1) 高原輝彦、山中裕樹、源利文、土居秀幸、内井喜美子: 環境DNA分析の手法開発の現状~淡水域の研究事例を中心にして~, 日本国生態学会誌, Vol. 66, pp.583-599, 2016.
- 2) Turner CR., Barnes MA., Xu CCY., Jones SE., Jerde CL., Lodge DM., Gilbert M.: Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. Methods in Ecology and Evolution, 5, 676-684, 2014.
- 3) 赤松良久、乾隆帝、一松晃弘、河野聰仁、土居秀幸: 環境DNAを用いた河川内の魚類現存量推定に関する基礎的検討、土木学会論文集B1(水工学), Vol. 73, No.4, pp.I_1111-I_1116, 2017.
- 4) Watanabe, K. and Kuwae, T.: Radiocarbon isotopic evidence for assimilation of atmospheric CO₂ by the seagrass *Zostera marina*, Biogeosciences, 12, pp.6251-6258, 2015.
- 5) 水産庁:アマモ類の自然再生ガイドライン, 3, pp.22-26, 2007.
- 6) Hamaguchi, M., Shimabukuro, H., Hori, M., Yoshida, G. and Terada, T.: Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) and droplet digital PCR duplex assays for detecting *Zostera marina* DNA in coastal sediments, Limnol. Oceanogr., 16, pp.253-264, 2018.
- 7) 高山百合子、赤塚真依子、伊藤一教:海草場を対象とした環境DNAと潮流解析に関する一考察、土木学会論文集B2(海岸工学), vol.73, No.2, p. I_1267-I_1272, 2017.
- 8) 三重県:平成22年度藻場・干潟等分布状況マップ作成委託業務報告書, 2011.
- 9) Yamanaka, H., Motozawa, H., Tsuji, S., Miyazawa, R.C., Takahara, T., Minamoto, T.: On-site filtration of water samples for environmental DNA analysis to avoid DNA degradation during transportation, Ecological Research, Vol.31, 6, pp.963-967, 2016.
- 10) Yamamoto, S., Masuda, R., Sato, Y., Sado, T., Araki, H., Kondoh, M., Minamoto, T. and Miya, M.: Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea, Scientific Reports, 7, 40368, pp.1-12, 2017.
- 11) McKee, AM., Spear, S.F., Pierson, T.W.: The effect of dilution and the use of a post-extraction nucleic acid purification column on the accuracy, precision, and inhibition of environmental DNA samples, Biological Conservation, 183:70-76, 2015.
- 12) Deltares: Delft3D-FLOW User Manual, p.672, 2014.
- 13) 三重県:三重県真珠関係養殖漁場水温モニタリングシステム, <http://www.ohyamanet.info/~m-shinkyo/index.php>.

(2018.3.15 受付)

STUDY ON APPROPRIATE ENVIRONMENTAL DNA AND APPLICABILITY OF TIDAL FLOW ANALYSIS FOR SEAGRASS BED

Maiko AKATSUKA, Yuriko TAKAYAMA, Kazunori ITO, Teppei MORITOMO and Toshifumi MINAMOTO

Environmental DNA(eDNA) analysis is one of the methods of obtaining biological information in water bodies. Since sampling consists of drawing about 1L of water from near the surface, field work is very simple compared to conventional biological survey methods such as diving. However it is dilute DNA released in a wide area, various factors may affect the detection of environmental DNA. We are in the process of developing seagrass bed monitoring method combining flow analysis and eDNA. In this study, we tried to evaluate two method of eDNA analysis, a next-generation sequencing (NGS) and quantitative PCR (qPCR), from the results of field survey at 11 sites. While NGS was detected several points, and qPCR gradually decreased from a high value as it moved away from the seagrass field. In addition, we conducted numerical simulation for advection diffusion analysis with the eDNA attenuation process of seagrasses obtained from the laboratory test. Since the result was consistent with the trend of qPCR analysis, the possibility of application of distribution evaluation by eDNA analysis and flow analysis was suggested.