



藻場モニタリングのための環境DNA分析プロトコル作成に向けた検討

赤塚, 真依子 ; 高山, 百合子 ; ムチエブエ, エドウィン ; 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, 77(2):I_895-I_900

(Issue Date)

2021

(Resource Type)

journal article

(Version)

Version of Record

(Rights)

© 2021 公益社団法人 土木学会

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/90009169>



藻場モニタリングのための 環境DNA分析プロトコル作成に向けた検討

赤塚 真依子¹・高山 百合子²・ムチェブエ エドウィン²・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 (Corresponding Author)

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 人間発達環境学研究所 (〒657-8501 神戸市灘区鶴甲3丁目11)

環境DNAを活用した藻場の増減を捉えるモニタリング方法の開発には、採水、分析手順のプロトコル化が重要である。これまでの研究で、現地調査での海草の環境DNA量は、1 Lの海水を用いる従来法で定量下限以下となり、ろ過量を増やし、環境DNAを多く回収することで定量分析が可能になることを確認してきた。しかしながら、現地調査で想定される懸濁物質等により必要量をろ過できない場合の対策法は確立されていない。本研究では、低濃度で懸濁物質が多い試料から海草のDNAを多く回収する方法を検討し、現地調査に適応可能な分析方法の有効性を確認した。また、コアモ場の入り江を対象に数値計算を実施し、採水に適した時間帯が地点毎に異なり、現地調査に向けて採水地点、時刻選定が重要であることを示した。

Key Words : environmental DNA, seagrass, biological survey, sampling method, quantitative PCR

1. はじめに

水域生態系を保全し持続可能な水域利用を行うためには、水生生物をモニタリングし、生物種や生物量の増減などを広く把握することが重要である¹⁾。水生生物の調査は、従来、潜水目視が主であることから調査にかかる労力は大きく、調査範囲や頻度は限られることが多い。環境DNA分析は、調査地における作業が採水のみであり、採水試料をろ過し、ろ紙上の残渣物から特定のDNAの増幅を調べることで、水域に生息する生物種の情報を得る手法である²⁾。従来の水生生物の生物種調査や時空間的分布調査に活用できれば、これまでより広範囲、高頻度な水生生物調査が実現できる。

海洋の生態系保全で重要視される藻場は、高水温等の影響により地域や年ごとの衰退の変化が大きく、藻場の生育状況や分布を効率よく把握する手法の重要性が増している³⁾。広域な藻場の調査方法として衛星写真やドローンによる海上からの画像の活用が始められているが、水深が深い場所の調査や生物種の識別等の把握は困難である⁴⁾。環境DNAはこれらの弱点を補完できる可能性がある⁵⁾。環境DNAを活用する意義は大きいと考えられる。

そこで著者らは、環境DNAを活用した藻場モニタリ

ング方法の開発を目指し、水槽実験、室内試験、数値計算の3つの観点で検討を続けてきた^{5,7)}。

水槽実験では、アマモを対象とした15ヶ月間の観察から季節変化により環境DNA量が変化すること、枯死期に流出するアマモの減少と環境DNA量低下の相関が得られ、環境DNAの増減により藻場のモニタリングができる可能性を報告した⁵⁾。この際、コアモモが生育する水槽からも同時期に試料を採取、分析したが、コアモモのDNA量は約8割の試料が定量下限以下になり、アマモと同じ分析方法では明確な季節変化を観察できなかった。コアモモは、アマモの近縁種であるが、潮間帯に分布する小型種のため、アマモとは生態や放出するDNA量が異なることなどが要因と考えられる。コアモモは、地域によっては絶滅危惧II類に分類されることから、アマモとは区別して傾向を確認していく必要がある。

アマモ、コアモモが生育する海域での調査では、淡水域における動物を対象に多く実施されているろ過量1 L (従来法) の分析をした結果、アマモ、コアモモの環境DNAは定量下限以下となった⁵⁾。これは、海草の環境DNA量が動物に比べ少ない傾向に加え、閉鎖的な淡水域に比べて流れのある海域では環境DNAが希釈され低濃度であることに起因すると考えられる。そのため、低

濃度試料の分析方法について室内試験で検討してきた。既報では、コアマモが生育する水槽やアマモが生育する海域の海水を用いて分析対象とするDNAを増やすためにろ過量を増やし、定量下限を超えたDNAの増幅が可能であることを確認した⁵⁾。しかしながら、この方法では、ろ紙に回収する懸濁物質の増加により、ろ過時間の増大やろ紙が閉塞し、必要量をろ過できないことが懸念される。既報⁵⁾では複数のろ紙への分割などの解決案が挙げられており、その分析方法の有効性を確認する必要がある。モニタリングへの活用に向けては、統一した手順で定量下限を超えた値を得るための採水、分析手法のプロトコル化が重要と考えられる。

加えて、流れの変化がある環境下では、採水地点における採水時間の違いによるDNA量の差が季節や生育範囲の変化の違いによるDNA量の差に対してどの程度であるのかを把握する必要がある。海域における環境DNAの挙動に関する報告はまだ限られることから、数値計算を活用した検討は重要となる。著者らは、日本全国の湾を10タイプに模擬したモデルを用いた粒子追跡計算を実施し、採水地点や時間帯によっては特定の場所由来の環境DNAを観察できる可能性を示した⁷⁾。しかし、実海域ではより複雑な流況になると考えられ、実海域の地形を対象とした解析から模擬湾のようにモニタリングが可能になる地点や時間帯があるかを確認し、現地調査と数値計算を組み合わせた採水設定を検討する必要がある。

本研究では、藻場モニタリングで必要となる低濃度試料の分析プロトコル化に向けて、懸濁物質が多い海水を想定した分析方法の確立を目的とし、室内試験では、懸濁物質等により必要量をろ過できない場合を想定した低濃度試料のろ過・分析方法を検討した。コアマモが生育する水槽の海水を用いて複数のろ紙への分割などの分析方法の有効性を確認した。水槽実験では、室内試験で有効性を確認した手法の一つを用いて、定量化が困難であったコアマモが生育する水槽の海水の環境DNA量変化とコアマモの季節変化の関係を調査した。また、採水地点・時間選定のプロトコル化に向けた要件の整理を目的とした数値計算では、生育範囲の把握が可能となる小規模な入り江のコアマモ場を対象とし、現地調査に向けた採水地点の選定について検討した。

2. 低濃度DNAの海水を用いた環境DNA分析

(1) 低濃度試料用の分析方法の検討

コアマモが生育する水槽（図-1）の海水を用い、コアマモのDNAの定量が可能となる分析方法を検討した。低濃度試料のDNA量を定量するためには、分析対象として回収するDNA量を増やす必要があり、ろ過量、

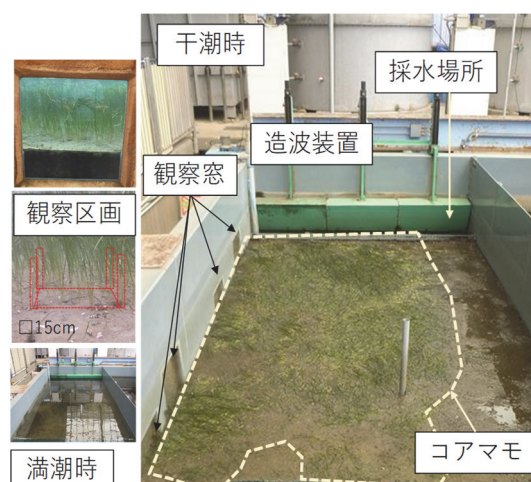


図-1 コアマモ生育水槽

表-1 環境DNA分析におけるろ過・抽出条件

	従来法	条件1	条件2	条件3(a)	条件3(b)	条件4(a)	条件4(b)
ろ過量	1L	5L	10L	1L×10枚		10L	
ろ紙の大きさ	Φ47mm			Φ90mm			
ろ過時間	2分	15分	35分	2分×10		10分	
溶出液量	1倍	1倍	1倍	10倍	10倍	1倍	3倍
カラム数	1個	1個	1個	1個	10個	1個	1個

DNA抽出時の溶出液量、ろ紙の大きさを検討項目とした。溶出液量は、ろ紙からのDNA溶出が不十分な場合に、溶出液量を増やすことによって回収できるDNA量が増えると考えられる。分析手順については、3章に詳述する。条件1から条件4までの4ケースを実施した（表-1）。本研究では、懸濁物質が多い海水を想定し、効率的にろ過、分析する方法として条件3、条件4を検討した。既報では、同水槽の海水のろ過量を10L以上とすることで定量下限を超える値が得られた⁵⁾。条件3、条件4のろ過量を決定するため、比較条件として既報⁵⁾の手法で条件1はろ過量5L、条件2は10Lとして実施した。今回用いた海水では、条件2で定量下限値を超えたことから、ろ過量を10Lとして、条件3、条件4を実施した。条件3では、ろ過量を1Lとした10枚のろ紙からDNAを回収する方法を検討した。ろ紙からDNAを溶出させる容器と溶出させたDNAを吸着させるカラムの個数を1個とした条件3(a)、10個とした条件3(b)を実施した。条件3(b)では、10枚のろ紙から得られたDNA抽出液を混合、濃縮してDNA濃縮液を得た。条件4では、ろ紙の大きさをφ90mmに拡大し、ろ紙からDNAを溶出させる溶出液量を検討した。条件4(a)では従来法と同じ溶出液量とし、条件4(b)では、溶出液量を従来法の3倍としてDNAの溶出後にろ紙と溶出液を分離する脱水を3度実施した。

(2) コアマモの季節変化と環境DNA量変化の関係把握

コアマモが生育する水槽（図-1）の海水を2018年7月～2019年3月の9ヵ月間、週2回、60回採水した。水槽は、

連結した水槽と貯水槽の海水が往来することで水位が変動し（1日2回周期）⁸⁾、週1~2回（主に月曜、水曜）、外海水との海水交換をしている。新しい海水が流入する直前は、水槽の海水と海藻の接触時間が一番長くなることから、海水交換直前の採水を基本とした。

水槽に生育するコアマモの観察として、採水時に生育密度、草丈を計測した。生育密度は、水槽の側壁に設置された観察窓（図-1）から3か所の観察区画（15cm×15cm）について計測した。草丈は、観察のタイミングによっては水深が草丈全長より浅くなり正確に計測できない場合があったため不定期な計測となった。

採水後、1Lの海水をガラス繊維ろ紙（0.7μm）でろ過し、ろ紙を冷凍保存した⁹⁾。5章に詳述するが、9ヶ月間の試料を用いて従来法（ろ過量1L、ろ紙φ47mm）でコアマモの環境DNA量を分析した結果、定量下限以下の試料が多く、環境DNA量の変動傾向が不明確だった。従来法での分析を前提に調査を計画し、冷凍保存した試料はろ過量を1Lとしたろ紙のみであったことから、2章(1)で検討した条件のうち条件3(b)の方法を用いて分析した。条件3(b)は、同時刻に1Lでろ過したろ紙10枚を1検体とする方法であるが、本分析では、試料数が限られることから同じ週に採水した2日間分のろ紙4枚（一部は3枚）を1検体として分析した。この枚数は、本水槽の次の海水交換までの間、すなわち新しい海水が流入することによる希釈影響を受けない期間に得たろ紙であり、その期間の代表値を表していると考えられる。

3. 環境DNAの分析方法

(1) 環境DNAの抽出

2章の環境DNA分析のうち共通する手順を図-2に示す。環境DNA学会標準マニュアルに準拠し、ろ紙からDNAを抽出した⁹⁾。マニュアルからの変更した点としては、DNA溶解液量を100μLとし、DNA抽出液を得た。追加工程としてDNA抽出液を濃縮する場合は、抽出液

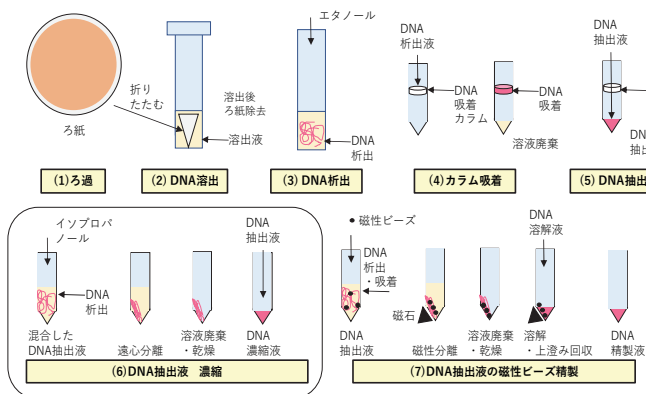


図-2 環境DNA分析でのDNA抽出・濃縮手順

を90μLずつ等量混合し、イソプロパノールを加えてDNAを析出後、遠心分離をして溶液を廃棄した。乾燥後、試料数×9μLの抽出液に溶解させ、抽出液を10倍の濃縮液とした。DNA抽出液またはDNA濃縮液は、PCRでのDNA増幅阻害対策として、磁性ビーズAgencourt AM Pure XP (BECKMAN COULTER)で精製した。

(2) 定量PCR分析

環境DNA分析は、コアマモを対象とした定量PCR分析を実施した⁹⁾。PCR反応液組成のうち鋳型量を2μLとし、コアマモの人工遺伝子増幅結果から定量下限を20 copies / 2μL（鋳型）（1000 copies / ろ過量）とした。また、定量PCR分析におけるDNA増幅阻害の有無を確認するため、アマモの人工遺伝子（2×10³ copies / 2μL）を鋳型としてアマモを対象とした定量PCR分析を実施した⁹⁾。PCR反応液組成のうち鋳型を3章(1)で得られたDNA抽出液2μLと人工遺伝子2μLとした。3章(1)で得られたDNA抽出液を含む条件でのCt値が人工遺伝子のみの値に対し1以上大きくなった場合にDNA増幅に阻害の影響があると判断した。2章の一部試料で分析阻害の影響があり、精製後は阻害の影響がないことを確認した。

4. 低濃度試料の分析方法検討結果

従来法および条件1~4によるコアマモの環境DNA分析結果を図-3に示す。図-3の縦軸は、ろ紙1枚当たりのDNA量をろ過量で除し、1L当たりのDNA量に換算した値である。ろ過量1Lのろ紙（φ47mm）1枚からDNAを抽出する従来法では、DNAの増幅は確認できなかった。条件1（ろ過量5L）では、定量下限以下となり、条件2（ろ過量10L）で定量下限を超えた値を確認できた。この結果より、条件2を比較対象とし、ろ過量を10Lとした条件3、条件4を検討した。

条件3(a)では、1個の容器で10枚のろ紙からDNAを抽出し、分析した結果、条件2に比べ低い値となった。

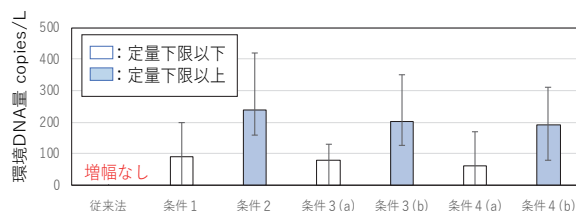


図-3 ろ過条件の検討結果



図-4 DNA抽出時の容器と抽出後のろ紙

一方、条件 3(b)では、ろ紙ごとに個別の容器を使用した DNA の抽出後、濃縮して分析したことにより条件 2 と同程度の DNA 量を確認できた。DNA 抽出後のろ紙を確認すると、条件 3(a)は条件 3(b)に比べ濃い茶褐色であった(図-4)。条件 3(a)は複数枚のろ紙を同じ容器に入れたことで DNA の溶出が不十分であり、ろ紙に DNA を含む残渣が残っていた可能性が考えられる。

条件 4 では、ろ紙を大きくすることでろ過時間を 35 分から 10 分に低減できた。DNA の溶出液量を条件 2 と同量にした条件 4(a)では、条件 2 に比べ低い DNA 量になった。条件 4(b)で溶出液量を従来法の 3 倍にした結果、条件 2 と同程度の DNA 量を確認できた。溶出液量の増量が必要だった理由としては、φ47mm のろ紙を用いる場合の溶出液量では、φ90mm のろ紙全体に溶出液が広がらず DNA の溶出が不十分であったためと考えられる。

以上の結果から、DNA 濃度が低いと想定される海域調査に適応可能な海草の環境 DNA 分析手法として、分析対象とする DNA を多く回収する必要があり、懸濁物質等により必要量をろ過できない場合に、複数枚のろ紙や径が大きいろ紙を用いて分析する方法の有効性が確認できた。ろ過を複数回実施する煩雑さや使用試薬等の経済的観点から考えると、条件 2 のように 1 枚のろ紙でろ過量を確保することが望ましい。

5. コアマモの季節変化と環境 DNA 量変化の関係

(1) コアマモの季節変化

コアマモは、冬から春に発芽・伸長・分岐し生物量が増大し、その後、春から夏にかけて成熟する。成熟期の後半から葉が枯死、脱落し、生育している生物量が減少する。本水槽には、多年草のコアマモが生育し、主に分岐・伸長により生物量が増加する。生育密度(株数)の計測結果から、2018年7月～2019年3月までの9ヵ月間に大きな変動が得られなかった(図-5(a))。しかし、葉の脱落など季節変化は観察されていたことから、一般的なコアマモの生活史を参考にDNA分析結果を考察した。

(2) 環境DNA分析結果

9ヵ月間、60回の採水試料について従来法(1L)で分析した結果、約8割の試料が定量下限以下となった(図-5(b))。そのため、3章に示した条件3(b)の方法を試み、定量下限を超えた値が得られた。コアマモのDNA量は、8月から9月にかけて増え、9月から10月にかけて低下する傾向を確認した。10月中旬以降、3月までは、値が最も高い9月上旬頃の1/10以下の低い値で推移する傾向になった(図-5(c))。季節変動について一般的なコアマモの生活史に照らし合わせると、夏の成熟期を境に生物量

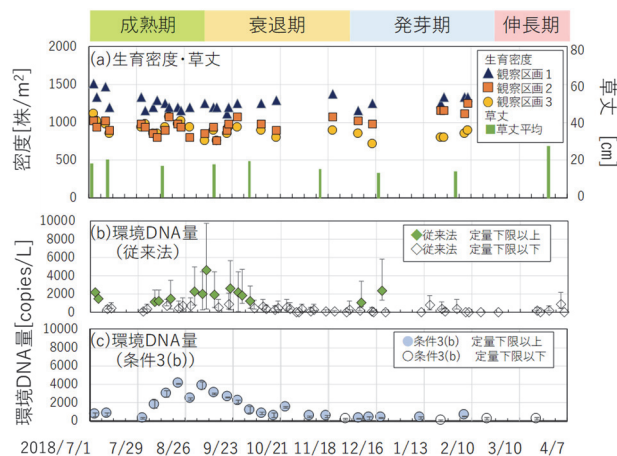


図-5 生育密度と環境DNA分析結果

が減少する変動パターンに合致していることが伺える。

以上より、コアマモの環境DNAについて、ろ過量、分析方法を適切に設定することにより既報⁹⁾のアマモと同じくコアマモのモニタリングに活用できる可能性が得られた。また、本章における試みは、2018年に採水、ろ過したろ紙を冷凍保存し、2021年に分析した結果である。一部試料については、2018年と2021年に分析し、従来法で同じ傾向を示すことを確認した。適切なる過量(ろ紙枚数)が不明であっても、ろ紙を保存しておくことにより、ろ過量が不十分だと判明後に本手法を用いることができる。ただし、4章に前述したとおり、試薬の使用量が増え分析にかかる費用が高くなる。また、少量の試料を濃縮する操作ではDNAを損失する可能性もあるため、試料数が必要となる。予め複数のろ過量で試料を採取し、ろ過量を事前検討することも重要と考えられる。

6. 採水地点選定のための数値計算

環境DNAを活用した藻場モニタリングでは、流れや環境DNAの分布を予測して採水地点、時間を選定する必要がある。本研究では、入り江のコアマモ場を対象に数値計算を実施し、コアマモ場周辺エリアにおける採水に適した地点・時刻について検討した。

コアマモ場を有する三重県英虞湾を数値計算の対象領域とした(図-6)。流動解析は、潮流の現地観測結果により妥当性を確認したモデルを使用した。潮汐を外力とした流動解析を行い、海草の環境DNAは、藻場から時々刻々と放出される極微細な草体片と想定し、流れに完全受動的な粒子として分散性を考慮せずに追跡した⁷⁾。数値計算における粒子の放出範囲は、2019年6月に確認したコアマモの生育範囲とした(図-6右図、緑色部)。

主な計算条件を表-2に示す。コアマモ生育地点(図-6右図、緑色部)の最下層に、環境DNAを模擬した粒子を10分間隔で5m格子当たり81個投入した(コアマモ生

育地点全体では10,725 m²(に33,291 個)・446,675 m²に等間隔(40 m格子)で246地点の採水地点を設置し、各地点において2 m×2 m×1 m(水深0.5~1.5 m)の容積に含まれる各時刻の粒子数を計測した。粒子追跡の計算期間は、海草の環境DNA分解日数⁶⁾を考慮し、粒子投入から5日後までの5日間とした。

7. 数値計算による採水地点選定条件の検討

246地点の採水地点において粒子数の時系列変化を取得し、地点による粒子数や時系列の変化傾向を比較した。

図-7は、藻場直上に設置したSt.97、St.97から南に80 m離れた藻場外のSt.95、St.95から南に80 m、西に40 m離れたSt.84における粒子数の時系列変化を示す。これら3地点に共通した傾向として、粒子数が時々刻々と変動し、一時的に粒子数が増加すること(例えば粒子数が5,000個以上)が確認できる。また、約12時間周期の粒子数の増減変動は、潮汐周期に起因すると考えられる。粒子数の変動は、地点の地形条件、藻場との距離、流れの変化により発生するものと考えられる。例えば、一時的な粒子数の増加は、流速が大きくなる上潮時最大や下潮最大時に発生しているように見受けられ、流速分布の変化にともない、岸側に集まった粒子群が通過し、一時的に粒子数が増加したと考えられる。

本計算結果を用いて、環境DNAを用いた藻場モニタリングの採水に適した地点の選定について検討する。採水地点、採水時刻における粒子数は、短時間または局所的に変化することは望ましくなく、採水を行う作業時間を確保できる程度は変動が小さく、また、採水予定地の周囲で値の差異が小さい地点が好ましい。そのため、図-7において、粒子数の一時的な増加(5,000個以上)は除外し、約12時間周期で変動する粒子数に着目すると、藻場直上(St.97)では満潮時、藻場から離れた2地点(St.95、St.84)では、干潮時に粒子数が多いことが分かる(図-7の矢印)。St.95(藻場外)において、最干潮時の前後1時間、30分、15分、5分における粒子数の平均値および標準偏差を図-8に示す。干潮前後1時間では、他の条件に比べ標準偏差が大きくなる時間帯があった。干潮時から流速が変化する時間帯を含むため、停滞していた粒子が動き始めたことが要因として挙げられる。

図-9に、干潮時の前後30分間における246地点の平均粒子数と、下潮時の最大流速ベクトルを示す。藻場から放出された粒子は、下潮時に西側の海岸線と並行に移流するため、干潮時は主に西側に粒子数が多い地点が広く分布したと考えられる。満潮時も同様に、流れの向きが東側方向であり、藻場から岸側に沿うエリアにおいて潮汐変動に伴う粒子数の増減が見られた(図-7、図-9)。

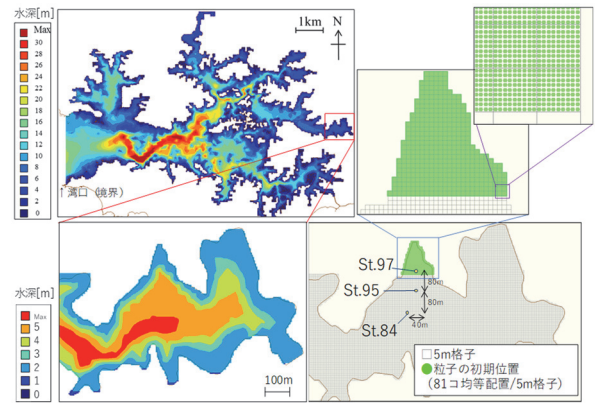


図-6 海底地形と粒子の初期位置(三重県英虞湾)

表-2 主な計算条件

項目	内容
計算領域	南北8km×東西10km
平面座標系	座標系 直交直線座標系
	格子幅 135m, 45m, 15m, 5m
	格子数 10742, 652, 135, 17867
鉛直座標系	分割数 10層(σ座標系)
計算期間	2020年5月1日~2020年5月31日(助走期間含む)
水深	海図(海上保安庁)より作成
タイムステップ	0.125秒
境界条件(概要)	潮汐 気象庁潮位実測値(尾鷲)
	水温・塩分 三重県真珠養殖関係漁場水温モニタリングシステム
	気温・雲量・日射量 気象庁(津・名古屋)
粒子数	33,291個(81個/5m格子×441格子)
粒子の投入間隔	10分(2020年5月6日~2020年5月16日)

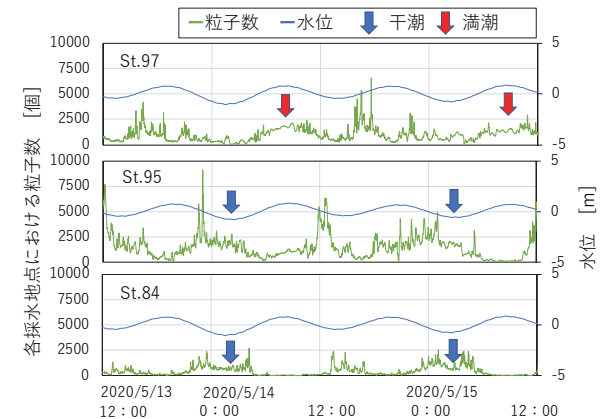


図-7 採水点における粒子の時系列変化

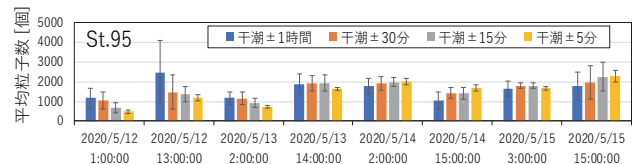


図-8 St.95における平均粒子数の比較

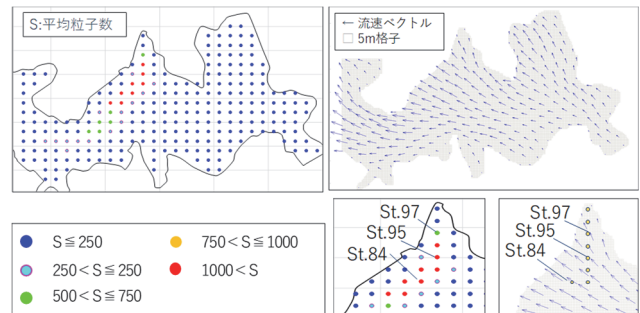


図-9 粒子平均数(干潮)と流速ベクトル(下潮最大時)

以上のことから、模擬湾での計算⁷⁾と同じく実海域を対象とした計算においても各地点における粒子数は時々刻々と変化するが、採水作業が可能となる、干潮時または満潮時に安定して粒子数が存在する地点が存在することを確認できた。今後、数値計算に基づいて選定した地点において、粒子数と現地調査によるDNA量と比較することで、環境DNAの特性を把握する予定である。

8. まとめ

本研究では、環境DNAを活用した藻場モニタリングに必要となる採水、分析手順のプロトコル化に向けて、室内試験では、現地調査に適用可能となる懸濁物質等により必要量をろ過できない場合の分析方法の有効性が確認できた。水槽実験では、有効性を確認した方法の一つを用いることで、9ヵ月間のコアマモの環境DNA量の変化を観察でき、コアマモの環境DNA量が夏に高く、秋に低下したことから、アマモと同じくコアマモについてもモニタリングに環境DNAを活用できる可能性が得られた。また、実海域を対象とした数値計算では、採水に適した時間帯があることが示された。採水地点毎に適した時間帯が異なるので、現地調査を計画する際の数値計算による採水地点、時刻選定の重要性が明らかとなった。

環境DNAを活用した藻場モニタリングの採水地点、採水時刻選定のプロトコル化に向けては、今後、数値計算と現地調査との比較が重要と考えられる。

参考文献

- 1) 水産庁：沿岸域の環境・生態系保全活動の進め方（暫定指針），2007.

- 2) 高原輝彦，山中祐樹，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，日本生態学会誌，vol.66，pp.583-599，2016.
- 3) Watanabe, K. and Kuwae, T.: Radiocarbon isotopic evidence for assimilation of atmospheric CO₂ by the seagrass *Zostera marina*, Biogeosciences, 12, pp.6251–6258, 2015.
- 4) 山田充哉，渡辺一俊，南部亮元，干川裕，福田裕毅，秋野秀樹，梶原瑠美子，桑原久実，森口朗彦：ドローンを用いた広域藻場調査，水産工学，Vol.54，No.2，pp.121-125，2017.
- 5) 赤塚真依子，高山百合子，Edwin MUCHEVBE，伊藤一教，渡辺謙太，桑江朝比呂，源利文：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，土木学会論文集 B2（海岸工学），vol.76，No.2，pp. I_943-I_948，2020.
- 6) 赤塚真依子，高山百合子，伊藤一教，渡辺謙太，桑江朝比呂，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) MUCHEVBE, E., TAKAYAMA, Y., AKATSUKA, M., ITO, K. and MINAMOTO, T. : Feasibility Study for Seagrass Beds Monitoring Using Environmental DNA, 土木学会論文集 B2（海岸工学），vol.76，No.2，pp. I_949-I_954，2020.
- 8) 桑江朝比呂，細川恭史，小笹博昭：メソコスム実験による人工干潟の生物生息機能の評価，海岸工学論文集，Vol.47，pp.1101–1105，2000.
- 9) Minamoto, T., Miya, M., Sado, T., Seino, S., Doi, H., Kondoh, M., Nakamura, K., Takahara, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Iwasaki, W., Kasai, A., Masuda, R. and Uchii, K.: An illustrated manual for environmental DNA research: water sampling guidelines and experimental protocols, Environmental DNA , Vol.3, 8-13, 2021.

(Received March 17, 2021)

(Accepted July 22 2021)

STUDY ON AN ENVIRONMENTAL DNA ANALYSIS PROTOCOL FOR SEAGRASS BED MONITORING

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. In field surveys, the amount of eDNA of seagrass was below the minimum limit of quantification by using the conventional method that is often performed in freshwater areas for animals. In this study, we assumed water sample condition with a large amount of suspended solids, which is inevitable for monitoring seagrass beds using eDNA, and organize the requirements for protocolizing the analysis method for collecting a sufficient amount of DNA. We found the relationship between the seasonal change of *Zostera japonica* and that of the amount of eDNA by using the new analysis method for low-concentration samples. The numerical simulation indicated that suitable time for sampling was different depending on sampling sites. Additionally, these results showed the possibility of applying the eDNA analysis and numerical simulation methods for future field surveys.