

# 環境DNA分析を用いた宝蔵寺沼水生動物の同定：野外調査との比較

吉 田 竜 矢      埼玉大学大学院教育学研究科自然科学専修  
日比野      拓      埼玉大学教育学部自然科学講座

キーワード：eDNA、種多様性、宝蔵寺沼、特別天然記念物、水生食虫植物

## 1. はじめに

分子生物学の進歩により、ごく微量なDNAの残余から犯人を特定するDNA鑑定法が確立されているが、生態学の分野でも野外に残されたDNA、環境DNAから生物種を特定する研究が近年精力的に行われている。環境DNAとは水や土壌などの環境試料中に含まれるDNAであり、水中の環境DNAは生物からはく離れた粘液や糞便などに含まれる細胞由来だと考えられている<sup>1)</sup>。この環境DNAを用いた調査は大きく2つに分けられる。一つ目は生物種特異的プライマーを用いて調査対象の種がある地点に生息するかどうかを明らかにするものである。このような調査は、ミシシッピ川へのハクレンとコクレンの侵入域の調査や<sup>2)</sup>、兵庫県内のため池における希少種カワバタモロコの生息調査<sup>3)</sup>などが行われている。種特異的プライマーを用いた解析では、生息の有無だけでなく定量的PCRを行うことで、その生物種のバイオマスを明らかにすることも可能である<sup>4)</sup>。2つ目はある特定の分類群全体をカバーするユニバーサルプライマーを用いてPCRを行った後、塩基配列を網羅的に解読しデータベースと照合することで、調査地点に生息する種を特定する方法であり、メタバーコーディングと呼ばれている。この方法を用いた研究として、舞鶴湾において目視調査では見つかっていなかった種を検出した事例<sup>5)</sup>や、環境DNA分析で琵琶湖周辺の河川において40種の魚の生息場所が明らかにした事例<sup>6)</sup>などがある。網羅的に塩基配列を解析するためには次世代シーケンサーを用いる必要があり、個体数の少ない生物種の発見という観点には適しているものの、費用がかさむというデメリットがある。

我々のグループは2010年から現在まで、埼玉県羽生市に位置する宝蔵寺沼において漁具を用いて水生動物を採捕し、沼の水生動物相を明らかにする試みを続けてきた<sup>7)</sup>。この宝蔵寺沼は水生の食虫植物ムジナモの国内最後の自生地として国の特別天然記念物に指定されている場所である。ムジナモ保全のために羽生市教育委員会や埼玉大学などが協力し、宝蔵寺沼ムジナモ自生地緊急調査を行い<sup>8)</sup>、多面的に沼の環境を改善した結果、2016年には宝蔵寺沼に15万株のムジナモが生育するようになった。このムジナモ保全活動を、中学校理科における生態系のバランスの事例や自然環境保全の事例として取り上げるための授業展開も考えられている<sup>9)</sup>。2014年から2017年まで4年間行った水生動物相調査では、スジエビ、ウシガエル幼生、アメリカザリガニの順に採捕数が多いという結果になり<sup>10)</sup>、その一方で魚類はモツゴ、ヨシノボリ属、カダヤシが採捕されたのみであった。以前の調査では採捕されていたコイやフナ属などの大型魚類は、近年の調査では確認できなかった<sup>7)</sup>。宝蔵寺沼の水路にヨシが繁茂し、投網での採捕が難しくなったことや、隣接する三田ヶ谷池でコイヘルペスが流行したことなどが、大型魚類が採捕されない理由として考えられる。しかし一方で宝蔵寺沼内でのムジナモの保全活動の中で、大型魚類の魚影を目撃したりフナなどを釣り上げたりした情報があり、採捕とは異なる方法で水生動物相を明らかにする方法が

課題となっていた。

そこで本研究では環境DNA分析を用いて宝蔵寺沼の魚類を同定することを試みた。宝蔵寺沼の多くの地点を定期的に環境DNA調査するためには、各調査回を低コストで行いたい。そのためにまずユニバーサルプライマーを用いてPCRを行い、その後クローニングの手法を取り入れて実験を行うことにした。この方法により、ユニバーサルプライマーで増幅したさまざまな種が混在したPCR産物の中から、1クローンだけを単離することができ、かつ次世代シーケンサーでは難しい長い塩基配列を解読し、生物種を同定することができる。また、環境DNA解析は非侵襲的な調査方法であり、ムジナモの生育環境を荒らすことなく水生動物相調査を行うことができると考えた。

## 2. 材料および方法

### 2-1. 水のサンプリング

環境DNA解析をする水サンプリングは、宝蔵寺沼の水生動物採捕調査<sup>10)</sup>を行った3地点（St.クロアミ、St.パイプ、St.ポンプ）に加えて、魚類の採捕記録や魚影の目撃記録のあった3地点（No.3-1、No.8-1、No.8-2）でも行った（図1A）。宝蔵寺沼の新たな3地点は沼の中央付近にある一続きの水路であり、水深が深いことが特徴である。調査日は、採捕調査を行った2017年3月16日、6月22日、10月12日と、水サンプリングのみ行った8月31日の4回で上記6調査地点、合計24点の水サンプリングを行った。次に宝蔵寺沼に隣接する三田ヶ谷池では5調査地点（St.1～St.5）で、調査日は2017年5月24日、7月19日、11月6日の3回、採捕調査とともに水サンプリングを行った（図1B）。水サンプリングは、陸地からあるいは水路にかけられた橋の上から、1Lプラスチックボトルを手で押さえながら水深約30 cmあたりの水を汲んだ。各地点で1Lをサンプリングした（予備も含めて1 Lを2本用意した）のち、クーラーボックスに入れ冷やしながら実験室に運んだ。サンプリングした水は持ち帰ったその日に、0.7  $\mu$ m 孔ガラス繊維フィルター（GF/F, Whatman）を用いてリユーズブルフィルターユニット（Thermo Fisher Scientific）で吸引ろ過し、ガラスフィルターにサンプル中の環境DNAを吸着させた。このろ過に用いた道具は事前

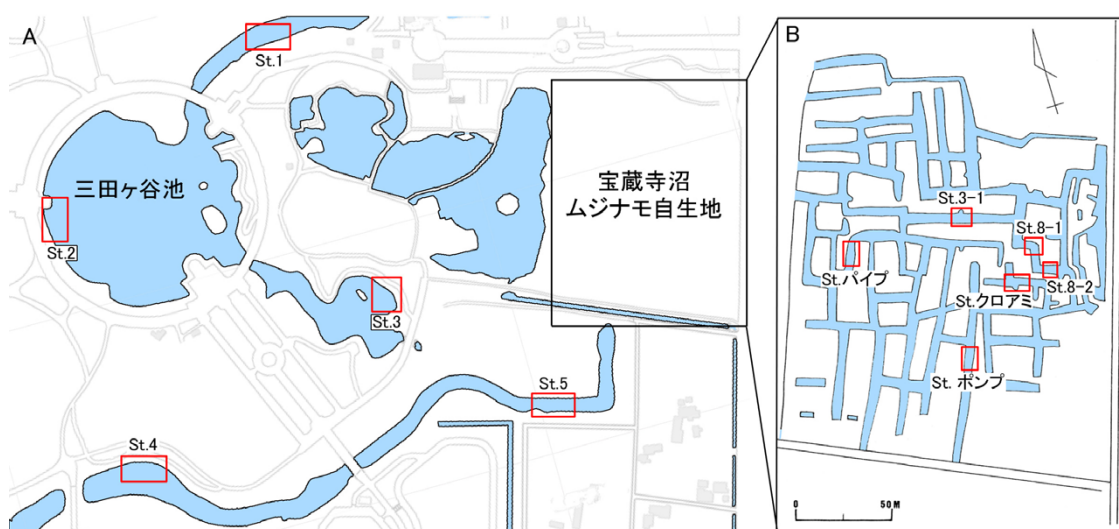


図1. 三田ヶ谷池と宝蔵寺沼ムジナモ自生地の調査地点

A：赤枠で囲んだ三田ヶ谷池の5地点（St.1～5）、B：宝蔵寺沼の6地点（St.クロアミ、パイプ、ポンプ、3-1、8-1、8-2）で水サンプリングを行った。

にオートクレーブで滅菌または十分な洗浄を行って、コンタミネーションを防いだ。ろ過したガラスフィルターはアルミホイルに包み、使用時まで-20℃で保存した。

## 2-2. 環境DNA抽出

環境DNA抽出は福本ら<sup>11)</sup>と源ら<sup>12)</sup>の手法を参考に、宝蔵寺沼と三田ヶ谷池の水の状態に合うよう改良して行った。すなわち、上記のろ過後のガラスフィルターを滅菌済みのハサミとピンセットを使って5 mm角に切り、5 mlマイクロチューブに移した。DNA抽出液 (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA [pH 8.0])を3.5 ml加えて5分間ボルテックスしたのち、20 mg/ml プロテアーゼ K 7.5 µl (50 µg/ml) と10% SDS 160 µl (0.5%) を加え56℃で15分間湯浴した。溶液を15 ml遠沈チューブに移し、フェノールクロロホルムを等量加え、室温で3000×g 15分間遠心した。遠心後、水層を別の15 ml遠沈チューブに回収しエタノール沈殿によって精製し、200 µlの超純水に溶出した。その後DNeasy Blood & Tissue kit(QIAGEN)を用いて添付のプロトコルの指示に従って、さらなる環境DNAの精製を行った。

## 2-3. 魚類ユニバーサルプライマーの設計

本研究は初めに、既存のミトコンドリア16S rRNAプライマー<sup>13)</sup>を使用し、その後本研究に適合した魚類ユニバーサルプライマーを新たに設計した (表1)。魚類ユニバーサルプライマーの設計では、魚類ミトコンドリアDNA配列データベース MitoFish ver. 3.21<sup>14)</sup> (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/>) より魚類1295種の配列データを入手し、MAFFT<sup>15)</sup>を用いて塩基配列をアライメントした後、分子系統解析アプリケーションMEGA7<sup>16)</sup>を使って1295種に相同性の高い20塩基配列程度の領域を見つけだした。適合する魚種を増やすために縮重プライマーとして設計した。

| プライマー名      | 塩基配列5'-3'              |
|-------------|------------------------|
| 16S1F       | GGACGAGAAGACCCT        |
| 16S2R       | CGCTGTTATCCCTATGGTAACT |
| 1216s-Fsu1F | GGATTAGAKACCCYAYTATG   |
| 1216s-Fsu1R | CATGWTGCRAAAGGTACRRG   |
| 1216s-Fsu2F | GGATTAGAKACCCYAYTATGC  |
| M13Forward  | GTAAAACGACGGCCAGT      |
| M13R neo    | GGAAACAGCTATGACCATG    |

表1. 使用したプライマーの塩基配列

## 2-4. クローニングと塩基配列の解読

精製を行った環境DNAサンプルは、まずKOD FX Neo (東洋紡)を用いて1回目のPCRを行った。KOD FX Neoは含まれるPCR阻害物質が多くても酵素反応が進む強力なポリメラーゼである。PCR 反 応 液 25 µl (2× PCR Buffer for KOD FX Neo 12.5 µl, 2 mM dNTPs 5 µl, 1216s-Fsu2F/1R primers 2 µl, KOD FX Neo 0.5 µl, DNA 0.7-1.25 µl, DW up to 25 µl) を、94℃/2分→ {98℃/10秒→53℃/30秒→68℃/1分} 30-40 cycleでPCR反応を行った。なお必要なDNA量やサイクル数はサンプルによって異なるため、予備的なPCRを行い最適な条件で行った。PCR産物をエタノール沈殿で精製した後、制限酵素で目的外のDNAを除去するために、制限酵素Pvu I溶液 20 µl (10× K Buffer 2 µl, 0.1% BSA 2 µl, DNA 10 µl, Pvu I 0.5 µl, DW 5.5 µl)



を用いて、37℃で3時間処理した。なお、プライマー作成に使用した魚類1295種のターゲットとなる塩基配列に、Pvu Iの認識配列はないことを予め確認した。PCR反応後、2 %アガーローズゲルで電気泳動し、約800 bpにあるバンドを切り出し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit(日本ジェネティクス)を用いてDNA断片を精製した。

精製したDNAをさらに増幅するため、Blend Taq Plus (東洋紡)を用いて2回目のPCRを行った。Blend Taq Plusを用いたPCR産物はTAクローニングが可能である。PCR反応溶液 25 µl (10 × PCR Buffer 2.5 µl, 2mM dNTPs 2.5 µl, 1216s-Fsu2F/1R primers 2 µl, Blend Taq Plus 0.25 µl, DNA 0.5–1.25 µl, DW up to 25 µl) を、94℃/2分→ {94℃/30秒→48℃/1分→72℃/1分} 20 cycle →72℃/10分で反応を行った。なお必要なDNA量やサイクル数はサンプルによって異なるため、予備的なPCRを行い最適な条件で行った。PCR反応後電気泳動を行い、FastGene Gel/PCR Extraction Kitを用いてDNAを精製した。

次にDyna Express TA PCR Cloning Kit (バイオダイナミクス)を用いてpTAC-2ベクターに上記DNA断片のTAクローニングを行った。反応溶液10 µl (Ligation high Ver.2 5 µl, pTAC-2 vector 0.25 µl, DNA 4.75 µl) を37℃で3時間反応させた。氷上で融解したCompetent Quick DH5α (東洋紡)にクローニングを行ったベクター溶液を加え、氷上に20分間静置した。その後、42℃で45秒間のヒートショックを与え、再度氷上に2分間静置してからLB溶液を150 µl加えて37℃で30分インキュベートした。最後にLB/amp/X-galプレートに形質転換後の溶液を撒き、37℃で20時間培養した。培養した大腸菌のうち、白いコロニーを選択して番号を振り、マスタープレートを作成した。また同時に大腸菌のダイレクトPCRを行い、インサートを確認した。PCR反応溶液10 µl (2x GoTaq Green Master Mix 5 µl, 10 µM M13 (-21) primer 1 µl, 10 µM M13Rneo primer 1 µl, DW 3 µl) に、番号を振ったコロニーの大腸菌を爪楊枝で溶液中移動させ、95℃/3分→ {95℃/10秒→53℃/30秒→72℃/1分} 35 cycle →72℃/3分で反応を行った。電気泳動後、インサートを確認できた大腸菌は3 mlのLB/amp液体培地に植菌し、恒温振とう培養器にて37℃180 rpmで約14時間培養した。その後、illustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GEヘルスケア)でプラスミドDNAを抽出した。

精製したプラスミドDNAは制限酵素Bam HI、Xho I、Mlu Iで切断し、電気泳動によりインサートDNAの長さを確認した。プラスミドのインサートはBam HI、Xho Iに挟まれており、Mlu Iはフナ属を切断することがNCBIのデータベースからわかっている。インサートの確認ができたプラスミドをキャピラリー型DNAシーケンス受託サービス(ユーロフィンジェノミクス)に委託した。得られた配列をBLASTで検索し、99%以上一致したものをその生物種とした。

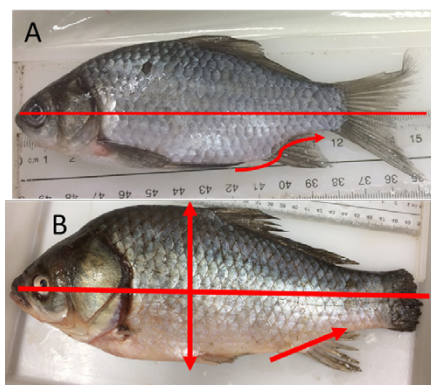


図2. フナの形態分類

A: ギンブナ 写真中央に引いた赤線は尾柄の中央と鼻孔の中心を結ぶ線。ギンブナの口はその線の下にある。尻鰭基部は急にカーブしている。B: ゲンゴロウブナ 写真中央横に引いた赤線は尾柄の中心と瞳孔を結んだ線で、口はその延長線上にある。縦に引いた矢印付きの赤線は体高を示し、ギンブナに比べて高い。尻鰭基部は直線になっている。

## 2-5. フナ属の同定

宝蔵寺沼と三田ヶ谷池で採捕された8匹のフナ属を用いて、形態による同定とDNAによる同定を行った。形態的特徴による種の同定は、「日本のコイ科魚類」<sup>17)</sup>「日本の淡水魚」<sup>18)</sup>をもとにした。すなわち、尻鰭基部の前方が直角にカーブしている、口が尾柄の中央と鼻孔の中心を結ぶ線の延長よりやや下側についている、目が頭部側面の中央よりも上方に偏っている場合ギンブナ *Carassius* sp.とした(図2A)。尻鰭基部がなだらかで体高が高い、口が尾柄の中央と鼻孔の中心を結ぶ線の延長線上についている、目が頭部側面の中央かあるいは中央よりも上方に偏っている場合ゲンゴロウブナ *Carassius cuvieri*とした(図2B)。DNA抽出のために、冷凍保存しておいたフナのサンプルを解剖し筋肉組織約5 mm角を切り出し、200 µlのDWと200 µlのフェノール/クロロホルムを加えボルテックスミキサーで攪拌した後、12000×gで15分間遠心した。遠心後、水層を別のチューブに回収し、エタノール沈殿によってDNA精製を行った。フナ属の同定は環境DNAのクローニングと同様の方法で行った。しかし環境DNAと異なり、ウシガエルDNAの混入はないため、上記2-4の2回目のPCRの操作から行った。

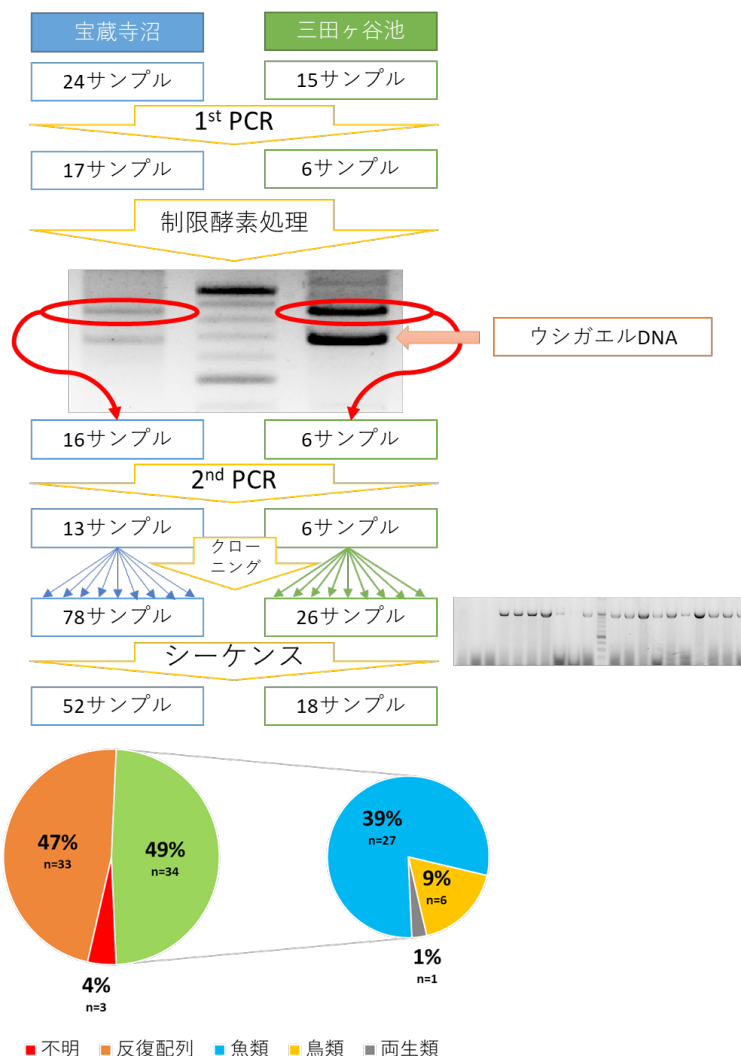


図3. 環境DNA解析の流れと水生動物の検出割合

赤丸で囲まれている部分が800 bpのDNAバンドである。その下に約600 bpのDNAバンドが制限酵素によって切断されたウシガエルDNAである。中央右側の写真は、2nd PCRによってほぼすべてのサンプルで800 bpにDNAバンドが現れているのが分かる。

## 3. 結果

### 3-1. 環境DNA実験条件の検討

環境DNA解析を行うにあたり、PCRで使用する魚類ユニバーサルプライマーの選定を行った。まず初めに、動物種の同定によく用いられる16s rRNAのユニバーサルプライマー16S1F/16S2R<sup>13)</sup>を用いて2016年5月三田ヶ谷池St.5、7月三田ヶ谷池St.5の環境DNAサンプルを鋳型としてPCRを行い、8クローンのシーケンス解析を行った。その結果、ウキゴリ *Gymnogobius*

| 調査回 | 場所      | 一致率           | 学名                         | 和名    | 備考                                    |       |
|-----|---------|---------------|----------------------------|-------|---------------------------------------|-------|
| 3月  | St.クロアミ |               |                            |       |                                       |       |
|     | St.ポンプ  | 778/781(99%)  | <i>Carassius</i> sp.       | フナ属   | <i>Carassius buergeri grandoculis</i> | ニゴロブナ |
|     |         | 776/780(99%)  | <i>Carassius</i> sp.       | フナ属   | <i>Carassius auratus</i>              | キンギョ  |
|     |         | 770/771(99%)  | <i>Anas crecca</i>         | コガモ   |                                       |       |
|     |         | 771/771(100%) | <i>Anas crecca</i>         | コガモ   |                                       |       |
|     |         | 743/744(99%)  | <i>Rana catesbeiana</i>    | ウシガエル |                                       |       |
|     | St.パイプ  | 779/780(99%)  | <i>Carassius</i> sp.       | フナ属   | <i>Carassius buergeri grandoculis</i> | ニゴロブナ |
|     |         | 779/780(99%)  | <i>Carassius</i> sp.       | フナ属   | <i>Carassius buergeri grandoculis</i> | ニゴロブナ |
|     |         | 778/780(99%)  | <i>Carassius</i> sp.       | フナ属   | <i>Carassius buergeri grandoculis</i> | ニゴロブナ |
|     |         | 779/780(99%)  | <i>Carassius</i> sp.       | フナ属   | <i>Carassius buergeri grandoculis</i> | ニゴロブナ |
|     | No.3    |               |                            |       |                                       |       |
|     | No.8-1  |               |                            |       |                                       |       |
|     | No.8-2  |               |                            |       |                                       |       |
| 6月  | St.クロアミ | 779/779(100%) | <i>Channa argus</i>        | カムルチー |                                       |       |
|     |         | 776/780(99%)  | <i>Carassius</i> sp.       | フナ属   | <i>Carassius auratus</i>              | キンギョ  |
|     |         | 777/783(99%)  | <i>Pseudorasbora parva</i> | カダヤシ  |                                       |       |
|     |         | 781/783(99%)  | <i>Pseudorasbora parva</i> | カダヤシ  |                                       |       |
|     |         | 779/780(99%)  | <i>Channa argus</i>        | カムルチー |                                       |       |
|     |         | 780/781(99%)  | <i>Carassius</i> sp.       | フナ属   | <i>Carassius buergeri grandoculis</i> | ニゴロブナ |
|     |         | 779/781(99%)  | <i>Carassius</i> sp.       | フナ属   | <i>Carassius auratus</i>              | キンギョ  |
|     |         | 774/777(99%)  | <i>Carassius</i> sp.       | フナ属   | <i>Carassius</i> sp.                  | ギンブナ  |
|     | St.ポンプ  |               |                            |       |                                       |       |
|     | St.パイプ  | 779/780(99%)  | <i>Carassius</i> sp.       | フナ属   | <i>Carassius buergeri grandoculis</i> | ニゴロブナ |
|     | No.3    |               |                            |       |                                       |       |
|     | No.8-1  |               |                            |       |                                       |       |
|     | No.8-2  |               |                            |       |                                       |       |
| 8月  | St.クロアミ | 779/780(99%)  | <i>Channa argus</i>        | カムルチー |                                       |       |
|     |         | 780/780(100%) | <i>Channa argus</i>        | カムルチー |                                       |       |
|     | St.ポンプ  | 779/783(99%)  | <i>Pseudorasbora parva</i> | モツゴ   |                                       |       |
|     | St.パイプ  | 776/780(99%)  | <i>Carassius</i> sp.       | フナ属   | <i>Carassius buergeri grandoculis</i> | ニゴロブナ |
|     | No.3    |               |                            |       |                                       |       |
|     | No.8-1  | 780/780(100%) | <i>Channa argus</i>        | カムルチー |                                       |       |
|     | No.8-2  |               |                            |       |                                       |       |
| 10月 | St.クロアミ |               |                            |       |                                       |       |
|     | St.ポンプ  | 780/780(100%) | <i>Channa argus</i>        | カムルチー |                                       |       |
|     |         | 779/779(100%) | <i>Channa argus</i>        | カムルチー |                                       |       |
|     |         | 779/780(99%)  | <i>Channa argus</i>        | カムルチー |                                       |       |
|     | St.パイプ  |               |                            |       |                                       |       |
|     | No.3    |               |                            |       |                                       |       |
|     | No.8-1  | 780/780(100%) | <i>Carassius</i> sp.       | フナ属   | <i>Carassius auratus</i>              | キンギョ  |
|     | No.8-2  | 780/780(100%) | <i>Channa argus</i>        | カムルチー |                                       |       |

表2. 宝蔵寺沼環境DNA解析によって同定された動物種

(表左) 同定された生物種の学名、(右) 和名を記してある。一致率・学名の空欄部分は塩基配列の解読を行ったものの、生物種が同定できなかったことを示している。フナ属に関しては備考欄にNCBIの相同性検索で一致率が高かった種名を記載した。

*urotaenia*が検出されたが(1/8サンプル)、それ以外にも細菌など水生動物種とは異なる生物種(6/8サンプル)も多数検出されてしまった。水生動物種をより効率的に検出するために、宝蔵寺沼・三田ヶ谷池の魚類の特定に適したプライマーの設計を行った。MitoFish ver. 3.21から魚類のミトコンドリアDNA配列(1295種類)をもとに、12s rRNAの3'領域から遺伝子間領域を含む16s rRNAの5'領域までを増幅するユニバーサルプライマー(1216s-Fsu1F/1216s-Fsu1R)を設計した。1216s-Fsu1F/1216s-Fsu1Rを用いて2016年5月三田ヶ谷池St.5、2016年6月宝蔵寺沼St.クロアミ、2016年7月三田ヶ谷池St. 5の環境DNAサンプルを鋳型としてPCRを行った。8クローンをシー

ケンス解析したところ、グラム陰性菌 (2/8サンプル)、ウシガエル (1/8サンプル)、相同配列が見当たらないもの (3/8サンプル) が検出された。このプライマーでは目的外の生物種が多く検出されるため、新たに1216s-Fsu1Fの3'側を1塩基伸ばしたプライマー1216s-Fsu2Fを設計した (表1)。1216s-Fsu2F/1216s-Fsu1Rを用いてPCRと8クローンのシーケンス解析をしたところ、ほとんどのサンプルがウシガエル (7/8サンプル) であった。宝蔵寺沼においてウシガエル幼生が優占種であるため、この結果は妥当であるものの、本研究の環境DNA解析ではより多くの動物種 (特に大型魚類) を特定することが目的である。そこで、環境DNA中からウシガエルのDNAを除くことを試みた。すなわち、1回目のPCR産物を制限酵素Pvu Iで処理することで、ウシガエルDNAだけを消化し (図3)、電気泳動し切断されていないDNAを抽出した。なお、予備的な調査において、プライマー作成に使用した1295種のPCR増幅領域はPvu Iで切断されないこと、ウシガエルDNAは約600 bpと約200bpの2つに切断されることを確認している。その後、精製したDNAをもう一度PCRとクローニングを行い、16クローンのシーケンス解析を行ったところ、フナ属 (3/16サンプル) の他に、モツゴを含む魚類 (3/16サンプル) を検出することができたため、以降の調査はこの方法で行った。

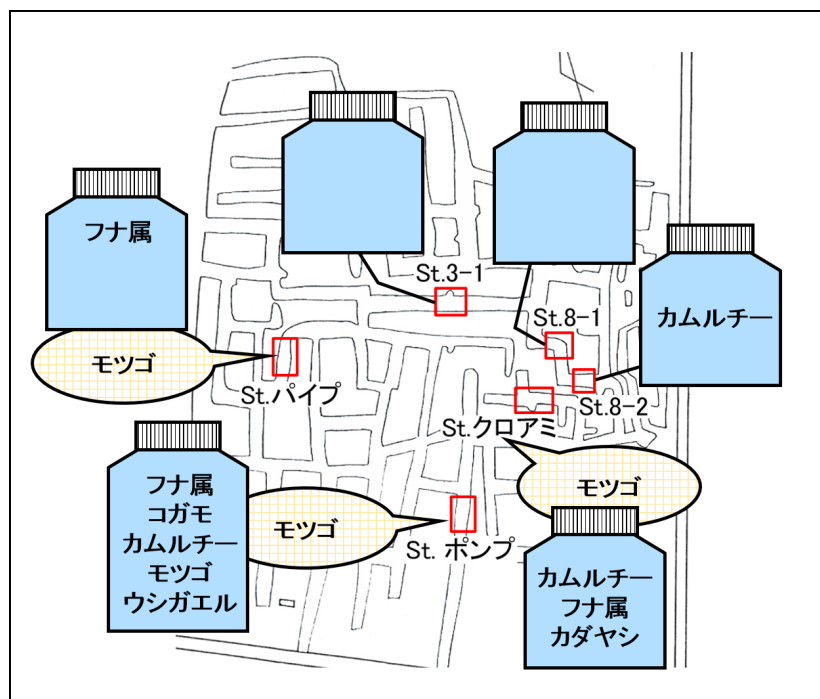


図4. 宝蔵寺沼環境DNA解析結果

2017年に行われたすべての調査結果を宝蔵寺沼のマップ上にプロットした。水色で塗られたボトル：環境DNA解析で同定された動物種、黄色網目で塗られた楕円：漁具による採捕調査で同定された動物種。St.3-1, St.8-1では環境DNAが検出されていないため、動物種が表記されていない。

### 3-2. 宝蔵寺沼における環境DNA分析

宝蔵寺沼から採取した合計24本の水サンプルの環境DNA分析を行った。採取した水から抽出・精製した環境DNAを鋳型として、1回目PCRを行った。全24サンプル中17サンプルから期待された長さである約800 bpのDNAバンドが確認された。制限酵素Pvu Iでウシガエル幼生のDNAを消化したところ、16サンプルで未消化のDNAバンドを確認できた。2回目PCRを行ったところ13サンプルで約800 bpのバンドを確認できたので、それらをクローニングに進めた。78個のクローンを選択し、そのうち52サンプルの塩基配列を特定したところ、魚類 (48.1%)、鳥類 (3.8%)、両生類 (1.9%)、反復配列 (46.2%) であった (図3)。これらの魚類と鳥類、両生類の結果をも



とに、各調査回と調査地点にプロットした。

2017年3月の環境DNA解析では、St. ポンプにフナ属、コガモ *Anas crecca*、ウシガエルが検出された。St. パイプからはフナ属が検出された（表2、図4A）。6月の解析では、St. クロアミからは、カムルチー *Channa argus*、フナ属、カダヤシが検出された。St. パイプからはフナ属が検出された（表2、図4B）。8月の解析結果から、St. クロアミでカムルチー、St. ポンプでモツゴ、St. パイプでフナ属、No.8-1でカムルチーが検出された（表2、図4C）。10月は、St. ポンプからはカムルチー、No.8-1からはフナ属、No.8-2からはカムルチーが検出された（表2、図4D）。

### 3-3. 三田ヶ谷池における環境DNA分析

宝蔵寺沼と同様に、三田ヶ谷池においても合計15本の水サンプルの環境DNA解析を行った（表3、図5）。1回目PCR後の全15サンプル中6サンプルから期待された長さである約800 bpのDNAバンドを確認した。制限酵素 Pvu I 処理と2nd PCR後、6サンプルで800 bpのバンドを確認した。クローニングを行い、18サンプルをシーケンス解析して生物種の同定を試みた。その結果、魚類（11.1%）、鳥類（22.2%）、反復配列（50.0%）、相同性の無い配列（16.7%）となった。5月（図5A）は条件を変えながら複数回の1回目PCRを行ったが、明瞭なDNAバンドを得ることができなかった。7月（図5B）は4地点からDNAバンドを検出し、10サンプルのシーケンス解析を行ったが、反復配列や相同性の無い配列のみで生物種を同定することはできなかった。11月（図6C）は2地点からDNAバンドを検出し、8サンプルのシーケンスを行い、St.4からは、コガモ、ナマズ *Silurus asotus*、St.5からはコガモ、フナ属、マガモ *Anas platyrhynchos*が検出された。宝蔵寺沼の環境DNA解析の結果と比較すると、三田ヶ谷池の方が水の濁度は低いにも関わらず、期待されたほど生物種を特定できなかった（表3）。

| 調査回 | 場所           | 一致率           | 学名                        | 和名  | 備考                       |      |
|-----|--------------|---------------|---------------------------|-----|--------------------------|------|
| 5月  | St.1,2,3,4,5 |               |                           |     |                          |      |
| 7月  | St.1,2,3,4,5 |               |                           |     |                          |      |
| 11月 | St.1,2,3     |               |                           |     |                          |      |
|     | St.4         | 762/771(99%)  | <i>Anas crecca</i>        | コガモ |                          |      |
|     |              | 766/784(98%)  | <i>Silurus asotus</i>     | ナマズ |                          |      |
|     | St.5         | 700/700(100%) | <i>Anas crecca</i>        | コガモ |                          |      |
|     |              | 776/780(99%)  | <i>Carassius</i> sp.      | フナ属 | <i>Carassius auratus</i> | キンギョ |
|     |              | 769/770(99%)  | <i>Anas platyrhynchos</i> | マガモ |                          |      |
|     |              | 685/700(98%)  | <i>Anas crecca</i>        | コガモ |                          |      |

表3. 三田ヶ谷池環境DNA解析によって同定された動物種

（左から4列目）同定された生物種の学名、（左から5列目）和名を記してある。一致率・学名の空欄部分は塩基配列の解読を行ったものの、生物種が同定できなかったことを示している。2017年5月と7月はSt.1～5のすべての調査地点で生物種を同定できなかったことから、1つの行にまとめた。フナ属に関しては備考欄にNCBIの相同性検索で一致率の最も高かった種名を記載した。



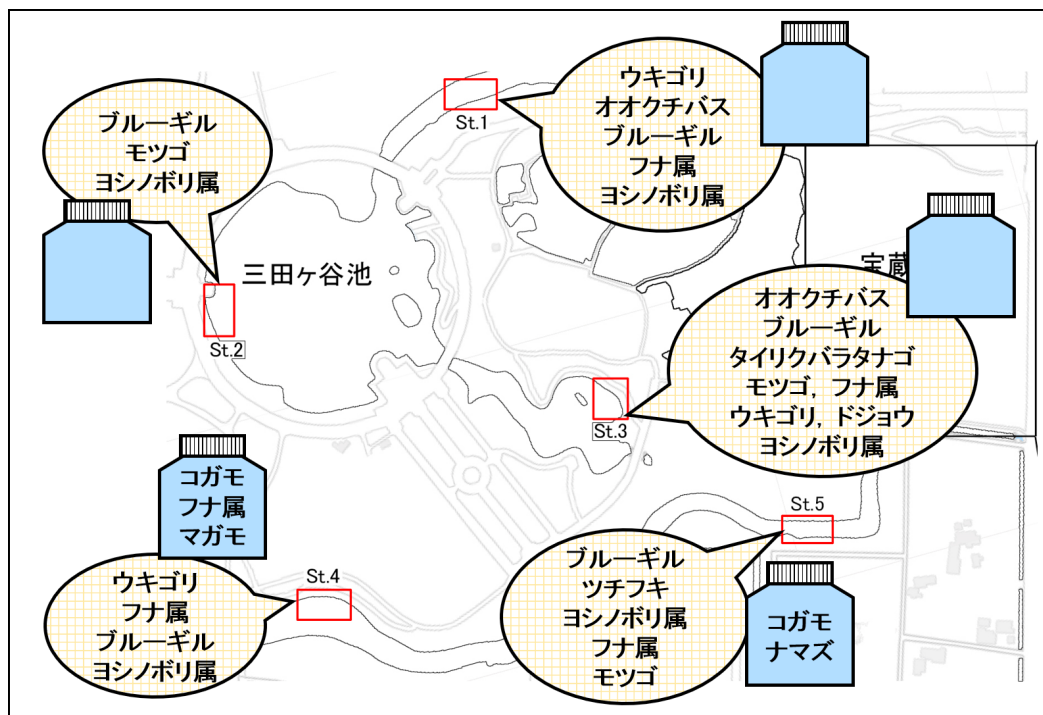


図5. 三田ヶ谷池環境DNA解析結果

2017年に行われたすべての調査結果を三田ヶ谷池のマップ上にプロットした。水色で塗られたボトル：環境DNA解析で同定された動物種、黄色網目で塗られた楕円：漁具による採捕調査で同定された動物種。St.1, St.2, St.3では環境DNAが検出されていないため、動物種が表記されていない。

### 3-4. フナ属の種同定の試み

環境DNA解析の結果、宝蔵寺沼と三田ヶ谷池で、ギンブナ、ゲンゴロウブナ、キンギョ *Carassius auratus*、ニゴロブナ *Carassius buergeri grandoculis*が検出された。ゲンゴロウブナとギンブナは2010年から2017年まで行った採捕調査の中に採捕された記録があるものの、ニゴロブナとキンギョは採捕された記録がない。また、ニゴロブナは琵琶湖固有亜種であり宝蔵寺沼に生息しているとは考えにくい。そこでこの矛盾を明らかにするために、採捕調査とは別に採捕されたフナ属サンプルをもとにして、形態的特徴から同定される種名と、同個体のフナのDNA分析から同定される種名が一致するかどうか調べた。この実験に用いたフナ属は2017年10月に宝蔵寺沼（4匹）と三田ヶ谷池（4匹）で採捕されたものを使用した（表4、図6）。

その結果、8個体の中でDNA分析による種と形態的特徴からの種との同定が一致したものは2個体のみであり、その他6個体は異なる種が同定された。宝蔵寺沼個体H171012は形態的特徴からギンブナと同定されたが、DNA解析の結果ニゴロブナと99.9%（779/780塩基）一致を示した。一方ギンブナのDNAとは99.1%（773/780塩基）の一致だった。宝蔵寺沼個体H171018-1とH171018-2は形態的特徴からゲンゴロウブナと同定されたものの、DNA解析の結果キンギョと99.9%（779/780）一致を示し、ゲンゴロウブナとは97.6%（761/780）の一致だった。三田ヶ谷池個体M171025は形態的特徴からギンブナと同定されたが、DNA解析によりキンギョと100%（780/780）一致を示しギンブナのDNAとは97.7%（762/780）の一致だった。三田ヶ谷池個体M171030-1とM171030-2は形態的特徴からゲンゴロウブナと同定されたが、DNA解析によりそれぞれキンギョと100%（780/780）、ニゴロブナと100%（780/780）一致し、ゲンゴロウブナとはともに97.7%（762/780）の一致だった。

|           | 全長      | 体長      | 体高       | 体重      | 形態による同定 | DNAによる同定                              |         |
|-----------|---------|---------|----------|---------|---------|---------------------------------------|---------|
| H171012   | 15.0 cm | 12.0 cm | 4.5 cm   | 55.0 g  | ギンブナ    | <i>Carassius buergeri grandoculis</i> | ニゴロブナ   |
| H171018-1 | 28.0 cm | 23.0 cm | 9.0 cm   | 340.0 g | ゲンゴロウブナ | <i>Carassius auratus</i>              | キンギョ    |
| H171018-2 | 14.0 cm | 11.5 cm | 5.0 cm   | 43.9 g  | ゲンゴロウブナ | <i>Carassius auratus</i>              | キンギョ    |
| H171018-3 | 10.5 cm | 9.0 cm  | 3.5 cm   | 22.7 g  | ゲンゴロウブナ | <i>Carassius cuvieri</i>              | ゲンゴロウブナ |
| M171024   | 30.0 cm | 29.0 cm | 760.0 cm | 760.0 g | ゲンゴロウブナ | <i>Carassius cuvieri</i>              | ゲンゴロウブナ |
| M171025   | 23.0 cm | 19.0 cm | 200.8 cm | 200.8 g | ギンブナ    | <i>Carassius auratus</i>              | キンギョ    |
| M171030-1 | 21.5 cm | 17.5 cm | 183.7 cm | 183.7 g | ゲンゴロウブナ | <i>Carassius auratus</i>              | キンギョ    |
| M171030-2 | 9.5 cm  | 7.5 cm  | 10.6 cm  | 10.6 g  | ゲンゴロウブナ | <i>Carassius buergeri grandoculis</i> | ニゴロブナ   |

表4. 宝蔵寺沼三田ヶ谷池で採捕されたフナ属と同定結果

一番左の列はフナ属が採捕された日時をもとにした個体識別番号を示す。DNAの列には、NCBI Blast 相同性検索によって、相同性の最も高い値を示したフナの種名を記載した。

## 4. 考察

### 4-1. 宝蔵寺沼における環境DNA分析の有効性

近年、環境DNAを用いた研究は海や河川、池などの様々な場所で行われている<sup>2) 4) 19)</sup>。しかし、宝蔵寺沼のような水の流れがほとんどないよどんだ水、特に腐植酸を多く含む水を用いて環境DNA解析を行った先行研究は、現在まで報告は乏しい。腐植酸はPCR反応を阻害するため先行研究の手法そのままではうまくいかず、本研究では手法を改良する必要が生じた。そこで環境DNAの抽出にはフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿で前処理を行った後に、環境DNAの精製には、広く用いられているDNeasy Blood & Tissue kitを用いることにした。さらに、PCR阻害物質が含まれていてもPCR反応を進めることができるKOD FX Neoを酵素として使用した。しかし、1回目のPCRでは24サンプル中7サンプルではDNAの増幅が見られなかった。これは、水をサンプリングした周囲に生物が生息していなかった可能性だけでなく、PCR阻害物質が除去しきれなかったことも考えられるため、DNA抽出方法には改善の余地が残った。

環境DNAから生物種を特定する方法として、ユニバーサルプライマーを用いてPCRを行った後、次世代シーケンサーを用いて網羅的にDNA断片の塩基配列を解読する方法が一般的である<sup>20)</sup>。次世代シーケンサーを利用するには多大な費用がかかる。本調査では宝蔵寺沼6地点を4回調査したため、合計24点の環境DNA解析が必要であり、次世代シーケンサーの使用が現実的ではなかった。今回用いた大腸菌によるクローニングとシーケンス解析を行う方法は、より低コストで塩基配列を特定することができるというメリットがある。しかしその一方でこの方法では、その地点に生息するすべての生物種を把握することはできないというデメリットもある。本研究において漁具では採捕された生物種が環境DNA解析では検出できなかったことがそれを示している。一方で漁具による採捕調査では採捕されにくい大型の生物種（魚類や鳥類などを含む）が5種検出された。宝蔵寺沼は水路の幅が1～2mと狭く、水質もやや酸性に傾いており、魚類にとって好ましい生息環境ではない。それほど多くの魚種が生息するとは考えにくい場所で、水底に生息するカムルチー等を検出できたことで、今回の手法は宝蔵寺沼のような環境では有効な手法であるといえる。採捕調査と併用することで、採捕データを補足することに利用できる。

ユニバーサルプライマーの作成には、ミトコンドリアDNAの12s rRNAから16s rRNAにかけての領域を用いた。リボソームRNAは塩基配列の変異が起こりにくい遺伝子群であり、それゆえ全動物系統を解析するなど広く用いられている。その一方で遺伝子間領域など変異しやすい部位

が存在するため、近縁な動物系統解析にも用いられ、そのため比較するデータも豊富である。また、核DNAが1細胞に1つであるのに対し、ミトコンドリアは1細胞内に多数存在するため、ごく微量の細胞や組織からより多くのDNAを検出しやすい。今回は約800 bpと長い領域を増幅するプライマーを作成した。これにより近縁種であっても種を区別し、特定することが可能であった。さらに、制限酵素処理の手法を加えることで、ウシガエルのDNAを選択的に除去することができ、より効率的に魚類のDNAだけを解析することができた。

本研究では70サンプルをシーケンスし、34サンプル（48.6%）で種を特定することができた。種を特定できたもののうち魚類が27サンプル（38.6%）、鳥類が6サンプル（8.6%）、両生類が1サンプル（1.4%）であった（図3）。予備的な環境DNA解析では魚類の検出は0%と12.5%だったことから、手法の改良が結果として現れたといえる。実験に使用したプライマーセットは淡水魚類を標的として作成したが、コガモ、マガモ、ウシガエルといった魚類以外の生物も検出された。これらの3種は宝蔵寺沼と三田ヶ谷池で生息が目撃されている。これらの動物が検出されたことは予想外ではあるものの、生息する動物種の検出の幅が広がり、本研究に適したプライマー設計であったといえよう。ウシガエルは制限酵素反応による除去を試みたが、1.4%とわずかに検出されてしまった。これは制限酵素反応時間が足りずDNAが除去しきれなかったためであると考えられる。生物種を同定できなかったサンプルのうち、33サンプル（47.1%）は相同配列がNCBIデータベースになく、反復する配列が見られたもののそれぞれの反復配列に共通性がないため、制限酵素反応によって除去することはできなかった。環境DNAからこれらの不明配列を除き、より効率的に水生動物のみを検出するための改善は今後の課題となった。漁具による採捕地点と水のサンプリング地点は同じ地点であり、離れていたとしてもせいぜい数mであったが、検出された生物種は異なっていた。また、宝蔵寺沼のNo.8-1とNo.8-2は水路長が約10mほどしか離れておらず、ほぼ同時に水をサンプリングして環境DNA解析を行ったが、検出される種が異なっていた。これは水の流れがほとんどない宝蔵寺沼では、環境DNAがほとんど拡散しないことを示唆している。

環境DNA分析により同定できた魚類はフナ1属とその他4種であり、このうち宝蔵寺沼で検出されたフナ属やカムルチーは、同時に行われた漁具を用いた採捕調査では採捕されていない種であった。ちなみに本研究以前に行われた採捕調査では、フナ属は2010年6月～2013年3月、カムルチーは2013年10月に採捕されている。またフナ属やカムルチーは日常的に行われる沼の整備において確認されているため、本研究における環境DNA調査の結果は妥当であると言えよう。カムルチーは夜行性のため、日中行う採捕調査で採捕しにくいこと、フナ属は人間の気配を感じると身を隠すことから採捕調査では捕まえにくかったと考えられる。ちなみにカムルチーは肉食魚であり、カムルチーのDNAを検出した水路には多くのスジエビが生息していることから、カムルチーが生息しやすい環境であると考えられる。上記のことから、本研究の環境DNA解析は、大型魚類の生息の有無を確認する手段として、有効であることが示されたといえる。一方小型魚類に関しては、3月のSt.クロアミ、6月のSt.クロアミとSt.ポンプ、10月のSt.パイプとSt.クロアミではモツゴが採捕されていたものの、同地点の環境DNA分析では検出することはできなかった。これは、モツゴは小さく、水中へのDNAの放出が少ないため、検出できるほどのDNAを得られなかったと考えられる。三田ヶ谷池で検出されたナマズは夜行性の肉食魚であり<sup>21)</sup>、2012年から行われている三田ヶ谷池水生動物相調査（矢部ら 私信）において採捕された記録がなかった。一方水生動物相調査で採捕されたオオクチバス、ウキゴリ、ブルーギル*Lepomis macrochirus*、モツゴ、ツチフキ、タイリクバラタナゴ*Rhodeus ocellatus*、ドジョウ、ヨシノボリ属、フナ属は検出されなかつ



た。採捕されていなかった種を検出できたことは、今後新たな外来魚の侵入を早期に発見することが可能になったと考えられる。一方で採捕した魚類をすべて検出することができなかったことから、環境DNA分析は採捕調査に置き換わるものではなく、互いに結果を補足するものだと考えられる。

#### 4-2. 宝蔵寺沼に生息するフナ属の同定

現在日本に生息するフナ属は、ゲンゴロウブナ、ギンブナ、ニゴロブナ、ナガブナ *Carassius buergeri* subsp1.、キンブナ *Carassius buergeri* subsp2.、オオキンブナ *Carassius buergeri*、キンギョがあげられる<sup>18)22)</sup>。フナ属の学名には論争があり、本研究ではキンギョ以外の学名を細谷<sup>18)</sup>に、キンギョの学名は宮地ら<sup>22)</sup>に従った。宝蔵寺沼と三田ヶ谷池で採捕されたフナ属8匹のうち、6匹の形態的特徴がミトコンドリアDNAと一致しなかった(図11)。これにはいくつかの理由が考えられる。フナ属は亜種間で交雑し生殖能力を持つ雑種が生まれる。世代を経るにつれ父母片方の形態的特徴が失われたとしても、ミトコンドリアは母系遺伝のため、母方の祖先の種のミトコンドリアを受けついでいる。そのため、雑種の場合形態的特徴とミトコンドリアDNAの分類は一致しない場合が生じる。本研究で環境DNAによるフナ種の同定の結果、ニゴロブナ、キンギョ、ゲンゴロウブナが検出された。このうち、キンギョは家庭で飼育されていたものが放流されたと考えられる。ニゴロブナは琵琶湖固有亜種、ゲンゴロウブナは琵琶湖及び淀川水系が天然分布とされている。ゲンゴロウブナは釣り目的で日本各地に放流されていることから、宝蔵寺沼に放流されたことも考えられる。その時ニゴロブナも混ざって放流された可能性がある。このことは、以前同じ淀川に生息し、ゲンゴロウブナとともに放流されて各地に広がったツチフキが宝蔵寺沼で採捕された記録もあることから推測される。また、生息地が重なるゲンゴロウブナとニゴロブナの交雑種が宝蔵寺沼に放流された可能性もある。ギンブナは3倍体のフナで雌のみの単為生殖を行い交雑が起こらないとされている。ギンブナはこれまで1亜種と分類されてきたが、近年のDNA解析によって3倍体フナには複数の系統があり、別々の起源をもつ可能性が指摘されている<sup>23)</sup>。この説が正しければギンブナ様フナのミトコンドリアDNAが別のフナ属のミトコンドリアDNAと一致することも考えられる。フナ属の分類についてはいまだに結論が出ていないため、本研究の水生動物相調査と環境DNA解析ではすべてフナ属として扱うことにした。

#### 4-3. 環境DNA分析からのムジナモ保全への提言

宝蔵寺沼の環境DNA分析で、カムルチーを3調査地点で検出することができた。特にSt.クロアミでは6月と8月に検出している。このSt.クロアミはムジナモ不生育の地点であり、カムルチーの他に、スジエビ、ウシガエル幼生が生息している。このSt.クロアミでムジナモが繁茂していない要因として、水生動物による食害だけでなく、水生動物によるヘドロ層の攪拌が考えられる。岡本<sup>24)</sup>は宝蔵寺沼内でムジナモが生育している地点では固い底面上にアシが成長している一方、ムジナモが不生育の地点ではヘドロ層が沼底に堆積していると報告している。流入の要因の一つとしてコイ、アメリカザリガニ、スジエビ、ウシガエル幼生、カムルチーなどの生物による底泥攪拌が指摘されている。仮に肉食魚であるカムルチーの生息数を減らすことを考えると、底泥攪拌の頻度が減少し、ヤゴなどの水生昆虫が増えることが期待される。その一方でアメリカザリガニやスジエビ、ウシガエル幼生の生息数を増加させることとなり、ムジナモの食害やカムルチー以外の底泥攪拌が増加することも考えられる。反対に、カムルチーの生息数を増やすことを考えた場合、



アメリカザリガニやスジエビ、ウシガエル幼生の生息数は減少すると考えられるが、他の小型魚類の生息数も減らすことにもつながる。カムルチーの増減を考えた場合と同様に、フナ属の生息数を極端に減らすことは、他の水生動物の生息数を大きく変化させることにつながると考えられる。このように宝蔵寺沼に生息する生物は複雑に絡んだ深い関係があり、駆除の規模によっては生態系のバランスを崩すことにもなる。生物の駆除は水生動物相調査や水質調査、ムジナモ株数の結果を見ながら慎重に行わなければならない。

#### 謝辞

魚類調査の実施また魚類のサンプル提供に当たっては、埼玉県立さいたま水族館飼育課、矢部徹氏や大平信一氏をはじめとする飼育課の皆様にご協力をいただきました。矢辺氏にはフナの同定方法をご指導いただき、この場で厚く御礼申し上げます。本大学教授、金子康子先生から貴重なアドバイスをいただきました。また、調査への同行、採集した水サンプルのろ過に協力していただいた日比野研究室のみなさんへ、ここに感謝の意を表します。本研究は科学研究費補助金基盤研究（C）（課題番号17K01016，研究代表者日比野拓）の助成を受けて行われた。

#### 引用文献

- 1) Thomsen, P. F., Kielgast, J. O. S., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., et al. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular ecology*, 21 (11), 2565–2573.
- 2) Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2011). “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4(2), 150–157.
- 3) 福岡有紗, 高原輝彦, 松本宗弘, 丑丸敦史, & 源利文. (2016). 在来希少種カワバタモロコの環境DNAによる検出系の確立. *日本生態学会誌*, 66(3), 613–620.
- 4) Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., & Kawabata, Z. I. (2012). Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PloS one*, 7(4), e35868.
- 5) Yamamoto, S., Masuda, R., Sato, Y., Sado, T., Araki, H., Kondoh, M., et al. (2017). Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific reports*, 7, 40368.
- 6) Nakagawa, H., Yamamoto, S., Sato, Y., Sado, T., Minamoto, T., & Miya, M. (2018). Comparing local-and regional-scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods. *Freshwater Biology*.
- 7) 日比野拓, 宇田川貴大, 伊藤悠昭, 矢邊徹, 梅沢一弘, & 関森清己. (2015). 宝蔵寺沼ムジナモ自生地緊急調査「II-7. 水生動物相の変遷とムジナモ食害の調査」. 宝蔵寺沼ムジナモ自生地天然記念物緊急調査報告. 羽生市教育委員会. 82–96.
- 8) 金子康子. (2015). 宝蔵寺沼ムジナモ自生地緊急調査「II-11. ムジナモの自生地調査」. 宝蔵寺沼ムジナモ自生地天然記念物緊急調査報告. 羽生市教育委員会. 212–236.
- 9) 吉田竜矢, 田端雄樹, 伊藤悠昭, 山本孔紀, 矢辺徹, 金子康子, 日比野拓. (2017). 地域に密着した環境保全をテーマとした学習指導の開発. *埼玉大学紀要 教育学部*, 66(2), 609–622
- 10) 吉田竜矢, 宇田川貴大, 日比野拓. (2018). ムジナモ自生地緊急調査後4年間の宝蔵寺沼水生動物相の変遷. *埼玉大学紀要 教育学部*, 67(2), 341–351
- 11) Fukumoto, S., Ushimaru, A., & Minamoto, T. (2015). A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan. *Journal of Applied Ecology*, 52(2), 358–

365.

- 12) Minamoto, T., Naka, T., Moji, K., & Maruyama, A. (2016). Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction. *Limnology*, 17 (1), 23-32.
- 13) Deagle, B. E., Tollit, D. J., Jarman, S. N., Hindell, M. A., Trites, A. W., & Gales, N. J. (2005). Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. *Molecular Ecology*, 14(6), 1831-1842.
- 14) Iwasaki, W., Fukunaga, T., Isagozawa, R., Yamada, K., Maeda, Y., Satoh, T. P., et al. (2013). MitoFish and MitoAnnotator: A mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. *Molecular biology and evolution*, 30(11), 2531-2540.
- 15) Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30 (4), 772-780.
- 16) Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- 17) 中村守純. (1969). 日本のコイ科魚類：日本産コイ科魚類の生活史に関する研究. 資源科学研究所.
- 18) 細谷和海. (2015). 山溪ハンディ図鑑15 日本の淡水魚, 山と溪谷社.
- 19) Jo, T., Murakami, H., Masuda, R., Sakata, M., Yamamoto, S., & Minamoto, T. (2017). Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*.
- 20) 山中裕樹, 源利文, 高原輝彦, 内井喜美子, & 土居秀幸. (2016). 環境 DNA 分析の野外調査への展開. *日本生態学会誌*, 66(3), 601-611.
- 21) 森晃, 水谷正一, & 後藤章. (2013). 小河川における超音波テレメトリーを用いたナマズの行動解析. *応用生態工学*, 16(1), 23-35.
- 22) 宮地傳三郎, 川那部浩哉, 水野信彦. (1976). 原色日本淡水魚類図鑑, 保育社.
- 23) Yamamoto, G., Takada, M., Iguchi, K. I., & Nishida, M. (2010). Genetic constitution and phylogenetic relationships of Japanese crucian carps (*Carassius*). *Ichthyological research*, 57 (3), 215-222.
- 24) 岡本和明. (2015). 宝蔵寺沼ムジナモ自生地緊急調査「II-5. 土壌粒子化学分析」. 宝蔵寺沼ムジナモ自生地天然記念物緊急調査報告. 羽生市教育委員会. 69-71.

(2018年10月31日提出)

(2018年11月16日受理)

# Aquatic Fauna of Hozoji Pond Surveyed Using Environmental DNA Analyses: Compared to Field Surveys

**YOSHIDA, Tatsuya**

Graduate School of Education, Saitama University

**HIBINO, Taku**

Faculty of Education, Saitama University

## Abstract

Hozoji pond is a natural habitat of the almost extinct aquatic carnivorous plant, *Aldrovanda vesiculosa* L., where aquatic fauna has been investigated using fishing implements since 2010. Recent our field surveys using the fishing implements have shown small-sized fish species exist in the pond in addition to a large number of shrimps, tadpoles, and crayfishes; signs of large fish have been just witnessed there. Here we attempted the identification of aquatic vertebrates using environmental DNA (eDNA) and compared the results to those of field surveys in Hozoji pond and the surrounding, Mitagaya pond. We performed eDNA experiments using newly designed primers, cloning an eDNA fragment, and digesting with restriction enzymes. The results showed 49% of 70 clones were positively identified as vertebrates. Besides, gibel *Carassinus* sp. and snakehead *Channa argus* were detected, which have not captured these days. The species of 8 individuals of *Carassinus* sp. identified from mitochondrial DNA sequencing were distinct from those on morphological traits, suggesting crossing occurs in the pond. The methods of eDNA analysis in this study are competent to reveal a closed aquatic fauna, like Hozoji pond. The detailed fauna could be understood using eDNA as the complement to field surveys.

**Keywords:** eDNA, field survey, crossing, species diversity, special natural monument