



海草場を対象とした環境DNAの季節変化と環境DNA分析における採水量の検討

赤塚, 真依子 ; 高山, 百合子 ; Muchevbe, Edwin ; 伊藤, 一教 ; 渡辺, 謙太 ; 桑江, 朝比呂 ; 源, 利文

(Citation)

土木学会論文集B2(海岸工学), 76(2):I_943-I_948

(Issue Date)

2020

(Resource Type)

journal article

(Version)

Version of Record

(Rights)

© 2020 公益社団法人 土木学会

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/90007897>



海草場を対象とした環境DNAの季節変化と 環境DNA分析における採水量の検討

赤塚 真依子¹・高山 百合子²・Edwin MUCHEVBE²・伊藤 一教³
渡辺 謙太⁴・桑江 朝比呂⁵・源 利文⁶

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)

⁴港湾空港技術研究所 沿岸環境研究グループ (〒239-0826 神奈川県横須賀市長瀬3-1-1)

⁵正会員 港湾空港技術研究所 沿岸環境研究グループ (〒239-0826 神奈川県横須賀市長瀬3-1-1)

⁶神戸大学大学院 大学院人間発達環境学研究所 (〒657-8501 神戸市灘区鶴甲3丁目11)

海草場の変化を捉えるモニタリング方法として環境DNAの活用を目指し、海草量の季節変化に伴うeDNA量の変化を把握することを目的に、水槽に生育するアマモを対象に15ヵ月の生育観察と環境DNA分析を実施した。また、実海域でのモニタリングに向けて、潮汐による流れの変化がある環境下で、季節変化の差に対して採水地点や同時刻に採水した差がどの程度であるのか調査した。15ヵ月のモニタリングでは、環境DNA量が夏に高い値を示し秋に低下する周期性を確認でき、海草が流出する時期に高くなる可能性が明らかになった。実海域調査では、同時刻に採水した1Lの分析で検出の有無が混在する結果となったが、採水量や分析量を増量し、阻害影響を低減することで定量下限を超えた値の検出が可能となり、実海域調査への適応が期待できる結果を得られた。

Key Words : environmental DNA, seagrass, seasonal, amount of sampling, inhibition

1. はじめに

水域の生物情報を入手する手法として注目されている環境DNA (以下、eDNA) 分析は、現地での作業が採水となる。採水試料をろ過し、ろ紙の残差物から抽出したDNAを増幅させ、特定の生物種の有無や特定の生物群の種類を得る方法である。環境DNAを活用した事例としては、DNA増幅の有無による閉鎖性水域での希少種¹⁾の生息地調査や、DNA配列を解析する手法による河川や海での魚種調査²⁾などが始まっている。河川では、アユ³⁾やサクラマス⁴⁾の遡上、産卵とeDNA量の増減の関係が得られ、水域生物の生活史の変化をeDNA分析で観察できる可能性が報告されている。

アマモ、コアマモ等の海草群落は、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であることや、海中に生育しているアマモが大気中のCO₂を吸収することから、重要視されている⁵⁾。高度経済成長期に沿岸開発等の影響で植生面積は減少したため、沿岸域の持続可能な開発にむけてアマモ場の保全や分布の把握が重要となっている。特に、広範囲に分布するアマモ場を効率的に把握する調査方法が求められている。

著者らは、eDNAを活用した海草場モニタリング方法

の開発を目指している⁶⁾。水槽実験から枯死期の生物量減少とeDNA量の低下に相関があること、実海域の海草場を対象とした調査でeDNAが海草場から検出されることが報告されている⁷⁾。季節によって生活史に変化がある海草場をモニタリングするためには、海草の季節変化とeDNA量の関係が重要となるが、1年を通した海草の生長とeDNA量の関係は明らかになっていない。また、実海域でのモニタリングに向けては、潮汐による流れの変化がある環境下で、季節変化の差と採水地点や採水時間による差を把握する必要がある。実海域で海草のeDNA量を対象とした調査では、海水1LのeDNA量は定量下限以下と低く、採水地点や生育状況の差の傾向を示している⁸⁾。eDNA分析の一つである定量PCR (以下、qPCR) は、DNAをポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で増幅させ、所定のDNA量になる増幅速度からeDNA量を定量する。eDNA量が少ない場合には初期の反応差によって検出の有無や値のばらつきが大きくなる。eDNA量が少ない試料の分析を改善するためには、分析対象とするeDNA量を増やすことが対策として考えられ、採水量の増量、qPCR分析でDNA抽出液から分取する分析量の増量が挙げられる。しかしながら、採水量等を増やすと、分析時にDNAの増幅を阻害する物質 (海水に含まれる腐植物

質等の夾雑物⁸⁾も増えることが懸念される。

本研究では、海草の季節変化に伴うeDNA量変化を把握するため、生育環境を制御した水槽に生育するアマモを対象としたeDNA分析を15ヵ月間実施した。実海域のモニタリングに向けた検討として、採水地点や採水時刻など採水条件によるeDNA量の差を確認するため、三重県英虞湾で海草場の調査および11地点での採水、定点での連続採水を実施した。また、eDNA量が低い試料を分析するため、海草が生育する水槽と東京湾南西部の海水を用いて、採水量、分析量と分析阻害対策を検討した。

2. 実験および調査方法

(1) 海草の季節変化に伴うeDNA量変化の観察

4章の海草の季節変化に伴うeDNA量変化を把握するため、2018年7月～2019年9月までの15ヵ月間、週2回、アマモが生育する水槽の表層から採水した。本実験水槽(図-1)の海水交換は、下潮時に海水を排水し、上潮時に新しく汲み上げた海水が流入する仕組みである。海水の交換頻度は、2018年度は平日週8回、2019年度は月曜午後、火曜午前・午後、金曜午前の週4回であった。新しい海水が流入する直前の干潮時に水槽内の海水と海草の接触時間が一番長くなることを考慮し、水曜と金曜の干潮時に採水を基本とした。採水後、海水1Lをガラス繊維ろ紙(0.7 μ m)でろ過し、ろ紙を-20 $^{\circ}$ Cで冷凍し、3章(1)(2)の方法で分析した。

アマモの観察として、草丈、密度、水温を計測し、2019年4月以降は海草の浮遊を記録した。草丈は、2018年度は5株、2019年度は地下茎株と発芽体を5株ずつ、任意に図-1(a)およびIIIの領域の草体を計測した。密度は、観察窓近くの図-1(a)IVの位置に設置した観察区画(20cm \times 20cm)の3か所で計測した。草体の脱落部は、2018年度は水槽から日々除去し、2019年度は採水後に除去した。海草の推定生物量は、密度として株数のみを計測したため、葉が抜けた影響を実測値からは反映できないことから、2009年に水槽に生育しているアマモを観察した草幅、葉数、LMA(Leaf Mass per Area)の月毎の代表値¹⁰⁾を引用した。計測した草丈、密度に水槽の床面積、草幅、葉数、LMAを乗じて推定生物量とした。

(2) 実海域調査における採水条件の影響確認

5章では、三重県英虞湾(図-2(a))の海草が生育する立神地区を調査した(図-2(b))。本海域では、アマモ、コアマモの生育が確認されている。アマモは、一年生が優占種であることから、分布域や密度が変化する海域である。2019年6月調査では、調査対象とし立神地区の海草分布把握を目的にROV(TELEDYNE製、LBV2004)で水中観察した。採水点直下は、潜水による目視観察を

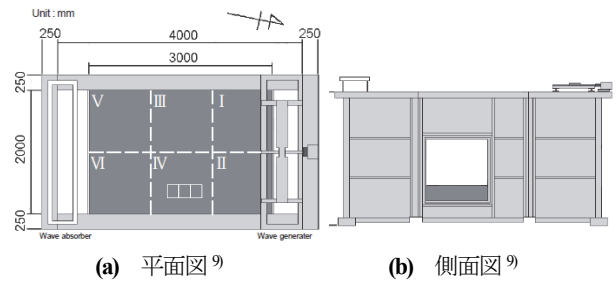


図-1 アマモが生育する実験水槽

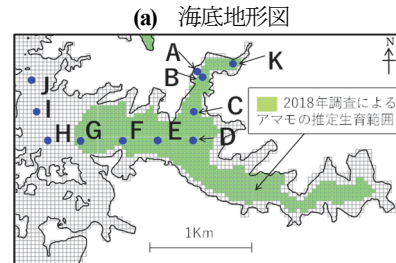
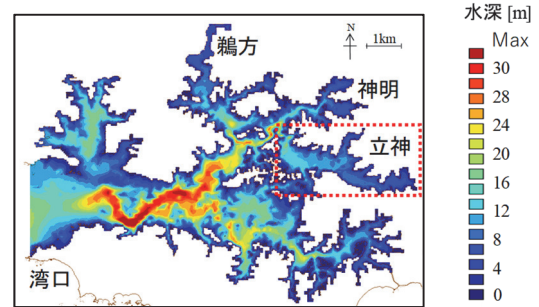


図-2 三重県英虞湾

行い、アマモの被度、草丈、株数(50cm \times 50cm)を記録し、船上から水深を測定した(HONDEX製、PS-7)。

採水地点の差の確認のため、湾口側であるJ点から湾奥のK点まで約3km間の11地点で、干潮から約1時間かけて、船上からバンドン式採水器で採水した(水面下1m)。また、短い時間での差を確認するため、C点において、干潮(6:24)から約3時間後の上潮時に1時間、10分毎の定点採水を実施した。その際、eDNA量の同時刻に採水した試料差を確認するため、1回当たり3度採水した。海水は1Lずつ容器に分注し、DNA分解を抑制するため塩化ベンザルコニウム10w/v%水溶液を1ml添加後¹¹⁾、冷蔵輸送した。採水した翌日にガラス繊維ろ紙(0.7 μ m、 Φ 47mm)で1Lをろ過し、ろ紙を冷凍(-20 $^{\circ}$ C)し、3章(1)(2)の方法で分析した。

(3) eDNA分析条件の検討

6章での定量下限(1000copies/L)以下となる試料の定量分析を検討するため、採水量、qPCRの分析量、DNA抽出液精製の有無の条件を変えて分析した(表-1)。コアマモが生育する水槽とアマモが生育する東京湾の海水を用いて、1~20Lの海水を1枚のガラス繊維ろ紙(0.7 μ m、 Φ 47mm)でろ過し、冷凍保存した。コアマモが生育する水槽の海水を用いた検討では、11月に予備検討として

1L, 10Lの海水を1試料ずつろ過し, 1月の検討では, 1L, 10Lの海水を3試料, 20Lの1試料をろ過した. 東京湾の海水は, 1L, 5Lのろ紙を3試料ずつろ過した. ろ紙上の残渣物から得たDNAの抽出液のうち2 μ Lまたは5 μ Lを分取し, qPCR分析した. 阻害対策として, 抽出液中のDNAを磁性ビーズ (Agencourt AM Pure XP, BECKMAN COULTER製) に吸着させ, 夾雑物を含む溶出液を一度廃棄し, 新しい溶出液に溶解させることで精製した. 阻害影響の有無は, 3章(3)の方法で確認した.

3. eDNA 分析方法

(1) eDNAの抽出

eDNA の抽出手順を図-3 示す. 抽出試薬として DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN 製) を用い, それぞれのろ過量の海水をろ過したろ紙から DNA を溶出させ, ろ紙を除去後に DNA を析出した. 析出した DNA を吸着カラムに吸着後, DNA を 100 μ L の溶出液に溶解させ, DNA 抽出液を得た. 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, 採水地点毎に次亜塩素酸ナトリウム 0.5%溶液に 5 分間浸漬後, 洗浄して使用した.

(2) qPCR分析

海草の eDNA 量は, qPCR (Thermo Fisher Scientific 製, QuantStudio 6) で分析した. プライマーおよびプローブとして, アマモは, matK 領域 (131bp) の F (5'-GCTTCTTTTCCCTTACACGAG-3'), R (5'-A-ACCTTCAACCCCGTT-3'), P (5'-FAM-TTCATGGATTGGTTGATATAT-MGB-NFQ), コアマモは, matK 領域 (182bp) の F (5'-TATTCATGATTGGTCGTGAGAATA-3'), R (5'-TGCACACACGACTTTCCTATG-3'), P (5'-FAM-ACTGAGTAGTCTTCTTATACTTT-MGB-NFQ) を用いた⁹⁾. qPCR は, 50°Cで 2分, 95°Cで 10分の加温後に, 95°Cで 15秒, 60°Cで 60秒を 55 サイクルとした. 反応液は 2xEnvironmental Master Mix 10 μ L, AmpErase 0.1 μ L, Primer F

900nM, Primer R 900nM, Probe 125nM, DNA 鋳型として抽出液 2 μ L を SDW (Sterile Distilled Water) で 20 μ L とした. 分析量の検討では, DNA 鋳型を抽出液 5 μ L とし, SDW の量を減らすことで 20 μ L に調整した. 1 枚のろ紙から得られた抽出液毎に 3 反復で分析し, 非検出は 0copies/L として, その平均値を分析結果とした. PCR とは, 増幅反応 1 サイクルで DNA が倍量になる反応であり, qPCR は n 回の PCR で 2ⁿ倍に増加し, 所定の DNA 量になるまでの反応回数(Ct 値)から定量する. qPCR の検量線は, Δ Ct 値が 0.3 以下となる 10³copies/L 以上の 10 の n 乗の濃度で作成したため, のオーダーが変わるほどの変化を増減と考えた.

(3) 分析阻害の確認

PCR では, プライマーが鋳型となる DNA と結合し, DNA を増幅させるが, 腐植物質など夾雑物が DNA 抽出液に含まれる場合, DNA と形状が似ている腐植物質にプライマーが吸着することで反応を阻害することがある. 腐植物質は海草や海水にも存在するため, 分析阻害の有無の確認として, コアマモの分析では既知濃度のアマモの人工遺伝子, アマモの分析では既知濃度のコアマモの人工遺伝子 (1 \times 10³copies/ μ L, 2 μ L または 5 μ L) を用いて qPCR 分析を実施した. 3 章(2)の PCR 反応液組成のうち DNA 鋳型として添加する DNA 抽出液と人工遺伝子を添加し, 総量を SDW で 20 μ L に調整した.

4. 水槽内の海草と eDNA の季節変化

(1) アマモの季節変化

アマモが生育する水槽では, 2018 年 7 月~9 月にかけてアマモの草丈, 密度が低下し, 生物量が減少した (図-4(a), (b)). 2018 年 10 月から地下茎株由来の草体が図-1(a)I, IIの領域で 10~20 株程が生長し, 12 月から発芽体が水槽全体で生長した. 2019 年冬に水温が 10°C以上の日が続き (図-4(e)), 発芽した多くの草体が 10cm 未満で転倒や枯れ, 密度が低下した. 地下茎株から生長した草体は 2019 年春に最大 150cm 程, 発芽体から生長した草体は 2019 年夏に 50cm 程が最大となった.

図-4(c)に算出した水槽内の推定生物量を示す. 海草の推定生物量は, 2018 年夏から秋に減少した. 冬から春に地下茎株の生長, 春から夏に発芽体の生長により増加した. 4 月以降, 生物量があまり増えず, 6 月から 9 月上旬に草丈の減少や密度の低下する時期に合わせて生物量が減少となった. 2018 年, 2019 年の 7 月の生物量を推定生物量, 写真から比べると, 2018 年の海草の生物量 (写真-1(a)) は, 2019 年 (写真-1(b)) に比べて多かった. 2019 年 4~5 月上旬および 6 月下旬~9 月上旬に草体脱落部の浮遊を確認した. 2019 年 5 月に種を付けたア

表-1 各分析における条件一覧

	採水場所	対象	ろ過量	分析量	磁性ビーズ
4章	水槽	アマモ	1L	2 μ L	無
5章	英虞湾	アマモ コアマモ	1L	2 μ L	無
6章	水槽	コアマモ	1L, 10L, 20L	2 μ L 5 μ L	有・無
	東京湾	アマモ	1L, 5L	2 μ L	有

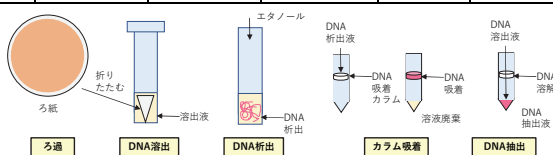


図-3 eDNA の抽出手順

マモの草体を確認し、翌週には抜けて流出したことから、前半の海草の浮遊は、種を含む草体の流出、後半は水温が高くなったことによる枯死と考えられ、8月後半に残っていた草体の大半が数日間で流出した（写真-1(c））。

(2) eDNAの季節変化

eDNA の分析結果を示す（図-4(d)）．アマモの eDNA 量は、2018 年 7～8 月に高い値を示し、秋以降、3 月まで定量下限以下となった．3 月中頃から定量下限を超える値となり、4～6 月にかけて eDNA 量は増加した．2019 年も 2018 年と同じく 6～8 月に高い値を示し、9 月は定量下限前後の値となった．eDNA 量が夏に高くなり、秋にかけて低下する周期性が示唆された．7 月前後に一度高くなった eDNA 量が低下し、再び上昇する傾向は、2018、2019 年ともに確認された．eDNA 量が高い 6～8 月の値は、2018 年に比べ、2019 年が数倍高い値となった．その要因としては、2019 年は 2018 年に比べ、早い時期に水槽内の草体が枯死したことや海水交換頻度が半減したことが挙げられる．水中に放出された海草の eDNA は、1 週間程で分解され非検出になることから⁹⁾、前週の影響は小さいと考えられる．

分析阻害影響を 2019 年 4～9 月の試料についてコアマモの人工遺伝子を用いて確認した結果、人工遺伝子のみの Ct 値±0.5 以下となり、局所的な分析阻害はなかった．Ct 値は、DNA を所定の DNA 量まで増幅するための PCR サイクル数であり、既知濃度の試料の分析で Ct 値が高くなることは、PCR が阻害されたことを意味する．同じ週に採水した試料の分析値は概ね同値を示し、定量下限以上の場合は、3 反復した値の ΔCt 値が 0.3 以下となったことから再現性のある値と判断した．

(3) 海草の生物量と eDNA の関係

図-6 に水槽内のアマモの推定生物量と eDNA の関係を示す．水槽から海草が脱落し、生物量が減少する枯死期（7 月～9 月）の生物量と eDNA 量の関係をみると、2018 年は、概ね正の傾向（図-5(a), (d)）が得られ、2019 年は、対数表示で正の傾向（図-5(d)）となった．eDNA 量は、2019 年 8 月 23 日に 15 ヶ月間で一番高い値を示した．前週まで約 1 か月かけて 1×10^5 copies/L から 1×10^3 copies/L 前後の値に低下傾向であったが、8 月 23 日、25 日には 1×10^5 copies/L を超え、翌週以降は 1×10^3 copies/L 前後の値となった．図-4(c)に示すように、8 月 23 日は浮遊した海草量が多い時期だった．2018 年は日々浮遊した海草を除去していたが、2019 年は採水日の除去となったため、2018 年に比べ 2019 年に eDNA 量が高い値を示した要因の一つとして、浮遊している海草から DNA が供給された可能性も考えられる．流出量の観察を目視観察に留めたため、流出量との詳細な比較はできないが

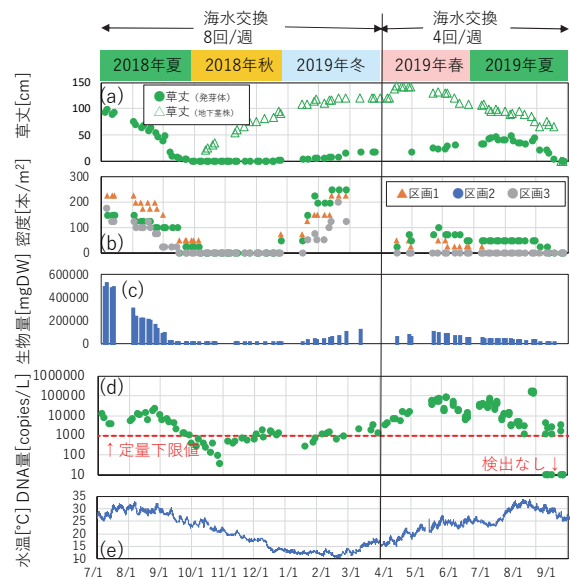


図-4 アマモの水槽観察と eDNA 分析結果

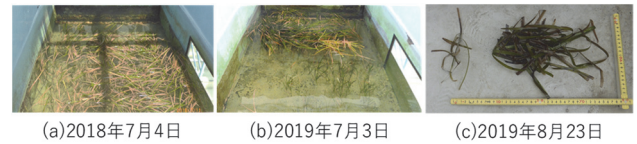


写真-1 水槽の観察写真

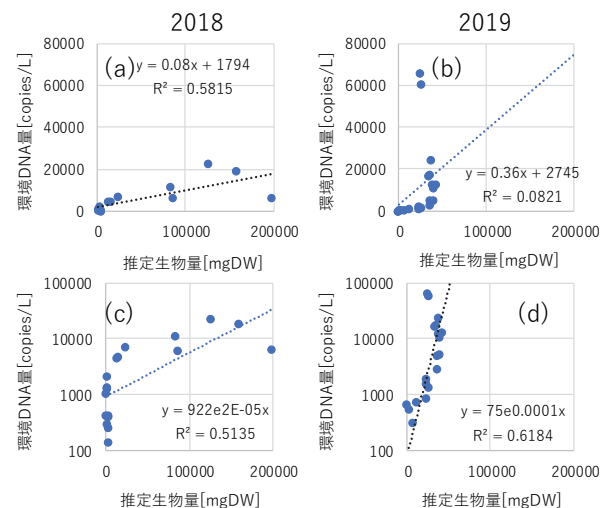


図-5 水槽内の生物量と eDNA 量の関係（枯死期）

4～5月上旬 6月下旬以降の草体が流出した時期に eDNA 量が高くなる傾向を示しており、海草の eDNA 量は、海草の草体総量との相関関係の他に、種子株や枯れによる流出など、海草の変化に対応する可能性が示唆された。

5. 英虞湾調査結果

(1) 海草の現地調査

海草の分布調査結果を表-2に示す．採水地点の直下を潜水目視で観察した結果では、2017年6月には採水点 A-G付近まで被度5～40%のアマモを確認していたが⁹⁾、2019年6月はコアマモの群落があるA点と水深8m前後のC、

D点でアマモの被度5%以下の生育を確認したのみで、その他の採水点付近ではアマモの生育を確認できなかった。コアモは、A点と小別当など小さい入り江で局所的な生育を確認した。ROV調査では、13kmの航跡を調査し、潜水目視の結果を基準に画像から、入り江の西側で被度10~30%、中央部や採水地点C、D付近で被度5%以下のアマモの生育を確認した(図-6)。

(2) eDNA分析結果

11地点における干潮時のeDNA分析結果を図-7(a)に示す。湾奥から湾口に向かうKからJでは、KからG地点までアマモのDNAを検出し、H-JではDNAの検出なしとなった。コアモはK点とE点での検出となった。C点において定点採水した結果を図-7(b)に示す。1つの試料につき3反復分析した値の平均を示している。同じ時刻に採水した試料を比較すると、DNAが増幅しない非検出と定量下限以下の値が混在する結果となった。C点における1時間の値の変動幅は、干潮時に調査した11地点の値と同程度となり、今回の調査、分析方法では、調査地点や時間の影響の確認ができないことが明らかとなった。その理由の一つとして、海域における海草のeDNA量が希薄であることが考えられる。この海域でeDNA量の変化を把握するためには、eDNA量が低い試料を対象とした分析方法の検討が必要であることが明らかとなった。

6. eDNA分析条件の検討結果

水槽に生育するコアモを対象として採水量と分析方法を予備検討した結果を図-8に示す。縦軸は分析値から1枚のろ紙に回収されたDNA量に換算した採水量あたりの値である。4章、5章の分析方法(採水量:1L,分析量:2 μ L)で検出なしとなった海水を対象とし、採水量を10Lに増加してろ過、分析した結果、定量下限を超えた値を得た。また、分析量を5 μ Lとした検討では、1L,10LともにDNAの増幅を確認できたが、10Lでは分析量2 μ Lの値より低かった。精製後の分析値は、5 μ Lで1L,10Lともに精製前より高くなった。このことは、分析量を5 μ Lとした分析では分析阻害の影響があり、精製によって影響が低減されたと考えられる。

試料の差を確認するため、コアモが生育する水槽水(図-9(a))、アマモが生育する実海域の海水(図-9(b))のろ紙を各3枚ずつ、分析量5 μ L、精製ありの条件で分析した。縦軸は分析値から1枚のろ紙に回収されたDNA量に換算した採水量あたりの値である。ろ過量が1Lの場合では、1枚のろ紙の分析で検出の有無が混在したり、定量下限前後の値となった。採水量を5L,10Lと増やすと、いずれの結果でもDNAの増幅が確認できた。

eDNA量や分析阻害影響が異なる時期の採水量の値と

表-2 海草の分布調査結果

	採水時間	水深 m	アマモ被度%	海草 (ROV) 被度%
K	7:40	3.6	0	0
A	7:34	1.2	5%以下	5%以下
B	7:29	3.4	0	0
C	7:24	7.3	5%以下	5%以下
D	7:18	8.1	5%以下	5%以下
E	7:13	8.6	5%以下	未計測
F	7:09	9.2	0	未計測
G	7:03	10.1	0	未計測
H	6:58	10.8	0	0
I	6:42	11.7	0	0
J	6:35	13.5	0	0

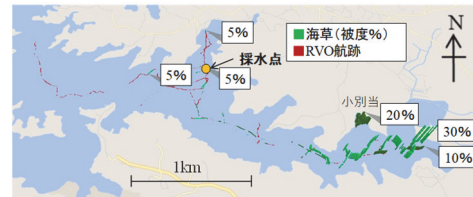


図-6 ROVの航跡と海草の被度

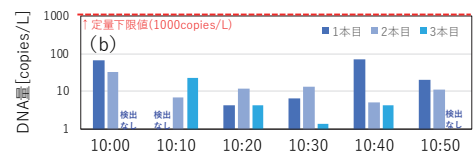
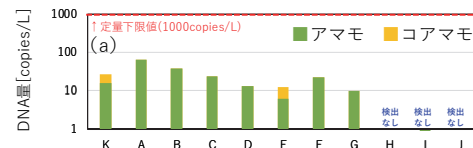


図-7 環境DNA分析結果(三重県英虞湾)

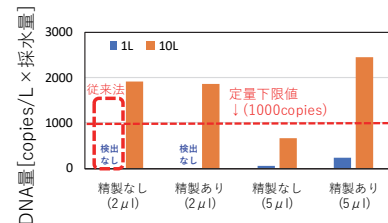
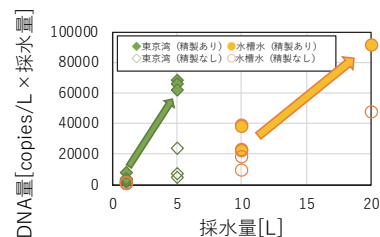
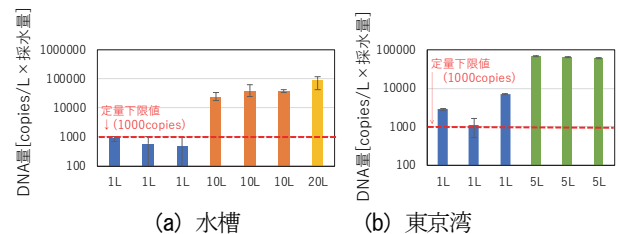


図-8 採水量と分析方法(分析量,精製)の比較



(c) 採水量と環境DNA量の関係

図-9 採水量と分析方法の検討

直線性があるのか、アマモとコアマモのように生物種が異なる場合の傾向の比較など、今後検討する必要はあるが、採水量を増やすことで、eDNA量は高い値を示し、試料差も低減する傾向が得られた(図-9(c))。英虞湾においては、C点の分析結果から推察すると、10~50Lなど、数十Lの採水量確保や分析方法の検討により、定量下限を超えた値が検出できる可能性が得られた。富栄養化が進んだ海域など過量の確保が難しい場合は、複数枚のろ紙にろ過などにより対応できると考えられる。

7. まとめ

本研究では、海草の季節変化に伴ってeDNA量は夏に高くなり、秋に低下する周期性が得られた。今後、海草の広範囲や頻繁な調査が難しい海域において、季節変化を捉えられる頻度でeDNA量を定点モニタリングすることにより、海草の繁茂や枯死を把握でき、潜水調査など従来の調査に比べて現地での作業労力の省力化に寄与できると推察できる。採水する季節や海域によっては採水量が1Lでは足りない可能性もあるが、数tなど大掛かりな採水量ではなく、数十L程度で実現できる見込みも得られた。現地のeDNA量と阻害の影響度を確認し、採水量や分析量を計画する重要性が明らかとなったため、現地調査での課題の整理は継続して検討する必要がある。

参考文献

- 1) Sakai, Y., Kusakabe, A., Tsuchida, K., Tsuzuku, Y., Okada, S., Kitamura, T., Tomita, S., Mukai, T., Tagami, M., Takagi, M., Yaoi, Y. and Minamoto, T.: Discovery of an unrecorded population of Yamato salamander (*Hynobius vandenburghi*) by GIS and eDNA analysis, *Environmental DNA*, Vol.1, 3, pp.281-289, 2019.
- 2) Yamamoto, S., Masuda, R., Sato, Y., 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, 2017.
- 3) 河野誉仁, 赤松良久, 乾隆帝, 後藤益滋, 山口皓平: 環境 DNA 分析により得られた夏季のアユの生息状況と河川水温の関係性の検討, 土木学会論文集 G (環境), vol.74, No.7, pp. III_457-III_462, 2018.
- 4) 赤塚真依子, 高山百合子, 伊藤一教: 河川における環境 DNA を活用した魚類遡上のモニタリングに関する検討, 第 47 回土木学会関東支部技術研究発表会, II-42, pp.1-2, 2020.
- 5) Watanabe, K. and Kuwae, T.: Radiocarbon isotopic evidence for assimilation of atmospheric CO₂ by the seagrass *Zostera marina*, *Biogeosciences*, 12, pp.6251-6258, 2015.
- 6) 赤塚真依子, 高山百合子, 伊藤一教, 渡辺謙太, 桑江朝比呂, 大澤亮介, 森本哲平, 源利文: 海草場を対象とした環境 DNA の季節変化・日変化・形態変化に関する基礎研究, 土木学会論文集 B2 (海岸工学), vol.75, No.2, pp. I_1075-I_1080, 2019.
- 7) 高山百合子, 赤塚真依子, 伊藤一教, 源利文: 環境 DNA を活用した固着性水生生物モニタリング手法の成立性について, 土木学会論文集 B2 (海岸工学), vol.75, No.2, pp. I_1087-I_1092, 2019.
- 8) 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, pp.70-76, 2015.
- 9) 細川真也, 三好英一, 内村真之, 中村由行: メソコスム水槽におけるアマモ地上部の現存量と生長・脱落速度の季節変動, 考案空港技術研究所報告, vol.45, No.3, pp.25-45, 2006.
- 10) 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.

(Received March 16, 2020)

(Accepted July 27, 2020)

SEASONAL CHANGES IN ENVIRONMENTAL DNA IN SEAGRASS BEDS AND EXAMINATION OF WATER SAMPLING PROCEDURE

Maiko AKATSUKA, Yuriko TAKAYAMA, Edwin MUCHEVBE, Kazunori ITO, Kenta WATANABE, Tomohiro KUWAE and Toshifumi MINAMOTO

The utilization of environmental DNA(eDNA) is being considered as a new method for monitoring seagrass beds. To understand the change in eDNA corresponding to seasonal variations in seagrass, the growth of *Zostera marina* inhabiting inside a water tank along with the amount of eDNA were investigated for fifteen months. Furthermore, investigations were performed under conditions where the flow changes due to the tide for the future monitoring in the sea. The investigations focused on the difference of the eDNA collected at different sampling points and at the same time of a day on the seasonal changes.

The fifteen month monitoring confirmed that the concentration of eDNA was high in the summer season which suggests that it is related to the increase in the amount of seagrass biomass and its release. As a result of the survey in the sea, the samples taken at the same time of a day showed a mixture of detection and non-detection. However, by increasing the amount of water sampled by 10 times, and the amount of analysis by 2.5 times, and also by reducing the inhibition effect, detection was possible. Additionally, the results showed the possibility of applying the method in this study for future surveys in the sea.