

環境DNAー生態学の未来を拓く

Environmental DNA Opening the Way to the Future of Ecology

要 旨 集

Abstracts



第6回環境DNA学会九州大会

The 6th Annual Meeting (Kyushu)

2023 12.2~5
SAT TUE

九州大学西新プラザ・九州大学椎木講堂
Nishijin Plaza・Shiiki Hall (Kyushu University)

【P-01】

軟体動物門（腹足類と二枚貝類）の環境DNAメタバーコーディングのためのPCRプライマーの開発

Development of PCR primers for environmental DNA metabarcoding of Mollusca (Gastropods and Bivalves)

*中村 匡聡¹、白子 智康¹、渡部 恵司²、伊藤 健二²、竹村 武士²、吉村 泰幸²、芝池 博幸²、小出水 規行²

*Masatoshi Nakamura¹, Tomoyasu Shirako¹, Keiji Watabe², Kenji Ito², Takeshi Takemura², Yasuyuki Yoshimura², Hiroyuki Shibaike², Koizumi Noriyuki²

1. いであ（株）、2. 農研機構

1. IDEA Consultants, 2. NARO

軟体動物門は、節足動物門に次いで2番目に大きな動物群であり、海域、淡水域や陸域まで地球上の様々な環境に適応している。その中でも、いわゆる”貝類”と呼ばれる腹足類と二枚貝類は、商業的に利用される多くの種を含むほか、水域生態系の主要な構成種としてよく知られている。本研究では貝類の生物多様性を非侵襲的にモニタリングするために、腹足類と二枚貝類を対象にした環境DNAメタバーコーディングの検出系を開発した。プライマーは、軟体動物門のほか節足動物門や環形動物門等の主要な水生無脊椎動物の塩基配列を国際塩基配列データベースから取得した後、核DNAの28S rRNA遺伝子領域上に設計した。貝類と他の主要な生物分類群から得られた組織抽出DNA混合液及び淡水域から採水した環境DNA抽出液を用いて、本プライマーの貝類特異的な検出性能を評価した。

The phylum Mollusca is the second largest group of animals after the phylum Arthropoda, and is adapted to a wide variety of environments on the earth, including marine, freshwater, and terrestrial areas. Gastropods and bivalves, the so-called "shellfish," include many commercially valuable species and are known as major components of marine and freshwater ecosystems. In this study, we developed a pair of PCR primers for eDNA metabarcoding of gastropods and bivalves to non-invasively monitor shellfish biodiversity. After downloading the sequences of major aquatic invertebrates from NCBI database, these primers were designed on the 28S rRNA gene region of nuclear DNA. The shellfish-specific detection performance of these primers was evaluated using DNA mixtures extracted from the tissues of shellfish and other major taxa, as well as eDNA extracts sampled from freshwater areas.

【P-02】

トンボの検出に特化した環境DNAメタバーコーディング法の開発

An environmental DNA metabarcoding method for Odonata species detection

*山本 哲史¹、馬場 友希¹

*Satoshi Yamamoto¹, Yuki Baba¹

1. 農研機構

1. NARO

生物多様性保全の必要性が高まるなか、日本の水田では環境保全型農法が推奨されている。水田における環境DNA分析は、このような取り組みが実際に生物多様性の保全に寄与しているかどうかを効率的に検証するのに有効な方法である。トンボ類は農薬や農法によってその多様性が変化するため、環境保全型農法の取り組みを評価するのに適した分類群である。また、一般市民にも馴染み深く保全効果の訴求にも適している。そこで、日本産トンボ目昆虫全種を検出可能な環境DNA分析法を開発し、その適用範囲を探るため水田、河川、池の環境DNAサンプルで手法の性能を評価した。本手法を用いることで、調査地で確認したほぼ全てのトンボ類を含む多数のトンボ類を検出した。1回のNGSランのデータに占めるトンボ配列は水田や池のサンプルでは90%を超えた。一方、河川サンプルではカワゲラ目とカゲロウ目の配列が多く、トンボ目の配列は10%程度であった。

Environmental DNA (eDNA) metabarcoding would be useful for biodiversity monitoring in Japanese paddy fields which have an important conservation function as alternative wetlands. The species diversity of Odonata is very sensitive to pesticide chemicals and agricultural practices, so that suitable taxa for evaluation of conservational effect in paddy fields. In addition, Odonata diversity can appeal to customers because Japanese citizens are generally familiar with Odonata species. In this study, we developed an eDNA metabarcoding method to detect all Japanese Odonata species and evaluated the method using eDNA samples collected in paddy fields, rivers and ponds. As a result, the method can detect many Odonata species including almost all species we observed at sampling sites. In each NGS run, the frequency of sequencing reads from Odonata species was more than 90% for paddy and pond samples. On the other hand, there were many sequencing reads of mayflies and stoneflies in river samples, and the frequency of Odonata was ~10%.

【P-03】

救え！トゲナベブタムシ！ー環境DNA分析を用いた生息域調査ー

Save! *Aphelocheirus nawai*!

-Habitat survey with environmental DNA analysis-

*日野 友晴¹

*Tomoharu Hino¹

1. 淳心学院中学校高等学校

1. Junshin high school

水生昆虫のトゲナベブタムシは絶滅危惧2類に指定されており保全が急務である。近縁種のナベブタムシは全国的に生息しているが、トゲナベブタムシは生息域が把握できておらず保全上問題である。本研究ではトゲナベブタムシの生息域の解明を目標に環境DNA分析系の設計を行った。トゲナベブタムシとナベブタムシのmtDNA16s領域をシーケンシングした上で、トゲナベブタムシに特異的なプライマーを設計し、種特異性と検出限界を確認した。シーケンシングの結果、2種のmtDNA16s領域の塩基配列に違いが確認できた。両種のDNAを鋳型にしたPCR実験により、作成したプライマーの特異性が確認され、鋳型DNA量が0.01pgでも検出可能であることが分かった。このことから、作成したプライマーは環境DNA手法での調査に使用できると考えられる。今後は関西の河川から環境DNA調査を行い、トゲナベブタムシの生息域を特定したい。

Aphelocheirus nawai is an aquatic insect that is listed as a vulnerable species and its conservation is in urgent need. *Aphelocheirus vittatus*, a closely related species, is known to habitats in Japan, however the distribution of *A. nawai* is not understood. In this research, I designed species-specific environmental DNA assay for elucidating the habitat of *A. nawai*. The mtDNA 16S region of two closely related species, *A. vittatus* and *A. nawai* were sequenced, and then the specificity and detection limit of the assay were tested. The results showed that there were differences in the nucleotide sequences in the mtDNA 16S region of the two species. The assay for the *A. nawai* was species-specific and could detect even 0.01 pg of DNA. This indicates that the assay has the potential to be used in environmental DNA surveys. In the future studies, I will conduct environmental DNA surveys from rivers in the Kansai region to identify the habitat of *A. nawai*.

【P-04】

ローラー表面eDNA法による山林の生態調査に向けて

Toward ecological survey of mountain forests by roller surface eDNA methods

*半田 佳宏¹、坂場 友香¹、梁田 椋也¹、鈴江 陽一郎¹、土金 恵子¹、渡邊 英征¹、塩田 創一郎¹、中野 江一郎¹

*Yoshihiro Handa¹, Tomoka Sakaba¹, Ryoya Yanada¹, Yoichiro Suzue¹, Keiko Tsuchikane¹, Hideyuki Watanabe¹, Soichiro Shiota¹, Koichiro Nakano¹

1. 株式会社生物技研

1. Bioengineering Lab. Co., Ltd.

環境DNA分析は河川や海洋の生態調査において有力なツールになっている。これに伴い、山林や草地などの環境における生態調査や評価にも環境DNA分析を導入したいという要望が高まっている。しかし、これまで大気や土壌などのサンプリング方法が行われてきたが、感度や検出数が不十分であることが課題とされてきた。そこで、私たちは近年PetersonらやAllenらによって報告されたローラー表面eDNA法と目視調査との比較を行った。その結果、私設公園内で哺乳類と植物、昆虫において、それぞれ83%、35%、21%の割合で目視調査と一致した結果が得られた。発表では、さらにサンプリング範囲を広げた高尾山の結果を示すとともに、この方法の簡便性と問題点について議論したい。

Environmental DNA analysis has become a powerful tool in ecological surveys of rivers and oceans. Consequently, there is a growing demand to introduce environmental DNA analysis into ecological surveys and evaluations of environments such as mountain, forests and grasslands. However, the insufficient sensitivity and detection ability of the sampling methods currently used for air and soil is still an unresolved issue. Therefore, we carry out a comparative investigation between the recently reported roller surface eDNA method (Peterson et al., 2022; Allen et al., 2023) and visual surveys. As a result, the results of mammals, plants, and insects in private parks was consistent with visual surveys at a rate of 83%, 35%, and 21%, respectively. In the presentation, I would like to show the results of Mt. Takao using the roller method, which has been expanded in the sampling range, and discuss the simplicity and problems of this method.

【P-05】

樹幹流を利用した新たな樹上生物多様性モニタリング法の開発と地衣類を用いた予備的検証

Development of a new method for monitoring arboreal biodiversity using stemflow: preliminary validation using lichens

*坂田 歩美¹、佐土 哲也¹、岡 慎一郎²、潮 雅之³、宮 正樹¹

*Ayumi Sakata¹, Tetsuya Sado¹, Shin-ichiro Oka², Masayuki Ushio³, Masaki Miya¹

1. 千葉県立中央博物館、2. 一般財団法人 沖縄美ら島財団、3. 香港科技大学

1. Natural History Museum and institute, Chiba, 2. Okinawa Churashima Institute, 3. Hong Kong University of Science and Technology, Clear Water Bay, Kowloon, Hong Kong SAR

森林の林冠層は陸上生物の多様性が高い場所の一つとされているが、その調査には大がかりな装置や多くの人手に加えて多額の費用を伴う。本研究では、木の幹を伝って流れる雨水（樹幹流）を回収する方法を開発し、樹幹流に含まれる樹上生物のDNAが検出できるかどうか観察が容易な地衣類を用いて検証を行った。樹幹にガーゼとゴムロープを巻きつけ、それらを伝って流れる樹幹流を漏斗経由でポリ袋に回収した。回収した樹冠流に加え、樹幹流が染みたガーゼを滅菌水に浸すことで比較的大きい生物断片も回収した。樹幹流とガーゼを浸した滅菌水を別々のフィルターでろ過し、フィルター上からDNAを抽出した後に環境DNAメタバーコーディング法で地衣類の検出を試みた。その結果、目視観察された葉状地衣の大半が検出され、さらに目視観察できなかった葉状地衣も数種検出されることが明らかになった。

The forest canopy harbors a diverse array of organisms. However, monitoring their biodiversity poses challenges due to limited accessibility, as it involves the use of large-scale equipment, a significant amount of manpower, and huge amounts of money. To address these challenges, we developed a new method for capturing arboreal biodiversity by harnessing stemflow as a source of DNA from organisms inhabiting trees. To validate our method, we focused on lichens, which are easily observable on tree surfaces. Our method involves encircling the tree trunk with gauze, directing the stemflow along the gauze into a funnel, and collecting it in a plastic bag. We employed dual collection systems to retrieve environmental DNA (eDNA) from the stemflow: the gauze trap, designed to capture macroscopic biological fragments, and the plastic bag trap, which collected the stemflow itself. The trapped fragments and stemflow were separately filtered, and eDNA was subsequently extracted from the filter membranes. We performed eDNA metabarcoding and successfully detected a majority of the observed foliose lichen species, including those not identified through visual observation alone.

【P-06】

ドジョウ飼育水を用いた時間経過と温度変化による環境DNA量の変化

The changes in environmental DNA content over time and temperature within the water that loaches were reared in

*松原 慶治¹、柴 葉月¹、中山 絢乃¹、村山 昂輝¹

*Keiji Matsubara¹, Haduki Shiba¹, Ayano Nakayama¹, Kouki Murayama¹

1. 石川県立七尾高等学校

1. Ishikawa Prefectural Nanao High School

環境DNAによる調査は、生物を捕獲せずに環境水から生物種の特定ができる。これまでに、採取した環境水に含まれるDNA量からの個体数推定が検証されてきたが、DNAは温度やバクテリアによって分解が進むため、個体数推定の手法は確立できていない。本研究では、環境条件のなかでも変化の大きい水温に注目した。

時間経過と温度変化による環境DNA量の変化について調べるため、ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus* を室内で飼育し実験を行った。室内の気温約28℃、無給餌、エアレーションを付けた水槽でドジョウ10匹を2日間飼育した。この飼育水を3つの容器に8Lずつ分注し、それぞれを冷蔵庫、15℃のインキュベーター、室温約28℃で保管した。そして分注後すぐ・1時間後・3時間後・5時間後・8時間後・24時間後・48時間後に1Lずつろ過・DNA抽出を行いリアルタイムPCRでDNA量を計測した。

Surveys using environmental DNA can identify species from environmental water without actually capturing the organisms. In the past, it has been tested whether it is possible to estimate population size based on the amount of DNA contained in the collected environmental water. However, because DNA is degraded by temperature and bacteria, this method of population estimation has not been established. In this study, we focused on the water temperature, which varied greatly among the various environmental conditions of different parts of the river.

To investigate changes in environmental DNA content over time and temperature, we conducted an experiment in which *Misgurnus anguillicaudatus* loaches were reared indoors.

Ten loaches were reared for two days in an aquarium with a temperature of about 28℃, no feeding, and aeration.

The water that the loaches were reared in was transferred into 3 containers of 8 liters each, and each container was kept in either a refrigerator, an incubator at 15℃, or indoor temperature. Then, suction filtration was performed immediately, 1 hour, 3 hours, 5 hours, 8 hours, 24 hours, and 48 hours after transferring. DNA extraction was then performed, and the amount of DNA was measured by real-time PCR.

【P-07】

メコン住血吸虫の環境DNA検出系の開発と野外への応用

Development of detection assay for *Schistosoma mekongi* eDNA and its application in the field

*松村 奈桜¹、松尾 莉子¹、坂田 雅之²、倩倩¹、源 利文¹

*Nao Matsumura¹, Riko Matsuo¹, Masayuki K. Sakata², Qianqian Wu¹, Toshifumi Minamoto¹

1. 神戸大・院・人間発達、2. 北海道大・院・農

1. Kobe Univ., 2. Hokkaido Univ.

住血吸虫症は「顧みられない熱帯病（NTDs）」として定義される疾患の1つで、感染によって生じる経済と健康医療への影響が問題視されている。住血吸虫症は水中で淡水貝から遊出した住血吸虫属のセルカリアが経皮感染することで引き起こされる(WHO, 2020)。本研究では感染縮小に向け、環境DNA手法によりメコン住血吸虫 (*Schistosoma mekongi*)の生息域を広範囲で明らかにし、感染リスクの高い場所の把握を目指す。本発表ではメコン住血吸虫を野外にて検出する前段階として、検出感度の向上に向けて以下の3点から検討を行った。まず調査地で安定した電源の確保に不安がある場合に向け、サンプルを冷凍できない状況を想定したサンプル保存法を検討した。次に電源を必要としない重力ろ過法について、他のろ過方法との比較検討を行った。最後に、より特異性の高いメコン住血吸虫の検出系を開発した。

Schistosomiasis is listed as one of the “Neglected Tropical Diseases (NTDs)” and its economic and health consequences are of concern. Human transmission occurs through contact with water infested with larval forms (cercariae) (WHO, 2020). We aim to examine the habitats of *Schistosoma mekongi* using eDNA assay and to identify highly infected areas. In this study, before detecting *S. mekongi* in the field, we aim to improve the detection sensitivity and indicate three results below. First, we examined the optimum way for store samples in our field, where it is sometimes difficult to secure stable power supply there. Second, we compared the filtration systems including the gravity filtration which does not require electronic power. Finally, a species-specific set of primers and a probe was developed for detecting *S. mekongi* DNA from water samples.

【P-08】

環境DNA解析による人の行動の遡及的推測

Retrospective inference of human behavior using environmental DNA analysis

*同前 友季子¹、山田 俊輔¹、岡本 元臣¹、池本 千紘¹、稲泉 萌¹、道上 知美²、永井 淳²

*Yukiko Dozen¹, Shunsuke Yamada¹, Masaomi Okamoto¹, Chihiro Ikemoto¹, Moe Inaizumi¹, Tomomi Michiue², Atsushi Nagai²

1. 岐阜大・医、2. 岐阜大・院・法医

1. Sch. Med. Gifu Univ., 2. Dpt. Legal Med. Gifu Univ.

法科学において、人の行動を遡及的に推測することは非常に重要である。我々は、eDNA解析技術を利用し、室内環境において採取したヒトDNAから人の行動が推測可能か否かを検討したので報告する。なお、本研究は岐阜大学大学院医学系研究科医学研究等倫理審査委員会の承認を得て実施した。研究室や、数名の被験者が生活する部屋の床等から粘着ロールクリーナー等を使用してサンプル（ほこり等）を採取した。すべてのサンプルで複数の人物由来のDNA型が得られたが、多くのサンプルでその場所を頻繁に利用した人物のDNA型と一致するアレルが、より多く、より高いピークとして検出された。今回の実験で、ヒトeDNAの解析結果は人の行動と関係があることが示唆された。ヒトeDNAを解析することにより、監視カメラ等がない環境でも、特定の人物が頻繁に使用した場所や、多くの人が利用した場所を遡及的に特定することが可能であると考えられる。

Retrospective inference of human behavior is crucial in forensic science. We used environmental DNA (eDNA) analysis to investigate whether human behavior can be inferred from human DNA collected in indoor environments. Samples (such as dust) were collected using roll cleaner from the floors of the laboratory and certain rooms where some participants lived. Alleles detected in all samples were mixed but those matching the DNA types of individuals who frequently used the area were found more often. A relationship between the results of human eDNA analysis and human behavior, including the frequently used area, was observed. It is suggested that the analysis of human eDNA allows the retrospective inference of human behavior.

【P-09】

哺乳類の食べた物のDNAはいつまで糞から検出できるか？

How long can food DNA be detected in mammal's feces?

*小坂井 千夏¹、藤本 竜輔¹、長谷川 綾香²

*Chinatsu Kozakai¹, Ryusuke Fijimoto¹, Ayaka Hasegawa²

1. 農研機構、2. 元・農研機構

1. NARO, 2. Former Affiliation: NARO

動物の糞や胃内容物のDNAメタバーコーディング分析はこれまで同定の難しかった品目についても採食が確認でき、外来哺乳類における在来希少両生類の捕食確認や、ネズミ類による詳細な採食部位の同定などにも利用されている。しかし、採物のDNAが採食後どの程度の期間、哺乳類の糞や胃内容物から検出できるかについては情報が無いため、飼育アライグマでの検証を行った。飼育個体4頭に大粒のブドウ15粒程度を食べさせた後に一定期間の糞全てを採取し、ビデオ録画した映像から採食から排便までの時間を記録した。分析は生物技研に委託し、プライマーにはrbcl (gPlant)を利用した。糞からブドウDNAが検出されたのは最も長い個体でも1日後までであった。

DNA metabarcoding analysis of animal feces and stomach contents can reveal more detailed feed items than conventional visual methods. It has been used to obtain evidence of predation of native amphibians (which are difficult to trace) by non-native mammals and to understand the characteristics of crop damage. However, there is no information on how long DNA of food can be detected in feces and stomach contents after foraging in mammals, so we conducted a verification in captive raccoons. After feeding about 15 large grapes to 4 captive raccoons, all feces were collected for a certain period of time, and the time from foraging to defecation was recorded from video recordings. The analysis was contracted to Bioengineering Laboratory, Inc. and primer rbcl (gPlant) was used. Grape DNA could be detected in fecal samples up to 1 day later. Grape DNA was not detected in feces until one day after the longest individual.

【P-10】

環境DNAメタバーコーディング手法を用いたため池における水生植物のモニタリング

Monitoring aquatic plants in irrigation ponds using environmental DNA metabarcoding techniques

*小川 あゆみ¹、久富 早織²、橋本 渚³、坂田 雅之⁴、源 利文³

*Ayumi Ogawa¹, Saori Hisatomi², Nagisa Hashimoto³, Masayuki K Sakata⁴, Toshifumi Minamoto³

1. 京都大学、2. 東京農工大学、3. 神戸大学、4. 北海道大学

1. Kyoto University, 2. Tokyo University of Agriculture and Technology, 3. Kobe University, 4. Hokkaido University

近年、ため池の放棄によって、ため池内の生物多様性の低下が全国各地で生じている。こうした現状を受け、全国でため池の環境保全や維持管理への取り組みが実施されており、その一環として、ため池内及びその周辺のモニタリング調査が行われている。しかし、ため池内に生育する水生植物のモニタリングは、種同定が容易ではないこと、沈水植物や一部の浮遊植物では、水面からの目視が困難であることが課題としてあげられる。また、従来のモニタリング法では、過去の植生の情報を得ることが困難である。そこで本研究では、水中と堆積物中に含まれる環境DNAの分解速度の違いを利用し、放棄されたため池における水生植物の検出種の比較を、環境DNAメタバーコーディング手法を用いて試みた。その結果、水サンプルと堆積物サンプルからの検出種の比較によって、植生の変化をモニタリングできる可能性を示すことができた。

In recent years, the increase in the number of abandoned reservoirs has led to a decline in the biodiversity of reservoirs throughout Japan. In response to this situation, efforts are being made nationwide to conserve and maintain the environment of reservoirs, and as part of these efforts, monitoring surveys are being conducted in and around reservoirs. However, monitoring of aquatic plants, which are the target species of this research, is challenging as it is difficult to identify species and visually observe submerged plants and some floating plants from the water surface. Furthermore, it is difficult to obtain information on past vegetation using conventional monitoring methods such as visual inspection and collection. In this study, we attempted to compare detected aquatic plant species in abandoned reservoirs using the environmental DNA metabarcoding method, taking advantage of differences in degradation rates of environmental DNA in water and sediment. The results showed the feasibility of monitoring vegetation changes by comparing eDNA detections from water and sediment samples.

【P-11】

河川魚類調査への活用を目指したパッシブサンプリングツールの実証試験について

Demonstration test of passive sampling tool for use in river fish surveys

*郡司 未佳¹、今村 史子¹、五十嵐 美穂¹、前原 裕¹、都築 隆禎²、内藤 太輔²、中尾 遼平³、赤松 良久³

*Mika Gunji¹, Fumiko Imamura¹, Miho Igarashi¹, Yu Maebara¹, Takayoshi Tsuzuki², Daisuke Naito², Ryohei Nakao³, Yoshihisa Akamatsu³

1. 日本工営株式会社、2. 公益財団法人リバーフロント研究所、3. 山口大学大学院創成科学研究科

1. Nippon Koei Co., Ltd., 2. Japan Riverfront Research Center, 3. Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, Yamaguchi Uni.

日本において環境DNA調査方法の主流となっている日中の採水では、夜行性の魚種や希少種が検出されない場合があり、魚類の全相把握に向けて課題が残る。このため、設置期間中に捕集材が暴露される環境DNAを捕集できる可能性があるパッシブサンプリング（PS）の導入を試みた。実証試験は河川域における魚類相把握を目的に実施し、採捕、採水及びPSの3手法を比較した。結果、PSは採捕や採水よりも明瞭に検出された魚類数が多かった。また、採水より魚類のDNA量が多く検出される傾向にあった。PSを利用することで、一度の設置回収により、夜行性や希少種等の環境DNAを検出できることが期待された。現在、他河川においてもPSの実証試験を進めており、泥成分を多くトラップしたサンプルではPCR阻害が確認される等、今後の検討事項も見えてきた。

Daytime water sampling, which is the mainstream environmental DNA survey method in Japan, may not detect nocturnal fish species or rare species, leaving a challenge for understanding the entire fish fauna. Therefore, we attempted to introduce Passive Sampling (PS), which has the potential to collect environmental DNA to which the adsorbent is exposed during the installation period. Demonstration tests were conducted to understand the fish fauna in the river area, and three methods were compared: sampling, water catching fishes, and PS. The results showed that the number of fish species detected by PS was clearly higher than that by catching fishes or water sampling. It also tended to detect more fish DNA than water sampling. It was expected that PS could be used to detect environmental DNA of nocturnal and rare species, etc., after a single installation and collection. Currently, PS is being tested in other rivers, and future studies are underway, including the confirmation of PCR inhibition in samples with a large amount of trapped mud components.

【P-12】

高濁度水サンプルからの環境核酸抽出方法の検討

Study on environmental nucleic acid extraction methods from highly turbid water samples

*山本 優奈¹、岩本 遼²、平山 一槻¹、小川 あゆみ³、坂田 雅之⁴、源 利文¹

*Yuna Yamamoto¹, Ryo Iwamoto², Itsuki Hirayama¹, Ayumi Ogawa³, Masayuki K Sakata⁴, Toshifumi Minamoto¹

1. 神戸大学、2. 株式会社 AdvanSentinel、3. 京都大学、4. 北海道大学

1. Kobe Univ., 2. AdvanSentinel Inc., 3. Kyoto Univ., 4. Hokkaido Univ.

環境DNA分析において現時点での課題は、夾雑物が多い水をろ過する際、フィルターが目詰まりして十分なサンプル量をろ過できず、検出感度が低下することである。そこで本研究ではろ過を必要とせずに核酸の抽出ができるCOPMAN法に着目し、検出感度向上を目指した。これは磁気ビーズを用いた凝集およびタンパク質分解により廃液中の核酸を検出する方法で、下水中からウイルスのRNAを検出する抽出法としての実績があり、夾雑物の多い水からDNAとRNAを同時抽出できる可能性がある。本研究では、カワバタモロコを対象とし、水と表層堆積物が混合された泥水サンプルからCOPMAN法を用いた環境核酸を抽出および検出を試みた。その結果、対象種由来の核酸の検出に成功した一方で、DNAのみを含むサンプルと、cDNAが加わったサンプルの検出量は変わらなかった。今後はRNAとDNAの同時検出を目標にプロトコルの改善を目指す。

In environmental nucleic acid (eNA) analysis, when filtering highly turbid water insufficient amount of water can be filtered due to clogging, resulting in a decrease in detection sensitivity. In this study, we focused on the COPMAN method, which can extract nucleic acids without filtration, and aimed to improve detection sensitivity. The COPMAN method is a proven extraction method for viral RNA in sewage, and has the potential to simultaneously extract DNA and RNA from highly turbid water. In this study, we tried to extract and detect eNA using the COPMAN method from muddy water samples containing a mixture of water and surface sediment, targeting a cyprinidae fish, *Hemigrammocyppris rasborella*. As a result, environmental DNA of the target species was detected, but the detection of RNA was not be confirmed. In the future, we plan to improve the protocol with the goal of detecting RNA and DNA simultaneously.

【P-13】

環境DNA分析における効果的なデコンタミネーション手法の比較

Comparison of effective decontamination methods in environmental DNA analysis

*白子 智康¹、中村 匡聡¹

*Tomoyasu Shirako¹, Masatoshi Nakamura¹

1. いであ株式会社

1. IDEA Consultants, Inc.

環境DNA分析は非常に高感度にDNAを検出する手法であるため、コンタミネーションの影響を非常に強く受ける。そのため、環境DNA分析の際には、コンタミネーションを最小限に抑えることが必要不可欠である。特にラボ内では、採水時に比べて高濃度のDNAを扱うことになるため、コンタミネーションに対してより注意深く対策を実施する必要がある。以上のことから、環境DNA分析を実施する際には、様々な手法を用いて、実験の前後にラボの器具や実験機をデコンタミネーションするのが一般的である。

そこで、ラボ内のより効果的なデコンタミネーションを目指し、塩素系漂白剤を用いたふき取りや、UV照射、オゾンガス等の各手法について、その効果を比較した。

Because environmental DNA analysis is a very sensitive method of DNA detection, it is very sensitive to contamination. It is therefore essential to minimise contamination during environmental DNA analysis. Particularly in the laboratory, where DNA is handled in higher concentrations than during water sampling, more careful measures must be taken against contamination. Therefore, it is common practice in environmental DNA analysis to decontaminate laboratory instruments and benches before and after the experiment using various techniques.

In this presentation, we compared the effectiveness of each method, such as wiping with chlorine bleach, UV irradiation and ozone gas, for more effective decontamination in the laboratory.

【P-14】

オオカナダモ環境DNAの粒径分布と群落面積との関係の基礎的検討

Basic examination of the relationships between the particle size distribution of *Egeria densa* environmental DNA and the coverage area

*宮平 秀明¹、宮園 誠二¹、赤松 良久¹

*Hideaki Miyahira¹, Seiji Miyazono¹, Yoshihisa Akamatsu¹

1. 山口大学大学院

1. Yamaguchi University

環境DNAは沈水植物の生物量モニタリングに適用されつつあるが、環境DNAが反映する沈水植物の粒径サイズ等の基礎的な情報は明らかとなっていない。そこで本研究では、河川における外来沈水植物オオカナダモの環境DNAの粒径サイズを推定するとともに、採水地点上流の群落面積を最も反映しているオオカナダモ環境DNAの粒径サイズを明らかにすることを目的とした。一級河川江の川の土師ダム下流（合計13地点）を対象に分画実験によりオオカナダモ環境DNAの粒径分布を推定した。さらに、各粒径の環境DNA濃度と採水地点上流のオオカナダモ群落面積との関係について検討した。結果として、全地点でオオカナダモの粒径サイズが2.7~10 μm の範囲で環境DNA濃度が相対的に高い傾向がみられた。また、同粒径サイズの環境DNA濃度と上流群落面積との間に最も強い正の相関がみられ、上流群落面積を最も反映していることが明らかとなった。

Environmental DNA (eDNA) has been increasingly used as a monitoring method for submerged aquatic plants; however, it is not clear about the basic information (e.g., the aquatic plant particle size that reflects the eDNA). Here, this study aimed to elucidate the particle size of eDNA that most reflects the coverage area of the invasive submerged aquatic plant, *Egeria densa* in a riverine system. In this research, the eDNA water samplings were conducted at in the downstream section of the Haji Dam in the Gonokawa River, where *E. densa* overgrowth has been reported. We examined the particle size distribution of *E. densa* eDNA and examined the relationships between the eDNA concentrations of each particle size and the upstream coverage area of *E. densa*. As a result, it was observed that the eDNA concentrations were relatively high in the particle size range of 2.7–10 μm at all sites. Moreover, it was found that the eDNA concentrations in the particle size range of 2.7–10 μm best reflected the upstream coverage area in our study system.

【P-15】

簡易eDNAろ過抽出法のメタバーコーディング解析およびオンサイト分析への適用

Application of a simple eDNA filtration extraction method to metabarcoding and on-site analyses

*鈴木 良地¹、河村 邦生¹、中村 匡聡²、伊藤 健二³

*Ryoji Suzuki¹, Kunio Kawamura¹, Masatoshi Nakamura², Kenji Ito³

1. 愛知県農業総合試験場、2. いであ株式会社、3. 農研機構農業環境研究部門

1. Aichi agricultural research center, 2. IDEA Consultants, 3. Institute for Agro-Environmental Science, NARO

eDNAをガラス繊維に吸着させて回収・抽出するSGF法は、従来の吸引ろ過法よりも簡易かつ低コストである。SGF-eDNAは特異的検出に適用できるが（第4回大会）、メタバーコーディング解析への適用性は不明であった。河川水および池水から抽出したSGF-eDNAを、魚類メタバーコーディング解析（Mifsh法）したところ、PCR増幅阻害は確認されず、検出魚種数は従来法とほぼ同等だった。さらに、等温増幅および目視判定が可能なLAMP法と組み合わせ、カダヤシ*Gambusia affinis*を対象としてSGF-LAMPによるオンサイト分析を試みた。反応液を事前に準備し、鋳型のアプライに歯間ブラシを利用するなど、現場でのピペット操作を極力省略し、DNA抽出およびLAMP反応は採水現場または移動中の車内で行った。5河川のカダヤシの検出結果はラボでのqPCR/LAMPによる定性解析と概ね一致した。

The suspended glass fiber method (SGF method), in which eDNA is collected and extracted by adsorption onto glass fibers, is simpler and less expensive than the conventional suction filtration method using glass fiber filter paper. eDNA extracted using the SGF method is applicable to specific detection (4th Meeting), but its applicability to metabarcoding analysis was unknown. When eDNA was extracted from river and pond water using the SGF method and subjected to fish metabarcoding analysis (Mifsh method), no inhibition of PCR amplification was observed, and the number of fish species detected was similar to that using the conventional method. Furthermore, on-site analysis using SGF-LAMP was attempted for Mosquitofish *Gambusia affinis* in combination with the LAMP method, which allows isothermal amplification and visual determination. Pipette manipulation was minimized by preparing the reaction solution in advance and using an interdental brush for template applying. Only a tabletop centrifuge and a small incubator were used, and DNA extraction and LAMP reactions were performed at the water sampling site or in a moving vehicle. The results of *G. affinis* detection in the five rivers were generally consistent with the qualitative analysis using qPCR/LAMP in the laboratory.

【P-16】

クビアカツヤカミキリのフラス分析による早期発見と早期防除の取組み

Early detection and early prevention for *Aromia bungii* used by environmental DNA analysis of frass.

*牧野 健一¹、横田 雅弘¹、藤井 俊樹¹、阿部 由克¹、前田 傑¹、飯塚 徹谷¹、金谷 智¹、日野 淳郎¹

*Kenichi Makino¹, Masahiro Yokota¹, Toshiki Fujii¹, Yoshikatsu Abe¹, Takashi Maeda¹, Tetsuya Iiduka¹, Satoshi Kanatani¹, Atsurou Hino¹

1. 公益財団法人ひょうご環境創造協会

1. Hyogo Environmental Advancement Association

近年、特定外来生物であるクビアカツヤカミキリが、サクラやウメ、スモモなどバラ科樹木に寄生し枯らせる被害が発生している。兵庫県外来生物対策協議会では、樹木医会や行政と連携し、カミキリムシが幼虫時に排出するフラスについて、環境DNA分析の手法を適用してクビアカツヤカミキリの寄生の有無を判定している。フラスを用いた分析は、迅速な被害木の特定と、薬剤防除等の早期対策を可能にし、被害木への成虫脱出防止ネットの設置との組み合わせによって、被害木の発生抑止に成果を上げている。

In recent years, one of an invasive alien species *Aromia bungii* is causing damage by parasitizing and withering trees of the rose family such as cherry, plum, and apricot. The Hyogo Prefecture Invasive Species Control Council, has collaborate with arborists and local authorities, uses environmental DNA analysis to determine the presence or absence of infestations by analyze frass excreted the larvae. This analysis using frass, can rapid identification of affects trees and facilitates early measures such as pesticide control. When combined with the installation of nets to prevent mature insect from escaping, this approach has yielded positive results in suppressing the occurrence of damaged trees.

【P-17】

モバイルPCRによる希少生物種の環境DNA検出法の検討

Investigating a method for detecting environmental DNA from endangered species by a mobile PCR platform

*鈴木 俊也¹、石黒 直哉¹、戸井田 和希

*Toshiya Suzuki¹, naoya ishiguro¹, kazuki Toida

1. 城西大学

1. Josai university

環境教育に環境DNA分析を活用するためには、従来の方法では操作手順が多く煩雑である。また、現場で分析結果を見ることができれば授業時間内に完結することも可能になる。そこで、モバイル型PCR装置での簡便かつ迅速な分析手法の開発を目指している。まず、アベサンショウウオの個体を用いて、最適な簡易抽出法と使用する酵素の検討を行った。その結果、カネカ簡易DNA抽出キットver.2とKAPA3G Plant PCR Kitが優れていることがわかった。しかし、これらを用いて環境水で試みたところ、検出されなかった。そこで、水中で過ごすトミヨの生息池・河川から現場ろ過された環境水サンプルを用いて、qPCRを行った。また、産卵時期を迎えたアベサンショウウオの環境水を採水し、現場ろ過・実験室ろ過サンプルを用いてqPCRを行った。今回は以上の結果について報告する。

The usage of environmental DNA (eDNA) in environmental analyses involves a lot of assembly operations that are hindered by conventional methods. We can conclude during class if we can see analysis on-site. In the present study, I aimed to develop a mobile PCR platform especially appropriate for rapid on-site analyses. The platform was tested by using a sample obtained from the Abe salamander (*Hynobius abei*), and by combining different reagents/kits, namely, KANEKA simple DNA Extraction Kit Ver.2 (KANEKA), GenCheck® DNA Extraction Reagent, KAPA3G Plant PCR Kit(KAPA), Hot start TTx (DNA) Kit, and Go-to DNA Polymerase. I concluded that the better combination was KANEKA and KAPA. Sampling was conducted by using on-site filtered water samples from aquatic ecosystems (pond and river) inhabited by Tomiyo (*Pungitius sinensis*). However, DNA in collected water samples was not detected. In the analysis, genus-specific primers and probe for Tomiyo and KAPA reagent kit were used to perform qPCR and detect the DNA of Tomiyo in mobile and bench-top platforms. DNA was detected using the DNeasy Blood & Tissue Kit. All using the inhibitor remover were the non-detection. The qPCR analysis was performed in 1:10, 1:100, and 1:1,000 dilution solutions. DNA was only detected in the pond sample. The qPCR analysis was performed using on-site and laboratory-filtered water samples inhabited by the Abe salamander during the spawning season. The presence of DNA was confirmed in a laboratory-filtered sample.

【P-18】

Mtinsects-16Sプライマー対応の河川用DNAデータベース

「River16S」の開発

-神奈川県で開発したDNAデータベースは果たして全国の河川で使えるのか？-

"River16S", a DNA database for rivers that can be used with Mtinsects-16S primers.

-Can the DNA database developed in Kanagawa Prefecture really be used in rivers nationwide?-

*長谷部 勇太¹

*Yuta Hasebe¹

1. 神奈川県環境科学センター

1. Kanagawa Environmental Research Center

神奈川県では令和2年度から水生昆虫類を中心とした参照用のDNAデータベース(種ごとのDNA配列データベース)の整備を進めてきた。

今回、本県が整備を進めてきたDNAデータベースと公共DNAデータベース(DDBJ)からダウンロードしたDNA配列を統合し、Mtinsects-16Sプライマーに対応した河川用DNAデータベース「River16S」を開発した。

このRiver16Sを用いて神奈川県外の河川で調査を行ったところ、種として判断するための閾値設定を適切にすればカゲロウ目、カワゲラ目、トビケラ目については70%以上のOTUを種同定可能なことが明らかとなった。

ただし、データベースに間違いはつきものであり、そういった間違いを発見し、より良いデータベースとしていくために多くの人に利用してもらいと考えているので、ぜひ皆様モニターとしてご協力いただければ幸いです。

Kanagawa Prefecture has been developing a reference DNA database (DNA sequence database for each species) mainly for aquatic insects since 2020.

This time, the DNA database for rivers "River16S" corresponding to the Mtinsects-16S primer was developed by integrating the DNA database maintained by Kanagawa Prefecture and the DNA sequences downloaded from the Public DNA Database (DDBJ).

Using River16S, we conducted a survey of rivers outside Kanagawa Prefecture and found that more than 70% of OTUs in the Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera orders could be identified to species if the thresholds for determining species were appropriately set.

However, as mistakes are bound to occur in databases, we hope that many people will use the database to identify such mistakes and make it better, and we would appreciate your cooperation as a monitor.

【P-19】

日本淡水産枝角類（付着性/底生性）のDNAバーコーディング

DNA barcoding of freshwater epiphytic/benthic cladocerans in Japan

*牧野 渡¹

*Wataru Makino¹

1. 東北大学

1. Tohoku University

付着性や底生性の淡水枝角類は、イトトンボの幼生など無脊椎動物捕食者の主な餌資源のひとつであり、湿地の生物多様性保全の観点から特に重要である。しかし、付着性や底生性の枝角類は浮遊性のタクサに比べて研究が進んでおらず、その正確な分類学的位置づけが確定していない種も非常に多い。近年になり主にロシアの研究者により分類学的アップデートが進められてきたが、その情報は国内の図鑑図説類に反映されていないことも散見される。このような状況のなか、演者は日本淡水産付着性・底生性枝角類のDNAバーコード（mtCOIなど）の取得に着手しており、その成果を要約する本ポスター発表では、DNAバーコードを考慮して分類を再整理しつつ、eDNAを使ったモニタリングで利用可能な状態に至るまでの道筋を考察する。

Epiphytic/benthic freshwater cladocerans are one of the main food resources of invertebrate predators, including the larvae of damselfly, meaning that they are especially important in terms of wetland biodiversity conservation. However, epiphytic/benthic cladocerans are less studied than planktonic ones, and their precise taxonomic positions are not finalized in most cases. I have begun obtaining the DNA barcode (mainly mtCOI) of Japanese freshwater epiphytic/benthic cladocerans, and this poster presentation will summarize the results by emphasizing the nearly nightmare situation of their taxonomy.

未同定・未培養真菌DNA 配列の実体探索

Exploration of “entity” of unidentified uncultured fungus

*橋本 陽¹、大熊 盛也¹

*Akira Hashimoto¹, Moriya Ohkuma¹

1. 理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室

1. RIKEN BioResource Research Center

葉面、藻類マット、地衣内生菌の菌類多様性評価における直近の懸念事項として、DNA データベース上に既知種よりも未同定・未培養真菌類配列が飽和していることが挙げられる。この状態は真菌類多様性研究のなかで将来的に解決されていくと想定されるが、実体として存在しない配列を過大評価している可能性も考慮すべきである。演者は日本産黒色酵母の多様性探索を進めている中で葉面や藻類マット、地衣体、菌体表面を希釈平板法を用いて内在・表在する黒色酵母を単細胞・胞子分離により純粋培養株を確立し、真菌類の種同定バーコード領域の配列決定を試みた。結果として、複数の未同定配列と合致する系統の探索に成功した。その一方で、これまでの探索で検出されていない新たな新規系統群の存在も明らかにされた。本研究では黒色酵母類の野外・培養形態の特徴付けと、検出が遅れている原因について考察する。

The current problem of saturation of unidentified and uncultured fungal sequences (hereafter referred to as uncultured fungi sp.) in DNA databases, rather than known species, is a recent concern in DNA-based fungal diversity assessment. In particular, studies of algal mats, lichenicolous fungi, and sporocarp-inhabiting fungi have been conducted. This problem is expected to be resolved in the future as fungal diversity research progresses; however, another problem is the possibility of overestimating sequence diversity that do not exist as entities. Therefore, it needs to be re-evaluated the problem that requires active resolution and clarification of entities. In this study, black yeast was isolated from leaf surfaces, algal mats, lichens, and fungal surfaces using the dilution plate method. We compared these strains with unidentified sequences of environmental origin based on sequences in the fungal species identification barcode regions (rDNA ITS-LSU and mtSSU regions). We found strains that matched sequences identified in multiple Uncultured Fungus sp. In other words, we were able to clarify the identity of the “dark taxa” for the first time. However, the existence of a novel phylogenetic group that has not been detected in previous studies was also revealed.

【P-21】

環境DNAに基づくハプロタイプ分析のための新たなアンプリコンフィルタリング手法

A novel amplicon filtering approach for environmental DNA-based haplotype analysis

*小関 右介¹、武島 弘彦^{3,2}、米田 龍仁³、片柳 海斗³、伊藤 玄⁴、山中 裕樹⁴

*Yusuke Koseki¹, Hirohiko Takeshima^{3,2}, Ryuji Yoneda³, Kaito Katayanagi³, Gen Ito⁴, Hiroki Yamanaka⁴

1. 大妻女子大学、2. 福井県立大学、3. 東海大学、4. 龍谷大学

1. Otsuma Women's University, 2. Fukui Prefectural University, 3. Tokai University, 4. Ryukoku University

環境DNAメタバーコーディングは従来の生物標本に基づくハプロタイプ分析を代替・補完する方法として期待されるが、現在利用できる配列フィルタリングやデノイズングを行ってもなお、得られるアンプリコンデータに偽の配列が含まれることが実用上の課題となっている。こうした誤配列を効果的に除去するため、新たな配列フィルタリング手法を開発した。環境DNAメタバーコーディング過程のシミュレーションを用いて真のハプロタイプ配列およびそれらのPCRエラーのリード数分布を詳しく分析し、その理解の上に真の配列と誤配列のリード数分布を混合ガウスモデルを用いて推定し、統計的に妥当なエラーフィルタリングのリード数閾値を決定するという手法を考案した。本発表では、この手法の詳細を示すとともに、真のハプロタイプが完全または部分的にわかっている一種系環境DNAメタバーコーディングデータを用いた性能分析における成績について報告する。

Environmental DNA (eDNA) metabarcoding is a promising alternative to the traditional biological sample-based haplotype analysis, but its practical application remains a challenge due to the spurious sequences included in the amplicon data, even after the application of currently available sequence filtering and/or denoising methods. To effectively eliminate such erroneous sequences, we developed a novel sequence filtering approach. A simulation of eDNA metabarcoding processes was performed to gain a detailed understanding of read size distributions of true haplotype sequences and their PCR errors, based on which the approach of estimating the read size distributions of true and error sequences using Gaussian mixture models and determining a statistically valid read size threshold for error filtering was devised. We present the details of this approach, as well as its good performance results in the benchmarking analyses using single-species eDNA metabarcoding datasets of which true haplotypes are completely or partially known.

【P-22】

環境DNAと階層ベイズモデルを用いた 河川魚類分布推定の高精度化

Improving the river fish distribution estimation using eDNA and hierarchical Bayesian modelling

*伊藤 青葉¹、香川 裕之²、成田 勝²、近藤 倫生¹

*Aoba ITO¹, Hiroyuki KAGAWA², Masaru NARITA², Michio KONDOH¹

1. 東北大学大学院、2. 東北緑化環境保全株式会社

1. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2. Tohoku Ryokka Kankyohozen Co., Ltd.

人間活動による生態系の劣化が懸念される中、生物調査や観測の重要性はますます高まっている。近年、環境DNAと呼ばれる、生物が生息環境に残したDNAの痕跡から、生態系の種組成や分布を推定する手法が発展してきた。環境DNAから生物の分布を正しく推定するには、「環境DNAの動態」を考慮する事が重要である。本研究では、河川環境における「環境DNAの動態」を明示的に考慮した階層ベイズモデルを構築することで、環境DNA調査の結果から生物の分布を精度よく推定する手法を提案する。構築したモデルは、流下モデルと種分布モデルの2種類のモデルからなる。このモデルを多種多地点の環境DNAデータに適用することで、得られた結果とモデルの有効性を検討した。その結果、流下を考慮した適切な物理モデルを考慮することで、多地点多種の環境DNAデータから生物の分布推定が可能であると結論づけた。

In the face of concerns over ecosystem degradation caused by human activities, the importance of biological surveys and observations is increasing. Traditional methods involved visual or capture-based surveys, which often required substantial time and personnel. However, recent developments in the field of environmental DNA (eDNA) have allowed for the estimation of species composition and distribution within ecosystems based on the traces of DNA left by organisms in their habitats. Recognizing the importance of considering the "dynamics of eDNA" for accurate species distribution estimation from eDNA, this study proposes the development and presentation of a hierarchical Bayesian model explicitly accounting for the "dynamics of eDNA" in river environments. The model constructed in this study consist of two types of models: a flowmodel, which represents the dynamics of eDNA in river environments, and a species distribution model, which uses environmental information to estimate the distribution of organisms. By applying this model to eDNA data collected from multiple locations and species, the study successfully estimated the distribution of 40-50 fish species across three rivers. The results suggest that by considering an appropriate physical model that accounts for downstream processes, accurate species distribution estimation can be achieved from diverse eDNA data collected from various locations and species.

【P-23】

occumb : 多種サイト占有モデルを用いた環境DNAメタバーコーディングデータ解析のためのRパッケージ

occumb: an R package for analyzing eDNA metabarcoding data via multispecies site occupancy modeling

*深谷 肇¹

*Keiichi Fukaya¹

1. 国立環境研究所

1. National Institute for Environmental Science

環境DNAメタバーコーディングで得られる配列リード計数はしばしば大きく変動するため、種の分布や多様性を精緻に評価するためにはその変動要因を理解することが重要である。近年、環境DNAメタバーコーディングの多段階のワークフローで生じる偽陰性を考慮して種の分布（サイト占有）を評価する方法として、多種サイト占有モデルの拡張が提案された。本講演では、このモデルを用いたデータ解析を簡便に行えるRパッケージであるoccumbのリリースバージョンを紹介する。occumbではRのformula構文を用いて種の占有確率や検出可能性を説明する共変量を導入でき、モデルパラメータのベイズ推測を行うことができる。また、種の検出可能性を考慮した最適な調査デザインの特定制が可能である。occumbを用いた統計解析の手順を説明する。

Since sequence read counts obtained from eDNA metabarcoding are often highly variable, it is essential to understand the sources of variation to make accurate assessments of species distribution and diversity. Recently, an extension of the multispecies site occupancy model was proposed to assess species distribution (i.e., site occupancy) while accounting for false negatives that occur in the multi-step workflow of eDNA metabarcoding. This presentation will introduce a released version of occumb, an R package that allows easy data analysis using this class of models. occumb allows users to easily incorporate covariates for species occupancy probability and detectability using R's formula syntax and perform Bayesian inference on model parameters. It also provides functionalities for identifying the survey design for optimum species detection. The procedure for statistical analysis using occumb will be described.

【P-24】

環境DNA分析と生態モデルによる気候変動下における生物の時空間分布予測

Prediction of spatio-temporal distribution of organisms under climate change using environmental DNA analysis and ecological modeling

* 鄔 倩倩¹、周 金鑫²、河本 達也¹、石川 俊之³、後藤 直成⁴、坂田 雅之⁵、北澤 大輔²、源 利文¹

* Qianqian Wu¹, Jinxing Zhou², Tatsuya Komoto¹, Toshiyuki Ishikawa³, Naoshige Goto⁴, Masayuki K Sakata⁵, Daisuke Kitazawa², Toshifumi Minamoto¹

1. 神大、2. 東大生研、3. 滋賀大、4. 滋賀県立大、5. 北大

1. Kobe Univ, 2. IIS, the Univ. of Tokyo, 3. Shiga Univ, 4. The Univ. of Shiga Pref, 5. Hokkaido Univ

近年eDNAと数理モデルを組み合わせた生物分布を推定する研究例が増えてきたが、現在と未来の分布を同時に調べる研究は少ない。本研究では、気候変動下で琵琶湖のスジエビとイサザの現在と未来のeDNA濃度の分布変化を調査、予測した。まず、全循環の有無別に、湖底での採水と環境測定を行った。次に、2種のeDNA濃度と環境変数との関係を調べた。スジエビの分布は水深や溶存酸素などに、イサザの分布は水温や溶存酸素などによって説明された。この結果を現在と未来の環境データに適用し、時空間分布をシミュレートした。その結果、スジエビは将来的には激減し絶滅の危機に瀕すると予測されたのに対し、イサザは、将来の分布が全循環時に拡大する可能性が予測された。この結果から、スジエビのような、気候変動に脆弱な種には注意が必要であることが示唆された。また、本研究の解析手法は保全学分野への応用が期待できる。

Environmental DNA (eDNA) and mathematical approaches are being increasingly employed in species distribution estimates. However, few research have simultaneously examined both current and future distributions. We examined the eDNA concentration distributions for common shrimp and isaza fish in Lake Biwa and predicted changes in those distributions under climate change. Water samples were collected from the lake bottom during both full and partial circulation. The analysis of relationship between environmental variables and species eDNA concentrations revealed that water depth and dissolved oxygen (DO) concentrations most exert profound influence on shrimp, while water temperature and DO concentrations primarily impact isaza. By applying the relationship to the present and future environmental data, estimations showed that the shrimp is likely to significantly decrease and even go extinct in the future. Conversely, the isaza may increase its range under full water circulation. These findings stress the importance of close monitoring of species that are vulnerable to climate change. Additionally, the analytical method here also shows potential for conservation application.

【P-25】

環境DNA定量メタバーコーディング法を用いた流域網羅的な河川魚類分布域の推定

Basin-wide estimation of river fish distribution using quantitative environmental DNA metabarcoding

*滝山 路人¹、赤松 良久¹、宮園 誠二¹、福丸 大智¹、中尾 遼平¹

*Michihito Takiyama¹, Yoshihisa Akamatsu¹, Seiji Miyazono¹, Daichi Fukumaru¹, Ryohei Nakao¹

1. 山口大学大学院創成科学研究科

1. Graduate School of Science and Technology for Innovation, Yamaguchi University

本研究では中国地方一級水系である佐波川、高津川を対象とし、魚種を網羅的かつ定量的に評価可能な環境DNA定量メタバーコーディング法を用いて、環境DNA濃度と環境要因から魚類の分布域の推定を行った。調査は2022年5月、6月に実施した。まず、環境DNA分析により定量した環境DNA濃度と環境要因との関係をGLMおよび深層学習で解析し、モデル化した。その後、実測値と予測値の精度比較を行い、相対的に予測精度の高かった深層学習で作成したモデルを用いて、環境DNA濃度と環境要因との関係から各魚種の流域網羅的な分布域を推定した。その結果、水産有用種であるアユ・ニホンウナギの環境DNA濃度に河川水温が最も影響を及ぼすことが示唆された。さらに、深層学習を用いた各魚種の分布域の推定では実測値との相関係数が両種において $R>0.6$ であり、流域網羅的に各魚種の分布域を推定可能であることが明らかとなった。

In this study, the basin-wide distributions of riverine fishes were estimated from environmental DNA (eDNA) concentrations and environmental factors using quantitative eDNA metabarcoding method that enables comprehensive and quantitative evaluation of fish species abundances in the Saba and Takatsu rivers, which are the first-class river systems in the Chugoku Region in Japan. The eDNA surveys were conducted in May and June 2022. First, the relationships between the fish eDNA concentrations and environmental factors were analyzed and modeled using Generalized Linear Model (GLM) and deep learning. Then, the differences in accuracy of the measured and predicted values between GLM and deep learning were examined. The results suggest that river water temperature could have the greatest influence on the eDNA concentrations of Ayu and Japanese Eel, which are useful fisheries species. Furthermore, the correlation coefficients between the measured values and prediction values on deep learning were $R>0.6$ for both species, indicating that it is possible to estimate the distribution area of each fish species in the watersheds.

【P-26】

環境DNA定量メタバーコーディングを用いた流域網羅的な河川環境健全度評価

Evaluation of basin-wide river biotic integrity using quantitative environmental DNA metabarcoding

*宮園 誠二¹、滝山 路人¹、宮平 秀明¹、中尾 遼平¹、赤松 良久¹

*Seiji Miyazono¹, Michihito Takiyama¹, Hideaki Miyahira¹, Ryohei Nakao¹, Yoshihisa Akamatsu¹

1. 山口大学

1. Yamaguchi University

本研究は、環境DNA定量メタバーコーディングによる魚類の種数および環境DNA濃度を基に河川環境健全度指標を作成し、流域特性の異なる中国地方の一級水系（高津川・高梁川）の河川環境健全度を評価することを目的とした。結果として、種数を基にした環境健全度指標を用いた水系内の比較においては、河川規模の大きい下流域で指標値が相対的に高く、同指標を用いた水系間の比較では、集水域面積の大きい高梁川のほうが、高津川よりも指標値が顕著に高い傾向にあり、河川環境健全度評価が生息場のサイズに影響されることが示唆された。一方、環境DNA濃度を基にした環境健全度指標については、河川上流域でも指標値が高い地点がみられたことや高津川の方が高梁川よりも指標値が高い地点が数多くみられたことから、量的な情報を含んだ環境健全度指標を用いることによって種数のみでは把握できなかった魚類の生息場利用を明らかにできることが示された。

In this study, we developed the indexes of river biotic integrity based on fish species richness and environmental DNA (eDNA) concentrations using quantitative eDNA metabarcoding. The developed indexes were used to evaluate the biotic integrity of the two first class rivers (Takatsu and Takahashi rivers) in Japan. Our results showed that the biotic integrity scores of the downstream sites with higher habitat size tended to be higher than those of the upstream sites, and the biotic integrity scores of the Takahashi River with higher watershed area were significantly higher than those of the Takatsu River. These results suggest that the biotic integrity evaluation with the species richness-based indexes could be affected by habitat size. In contrast, using the eDNA concentration-based indexes, we could find that several upstream sites had higher biotic integrity scores than the downstream localities, and the Takatsu River included numerous sites with higher biotic integrity scores than the Takahashi River. These results indicated that the eDNA concentrations-based indexes were not strongly affected by habitat size and could be useful to quantitatively evaluate the biotic integrity of riverine habitats.

【P-27】

北海道の落葉樹林におけるバイオエアロゾルの季節変動

Seasonal variation of bioaerosols in a deciduous forest in Hokkaido

*植竹 淳¹

*Jun Uetake¹

1. 北海道大学

1. Hokkaido University

Forest ecosystems serve as vital carbon sinks, harbor biodiversity, and play a pivotal role in global climate regulation. Within the complex structure of forest ecosystems, bioaerosols, which are biological airborne particles such as pollen, fungal spores, bacteria, and viruses, are often overlooked. However, bioaerosols play a key role in spreading their habitat through the air. In order to assess seasonal variations in bioaerosols within the forest, which is crucial for understanding their ecological significance, we collect bioaerosols through air filtration once a week from Apr. to Jul, 2022 in Tomakomai Experimental Forest of Hokkaido University. We amplified three metabarcoding regions, including 16S rRNA, 18S rRNA, and the fungal ITS gene, and sequenced them using the MiSeq. The observed number of Amplicon Sequence Variants (ASVs) was relatively lower than that in other environments such as soil and river water for all three regions. However, there were seasonal variations in all three regions, with higher counts in April and July for 16S rRNA, and in July for 18S rRNA and ITS. When comparing ASV abundance in air with other environments, we observed an overlap between ASVs dominating on the leaf surface and 16S rRNA in the air, indicating that the leaf surface is the largest source of airborne bacteria. Seasonal changes in air temperature, humidity and other environmental variables can influence the composition of bioaerosols. Therefore, we plan to analyze the data using multivariate statistics to extend our dataset to cover the entire year.

【P-28】

空気中の核酸（eNAirs）を用いたフィールドにおける野生動物相解析法の開発

Development of a wildlife population analysis method in the field using airborne nucleic acids (eNAirs)

*増田 和志¹、西堀 正英¹、安江 博²

*Kazushi Masuda¹, Masahide Nishibori¹, Hiroshi Yasue²

1. 広島大学、2. つくば遺伝子研究所（株）

1. Hiroshima University, 2. Tsukuba Gene Technology Laboratories

空気中の環境DNA（eDNAir）は非侵襲的、簡便に利用でき、フィールドでの動物相新規モニタリング手法として有効である。しかし、比較的長期間の存在が想定されるeDNAirで移動する動物の追跡は難しい。そこで、マウスを用いた実験室シミュレーションで、空気中の環境RNA（eRNAir）がeDNAirと同時かつ経時的検出によってより速く分解され、3日後には検出されず、直近の追跡に有効である可能性が示唆された。本研究では、秋田県白神山地においてeNAir（eDNAir/eRNAir）を回収し、動物種の網羅的検出とその追跡を行った。その結果、eNAir共にヒトが95%以上であった。続いてeDNAirではサル、ネズミが検出され、eRNAirではほぼイノシシのみであった。一方鳥類ではeNAirともにタンチョウとカワウが大部分を占めた。以上から、eRNAirが直近の追跡に活用できる可能性が示唆された。

Environmental DNA in the air (eDNAir) is an effective, non-invasive, and convenient method for monitoring wildlife in the field. However, tracking animals that move through eDNAir, which is expected to persist for relatively long periods, has proven challenging. To address this issue, laboratory simulations using mice were conducted, suggesting that environmental RNA in the air (eRNAir) may degrade more rapidly and be undetectable after three days, making it potentially effective for recent tracking when detected simultaneously with eDNAir. In this study, eNAir (eDNAir/eRNAir) was collected in the Shirakami Mountains of Akita Prefecture, Japan, to comprehensively detect animal species and track their presence. The results indicated that eNAir primarily contained human DNA, accounting for over 95% of the samples. In the case of eDNAir, monkeys and rats were detected, while eRNAir mostly contained wild boar DNA. Among birds, both eNAir and eRNAir were dominated by cranes and cormorants. Overall, these findings suggest the potential utility of eRNAir for recent tracking. This research demonstrates the effectiveness of eDNAir and eRNAir in monitoring wildlife in the field, with eRNAir showing promise for more immediate tracking applications due to its rapid degradation, offering valuable insights into environmental conservation efforts.

【P-29】

樹冠通過雨を用いた脊椎動物の検出

Detecting vertebrates from rain fall through the canopy

*小林 聡¹、鈴木 準平¹、中野 大助¹

*Soh Kobayashi¹, Junpei Suzuki¹, Daisuke Nakano¹

1. 一般財団法人 電力中央研究所

1. Central Research Institute of Electric Power Industry

温帯林における樹冠付近の生物相については調査が難しい事などから、これまで知見がほとんどない。したがって、樹上で生活する脊椎動物は、分布や生息数など実態を把握することが難しい。我々は昆虫類について樹冠通過雨を用いた検出系を検討していたが、今回は哺乳類や鳥類、爬虫類について解析した。雨水からはコウモリ類の他、ハクビシンやノウサギ、カラス、エナガなどが検出された。今回は地上においたローで雨水を拾い受けたため、樹上生物種以外の地上種のDNAも含んでいた。なお、本研究は緑と水の森林ファンドの助成を受けて実施した。

Little has been known about the biota near the canopy in temperate forests due to the difficulty of surveys. Therefore, it is difficult to understand the actual status of vertebrates living in trees, including their distribution and abundance. We have studied detection systems using rainfall passing through the canopy for insects, but this time we analysed mammals, birds and reptiles. In addition to bats, civets, hares, crows and long-tailed tit were detected from rainwater. In this case, the rainwater was picked up by a rota placed on the ground, so it also contained DNA from terrestrial species other than arboreal species. The study was funded by the Green and Water Forest Fund.

【P-30】

環境DNA分析による外来淡水魚の分布拡大経路推定

Use of environmental DNA as a tool for estimating the dispersal of exotic freshwater fish species

*脇村 圭¹、米倉 竜次²、山中 裕樹³、内井 喜美子¹

*Kei Wakimura¹, Ryuji Yonekura², Hiroki Yamanaka³, Kimiko Uchii¹

1. 大阪大谷大学、2. 岐阜県水産研究所、3. 龍谷大学

1. Osaka Ohtani Univ., 2. Gifu Prefectural Research Institute for Fisheries and Aquatic Environments, 3. Ryukoku Univ.

人間活動のグローバル化に伴い、外来生物の導入は増加の一途をたどっている。生物学的侵入が在来生物や生態系に与える影響を最小化するためには、その分布拡大経路を推定し、今後の分布拡大の予測や、当該外来生物の供給源の推測を行うことが重要である。本研究では、特定外来生物ブルーギル*Lepomis macrochirus*を対象に、超並列シーケンシングを用いた環境DNAハプロタイピング手法を開発した。そして、関西地方を中心とした広域的調査を実施し、ブルーギル地域個体群におけるハプロタイプ分布に基づく分布拡大経路の推定を行った。環境DNAを用いた本調査法は、広域調査を展開しやすく、また個体群内のハプロタイプを網羅的に検出できることから、外来生物の分布拡大対策において有力な手法となると期待される。

Biological invasions are one of the major threats to biodiversity in freshwater ecosystems. Identifying the origins and spread of introduced species is crucial for managing them as well as preserving native species. We developed an eDNA-based haplotyping approach for an exotic fish, the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*), in Japan using high-throughput sequencing. Using the developed approach, we performed extensive field surveys mainly in the Kansai region to investigate the distribution of bluegill haplotypes. The results allowed us to estimate the fish' s dispersal process, suggesting the potential use of eDNA in alien species management. We believe that our eDNA-based approach, which can easily be applied to wide-range surveys of exotic species, serves as an effective tool for managing biological invasions.

【P-31】

環境DNA比較系統地理：水を汲んで明らかになったヨシノボリ種間における地理的分化パターンの違い

Environmental DNA comparative phylogeography: a successful case of the *Rhinogobius* species complex

*辻 冴月¹、国松 翔太¹、渡辺 勝敏¹

*Satsuki Tsuji¹, Shota Kunimatsu¹, katsutoshi Watanabe¹

1. 京都大学

1. Kyoto Univ.

Environmental DNA analysis has recently been increasingly applied to the assessment of genetic diversity. Most recently, it has shown its usefulness as a new tool to reveal phylogeographic structure with minimal time and effort. To further extend eDNA application in phylogeographic studies, we challenged a comparative phylogeography analysis, simultaneously assessing and comparing the phylogeographic structures of multiple species. We targeted 11 species of *Rhinogobius* gobies, excluding those endemic to the Ryukyu Islands. We developed a *Rhinogobius*-specific primer set for the mtDNA cytochrome *b* region and simultaneously amplified their eDNA from a total of 447 water samples collected throughout Japan. After high-throughput sequencing and denoising, we assigned each sequence to a species based on reliable reference sequences. Following data screening to eliminate false positives for each species, phylogenetic analysis was performed using all sequence data obtained from 11 *Rhinogobius* species. Consequently, we successfully reconstructed a phylogenetic tree and revealed the distribution patterns of the intraspecific lineages for each species. A landlocked species, *R. flumineus*, was subdivided into nine reported and at least four unreported lineages, each showing geographic cohesion. In contrast, the amphidromous species showed relatively coarse phylogeographic structure consisting of one to six lineages. Differences in the number of lineages and distribution patterns among amphidromous species are likely attributable to ocean currents and the differences in the dispersal abilities of larvae. Despite the limitations of using only mtDNA (e.g., possible nuclear-mitochondrial discrepancies), our study demonstrates that eDNA has great potential for comparative phylogeographic studies.

【P-32】

Species-Genetic Diversity Correlations (SGDCs) and metaphylogeographic analysis of aquatic insects based on bulk community and eDNA metabarcoding

*Dan Joseph Cordova Logronio^{1,2}, Ming-Chih Chiu³, Arnelyn Larano^{1,2}, Levente-Péter Kolcsár^{1,2},
Kozo Watanabe^{1,2}

1. Center for Marine Environmental Studies (CMES), Ehime University, Matsuyama, Ehime, Japan, 2. Graduate School of Science and Engineering, Faculty of Engineering, Ehime University, Matsuyama, Ehime, Japan, 3. Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan

Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (mtDNA CO1) haplotypes from bulk community and eDNA metabarcoding datasets can provide enormous amount of intraspecific variation. When combined with community diversity data, simultaneous assessment of SGDC and phylogeography becomes possible across multiple species of aquatic insects. Our bioinformatics workflow effectively filters out artifacts, PCR and sequencing errors, and nuclear mitochondrial pseudogenes (nuMTs), retaining only authentic haplotypes. Initial analysis was performed using species from bulk samples namely, Ephemeroptera (*Epeorus latifolium*, *Afronurus yoshidae*, *Ephemera japonica*, *Potamanthus formosus*), Diptera (*Antocha bifida*, *Conchapelopia togamaculosa*), Trichoptera (*Glossosoma ussuricum*), Plecoptera (*Kamimuria tibialis*), and Odonata (*Davidius fujiama*). Metaphylogeographic analysis showed that some species of insects had unique phylogeographic patterns which may be attributed to insect's behavior, habitat preference and gene flow. In terms of α -SGDC only two species from Order Ephemeroptera (*E. latifolium*, *P. formosus*) demonstrated a significantly positive correlation between population gene diversity and community alpha diversity. On the other hand, *C. togamaculosa* and *A. yoshidae* showed a weak negative correlation but were not statistically significant. For β -SGDC, species from Orders Ephemeroptera, Diptera, and Odonata showed a significantly positive correlation between population pairwise genetic distance (FST) and pairwise community beta diversity. However, species from Orders Trichoptera and Plecoptera showed a weak positive correlation and were not statistically significant. These multi-species analysis of phylogeographic patterns and SGDCs will provide a more comprehensive information on aquatic insects' diversity, ecology and evolution which is critical for biodiversity and climate change impact assessment.

【P-33】

環境DNAメタバーコーディングによる対馬の魚類相と遺伝的多様性の把握

Study of fish fauna and genetic diversity in Tsushima by environmental DNA metabarcoding

*倉谷 幸広¹、鵜木（加藤） 陽子¹、清野 聡子¹

*Yukihiro Kuratani¹, Yoko Kato-Unoki¹, Satoquo Seino¹

1. 九州大学

1. Kyushu University

長崎県対馬では海洋保護区の設置が検討されており、その基礎情報の魚類相の知見が必要とされている。本研究では対馬沿岸で2020年3月(6地点)と9月(8地点)の環境DNAメタバーコーディングのデータから出現魚種の把握を試みた。対馬では、標本採集と目視観察からこれまで366種の魚種が報告されている。環境DNAにより100種が検出され、うち78種は既知であった。新たに検出された22種は、ハゼ類やギンポ類が多かった。環境DNAにより、従来法で見落とされてきた底生の小型の魚種の情報が得られた。加えて、種内の遺伝的多様性の知見も得られた。水産有用種のキビナゴ*Spratelloides gracilis*では10種のハプロタイプが検出され、これらの系統関係と地理的分布が明らかになった。総じて環境DNAの海洋生物資源管理の基礎調査での有用性が示された。

In Tsushima Island, Nagasaki Prefecture, designation of a marine protected area has been planned, and fish fauna information is needed to provide basic information for this project. In this study, we attempted to understand the species of fish that appeared in the Tsushima coast based on environmental DNA metabarcoding in March (6 sites) and September (8 sites) of 2020. Tsushima Island has a record of 366 fish species from collecting specimens and conventional visual observations. One hundred species were detected from environmental DNA in this study, 78 species of these were known species. Newly detected 22 species included some *Blenniidae* and *Gobiidae*, enabling the fish information that they had been overlooked by conventional methods. In addition, we also obtained information on the genetic diversity within the species, and 10 haplotypes were detected in fisheries target species Banded blue sprat *Spratelloides gracilis*, and these phylogenetic relationships and geographic distribution were clarified. These results indicate the usefulness of marine living resource management in research methods that use environmental DNA.

【P-34】

ニホンウナギの分布を規定する要因の推定

Estimation of factors regulating the distribution of Japanese eels in rivers

*國政 祐太¹、橋本 渚¹、源 利文¹

*Yuta Kunimasa¹, Nagisa Hashimoto¹, Toshifumi Minamoto¹

1. 神戸大学大学院

1. Kobe university

ニホンウナギは国内の河川に広く分布する回遊性の魚類であるが、近年その個体数は減少しており保全が急務である。ニホンウナギの減少要因のひとつとして、堰などの構造物の設置による環境改変の影響が指摘されるが、各環境要因について、ニホンウナギの分布に及ぼす影響を多河川で比較した研究はほとんどない。そこで本研究では、複数の都道府県に位置する14河川で、環境DNA分析、採水地点から上流300mまでの環境計測を実施した。その結果をもとに、ニホンウナギの環境DNA濃度と各環境要因の関係をGLMMのモデル選択によって評価した。その結果、構造物の設置密度と採水地点近傍の河床勾配を変数として含むモデルがベストモデルとして選択され、両変数は環境DNA濃度に負の影響をもたらした。この結果から、河床勾配の緩やかな流速の小さい環境をニホンウナギが好むこと、構造物の設置頻度が高い河川で遡上が阻害されていることが示唆された。

Japanese eel (*Anguilla japonica*) is a catadromous fish widely distributed in Japan. However, its population has been declining in recent years, and there is an urgent need for its conservation. One of the factors causing the decline of Japanese eel is the impact of environmental modifications due to the construction of structures such as weirs and dams. However, few studies have compared the effects of different environmental factors on the distribution of Japanese eels across multiple rivers. In this study, environmental DNA (eDNA) analysis and environmental measurements (including water quality, sediment quality) were conducted in 14 rivers located in several prefectures in Japan. Based on the results, the relationship between the eDNA concentration of Japanese eels and each environmental factor was investigated by model selection. As a result, a model including the density of structures and the riverbed gradient near the sampling point as variables was selected as the best model, and both variables had a negative effect on the eDNA concentration. These results suggest that Japanese eel prefer an environment with a moderate riverbed gradient and low velocity, and that the upstream migration of Japanese eel is inhibited in rivers where structures are more frequently installed.

【P-35】

Environmental assessment by environmental DNA of aquatic insects in heavy metal impacted streams

*内田 典子¹、岩崎 雄一³、今藤 夏子²、倉西 良一⁴

*Noriko Uchida¹, Yuichi Iwasaki³, Natsuko Kondo², Ryoichi Kuranishi⁴

1. 東北大学、2. 国立環境研究所、3. 産業技術総合研究所、4. 神奈川工科大学

1. Tohoku University, 2. National Institute for Environmental Studies, 3. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 4. Kanagawa Institute of Technology

The metal sensitivity of riverine aquatic insects differs from species and is used to assess the impacts of metals on ecosystems. Although the responsible mining companies are required to monitor the impact of metals in closed mines, because of the large financial burden, they are often unable to reach the ecological assessment and can only make chemical assessments. This study aimed for developing a method to determine the ecological effects of metals using aquatic insect environmental DNA. A total of five sites were surveyed along approximately 1.2 km section of a river downstream of a closed mine in Iwate Prefecture: a site with/without metal effects, a confluence of these sites, and two sites after the confluence. At each site, aquatic insect sampling, environmental DNA sampling, and metal concentration analysis were conducted. Environmental DNA samples were subjected to metabarcoding analysis targeting 142 bp and 313 bp of the COI region of mitochondrial DNA. The results showed that taxonomic diversity was lowest at the metal-impacted site (Cu=99.5ug/L, Cd=4.86 ug/L), and that the family Chironomidae was dominant, as indicated by both the capture-based sampling and environmental DNA. At the two sites after the confluence, taxonomic richness and abundance recovered more downstream in the sampling survey, but no clear recovery was observed in the environmental DNA. Although the discrepancies, environmental DNA clearly showed differences in community structure even at an only 500 m interval in lotic environments, indicating that quite localized communities can be investigated.

【P-36】

ラオスサバナケット州におけるタイ肝吸虫および中間宿主の分布調査

Distribution survey of *Opisthorchis viverrini* and intermediate hosts in Savannakhet Province, Lao PDR

*松尾 莉子¹、木原 菜摘¹、サトウ 恵³、サトウ マルセロ²、Prasayasith Phoyphailin²、Yoonuan Tippayarat⁴、Adisakwattana Poom⁴、Pongvongsa Tiengkham⁵、源 利文¹

*Riko Matsuo¹, Natsumi Kihara¹, Megumi Sato³, Marcello Otake Sato², Phoyphailin Prasayasith², Tippayarat Yoonuan⁴, Poom Adisakwattana⁴, Tiengkham Pongvongsa⁵, Toshifumi Minamoto¹

1. 神戸大学、2. 新潟大学、3. 新潟薬科大学、4. マヒドン大学、5. ラオス国サバナケット保健局

1. Kobe University, 2. Niigata University, 3. Niigata University of Pharmacy and Medical and Life Sciences, 4. Mahidol University, 5. Savannakhet Provincial Health Department, Lao PDR.

タイ肝吸虫 (*Opisthorchis viverrini*)によって引き起こされるタイ肝吸虫症は、東南アジア諸国の風土病であり、感染によって胆管癌のリスクが高まるため、大きな健康問題となっている。しかし、タイ肝吸虫は中間宿主が複数存在する複雑なライフサイクルをもつため、従来の方法で感染リスクを迅速にモニタリングすることは困難である。そこで、そのリスクを評価する手法の開発の第一歩として、環境水から寄生虫と中間宿主のeDNAを検出・定量することを目的に研究を行った。調査はラオス国サバナケット州で実施した。Multi-gene assayを用いたタイ肝吸虫のeDNA検出、定量PCRを用いた第一中間宿主の巻き貝のeDNA検出および定量、qMi-Fish分析を用いた第二中間宿主の魚類のeDNA検出および定量を行った。これらの結果をもとに、タイ肝吸虫およびその中間宿主の分布を規定する要因について議論する。

Opisthorchiasis, caused by *Opisthorchis viverrini*, is a major health problem in Southeast Asian countries because of the increased risk of cholangiocarcinoma associated with infection. However, because *O. viverrini* has a complex life cycle with multiple intermediate hosts, it is difficult to rapidly monitor the risk of infection using conventional methods. Therefore, as a first step in the development of a method to assess the risk, we have developed a method to detect the parasite and its intermediate hosts from environmental water. The study was conducted to detect and quantify the environmental DNA (eDNA) of the parasite and intermediate hosts. The study was conducted in Savannakhet Province, Lao PDR, using a multi-gene assay to detect eDNA of the *O. viverrini*, quantitative PCR to detect and quantify eDNA of the first intermediate host, snail, and quantitative metabarcoding analysis to detect and quantify eDNA of the second intermediate host, fish. DNA detection and quantification were conducted and compared with conventional survey methods. In addition, to estimate the false negative rate in the eDNA survey of *O. viverrini*, we also used a site occupancy model to estimate the false-negative rate in the eDNA survey of the *O. viverrini*. Based on these results, we will estimate the factors of distribution of the *O. viverrini* and its intermediate hosts.

【P-37】

Application of meta-barcoding techniques in analyzing potential food sources and calculating feeding selectivity index (E_i) of a small and medium-sized copepod species (*Sinocalanus tenellus*)

*Hye-Ji Oh¹, Yeon-Ji Chae², Ihn-Sil Kwak³, Kwang-Hyeon Chang¹, Hyunbin Jo⁴

1. Kyung Hee Univ., 2. Korea Environmental Industry&Technology Institute, 3. Chonnam National Univ., 4. Pusan National Univ.

In aquatic ecosystem, the food web structure based on composition and abundance of prey species influences the feeding characteristics of predators, resulting in changes to the structure and function of the entire food web. Identifying the feeding behavior of zooplankton is essential to understanding the flow of matter and energy within food webs, especially since zooplankton are intermediates in aquatic ecosystem food webs, transferring primary production energy to higher trophic levels based on the prey-predator relationship. However, microscopic identification alone can only provide a limited understanding of the zooplankton's potential food pool, as well as the food sources consumed. In this study, potential vs. eaten food sources of *Sinocalanus tenellus*, a copepod species dominant in brackish waters, were analyzed based on phytoplankton operational taxonomic units detected from the habitat's raw water and treated whole bodies of *S. tenellus*. The alpha diversity and dominant/subdominant species of each potential and eaten food source were identified, and they were compared across seasons. At the same time, the feeding selectivity index (E_i) was calculated by identifying overlapping species in the potential vs. eaten food source pool. As a result, it was confirmed that not all surrounding potential food sources are fed on by *S. tenellus*, and that its diet can vary depending on the presence/absence of preferred prey. Metabarcoding is an effective method for identifying potential/eaten food sources of zooplankton at the genus or species level, and if widely applied in the future, it is expected to be useful in characterizing their feeding behavior.

【P-38】

Active versus passive Forest Rewilding: eDNA Metabarcoding with 16S and 18S Reveal Impacts on Soil Biome community structure and ecosystem function in Secondary Tropical Forests

*Coskun Guclu¹, Louise Amy Ashton¹, Matthew Seymour¹, Billy Hau¹, Isis Guibert¹,
Stephan Gale², Mang Lung Cheuk²

1. The University of Hong Kong, 2. Kadoorie Farm and Botanic Garden

Forest soils are central to the maintenance of ecological health, hosting a quarter of all biodiversity on Earth and storing three times as much carbon as is found in the Earth's atmosphere. Forest soil biodiversity and carbon ecosystem services make them essential for the mitigation of climate change and the preservation of biodiversity. The soil biome, and specifically microbial and fungal species, play significant roles in ecosystem service provision, and yet remain poorly characterized in the tropics. The present study characterized the soil biome in regenerating soils in Hong Kong SAR and determined soil biome responses to active versus passive ecological restoration initiatives. Environmental DNA was extracted from soil samples and fragments were amplified with 16S and 18S primers for metabarcoding of microbial and fungal communities, before sequencing with illumina MiSeq. Qiime analytical pathways were applied to characterize soil biome species into Actual Sequence Variants (ASVs). Analysis of Variance and Non-Metric Multidimensional Scaling were applied to determine differentiation of biome microbial and fungal communities between forest types and stand age groups.

【P-39】

高校生を対象とした環境DNA教育の実施とその効果の検証

Implementation of environmental DNA education for high school students and verification of its effectiveness

*木谷 亮太¹、佐賀 達矢¹、笠田 実²、清野 未恵子¹、佐藤 真行¹、丑丸 敦史¹、源 利文¹

*Ryota Kitani¹, Tatsuya Saga¹, Minoru Kasada², Mieko Kiyono¹, Masayuki Sato¹,
Atushi Ushimaru¹, Toshifumi Minamoto¹

1. 神戸大学、2. 東北大学

1. Kobe University, 2. Tohoku University

環境DNA分析は、生き物に直接触れることがないため、生き物が苦手な人々を含んだ幅広い集団に対する環境教育ツールとなる可能性がある。本研究では岐阜県の2校に通う高校生を対象として環境DNA分析を用いた環境教育プログラムを実施した。プログラムでは、生徒たちは生態学や環境DNAに関する初歩的な授業を受けた後、高校付近に位置する河川を訪れて採水した。約一か月後、生徒たちは魚類メタバーコーディング解析の結果を受け取り、生物多様性や生態系サービス・ディスサービスについて議論する授業を受けた。プログラムで生徒が答えたアンケート調査の結果は、プログラムによって生徒たちが生物多様性や生態系サービスへの関心を高めたことを示した。興味深いことに、アンケート結果は、生徒たちがプログラムを通してより生き物に触りたいと思うようになったことも示した。本研究は環境DNA分析が環境教育ツールとして応用できることを示唆する。

Environmental DNA (eDNA) analysis does not involve direct contact with organisms. It has the potential to become an environmental education tool for a variety of people, including those who have difficulty with direct contact with living organisms. In this study, we designed an environmental education program using eDNA analysis and conducted it for high school students from two schools in Gifu Prefecture, Japan. In the program, the students received a basic lesson on ecology and eDNA, and then, they visited a river located near the high school and sampled the water. About a month later, they were informed of the results of an eDNA metabarcoding analysis from their samples. They then received another lesson on biodiversity and ecosystem services/dis-services. The results of the questionnaire survey which were answered by students indicated that they increased their interest on biodiversity and ecosystem services through the program. Interestingly, the results also indicated that they became more eager to touch the creatures through the program. It was suggested that eDNA analysis can be used as an environmental education tool.

【P-40】

環境DNA分析を用いた淀川水域におけるオオカナダモの分布調査

Survey of the distribution of the *Egeria densa* in the Yodo River watershed using environmental DNA analysis

*Ogawa Ryota¹、Takayama Satoru¹、Kimu Ryojin¹、Kishima Hiroaki¹

*Ryota Ogawa¹, Satoru Takayama¹, Ryojin Kimu¹, Hiroaki Kishima¹

1. 大阪府立天王寺高等学校

1. Osaka Prefectural Tennoji High School

オオカナダモは、外来の水生植物であり、日本生態学会によって「日本の侵略的外来種ワースト100」に指定されるほど問題となっている。

淀川では旺盛に繁茂しており、下流部ではボタンウキクサなどの浮遊性水草の漂着の要因ともなっている。

このような被害を防ぐためにはオオカナダモの駆除が求められるが、そのためには河川の流域における生息状況を把握する必要がある。しかし、従来の目視調査では時間やコストが多くなるため、広域的な分布調査を行うことは非常に困難だ。そのため、淀川においても、オオカナダモの広域的な調査は行われていない。

そこで私たちは、生物モニタリングの効率的な手法として近年注目されている環境DNA分析を用いて、より効率的に広範囲の分布調査を行った。

本研究は、環境DNA分析を用いて淀川水域におけるオオカナダモの分布を調査するものである。

Egeria densa is an invasive aquatic plant that has become such a problem that it has been designated by the Ecological Society of Japan as one of the "100 Worst Invasive Alien Species in Japan". It is also thriving in the Yodo River and is a factor in the drift of floating aquatic plants such as *Pistia stratiotes* the lower reaches of the river.

In order to prevent such damage, the removal of the *Egeria densa* is required. However, in order to exterminate it, it is necessary to understand its habitat status in river basins. However, it is extremely difficult to conduct a wide-area distribution survey because conventional visual surveys are time-consuming and costly. For this reason, even in the Yodo River, no wide-area survey has been conducted for the *Egeria densa*.

We therefore conducted a more efficient and extensive distribution survey using environmental DNA analysis, which has been attracting attention in recent years as an efficient survey method for biological monitoring.

This study investigates the distribution of the *Egeria densa* in the Yodo River watershed using environmental DNA analysis.

【P-41】

隠岐近海の棘皮動物幼生プランクトンの時空間的分布調査をめざしたメタバーコーディング技術開発

Development of Metabarcoding Technique for Spatiotemporal Distribution Survey of Echinoderm Larvae Plankton in the Oki Coastal area

大原 圭太郎¹、*吉田 真明¹

Keitaro Ohara¹, *Masa-aki Yoshida¹

1. 島根大学

1. Shimane University

近年ガンガゼなど南方系種の北上が報告されている。その分布拡大要因は、プランクトン幼生にあると考えられる。この幼生を野外環境中で検出することができれば、生態系モニタリングに役立つ。本研究では、フィールドにおいて棘皮動物の幼生プランクトンを検出し、季節間、地点間での比較と定量化を目的として環境DNAの分析を行なった。隠岐の加茂漁港を起点として調査地点を5箇所設定し、9月と12月にプランクトンネットと表層採水による野外調査を行なった。棘皮動物のDNAを増幅可能なユニバーサルプライマーを作成し、メタバーコーディングによる網羅的解析を行なった。その結果、季節によってDNAが検出される棘皮動物の種には違いがみられること、プランクトンネットを用いたサンプリングを行うことで野外環境中から棘皮動物の幼生プランクトンのDNAを検出できることが分かった。

In recent years, the northward migration of southern species has been reported one after another in marine organisms. The same trend can be seen in benthic animals with low adult mobility, such as sea urchins. The main cause of the distribution expansion of echinoderms is thought to depend on their planktonic larva. Therefore, if echinoderm larva can be detected in the field environment, it will help to monitor future ecosystem changes. In this study, echinoderm plankton larva were detected in the field, and eDNA was analyzed using metabarcoding and quantitative PCR for comparison among seasons and locations and quantification of larval populations. Five research sites were selected starting from Kamo Fishing Port, where the Oki Marine Biological Station is located, and moving away from the bay in stages. Field surveys were conducted in September and December using plankton nets and surface water sampling. Universal primers capable of amplifying echinoderm DNA were created to detect environmental DNA in the samples, and comprehensive analysis using metabarcoding was conducted. Metabarcoding results showed differences in the echinoderm species for which DNA was detected depending on the season. We also found that the DNA of larval plankton of echinoderms could be detected from the outdoor environment by sampling with plankton nets. Quantitative PCR results showed that larval plankton DNA was detected to the same extent throughout the southern coast of the post-island area, indicating a wider migration range than that we expected.

【P-42】

有明海の海洋生物の生態調査 ～魚市場の水揚げ量と環境DNA調査から環境問題を探る～

Ecological Survey of Marine Life in the Ariake Sea ~Fish Market Landings and Environmental DNA Survey to Explore~ Environmental Issues

*山本 慧真¹、古賀 奏登¹、松本 匡生¹、山本 莉琉¹

*Ema Yamamoto¹, Kanato Koga¹, Masaki Matsumoto¹, Riru Yamamoto¹

1. 福岡県立三池工業高等学校

1. Miike Technical High School

有明海は、国内での生息が有明海だけで確認されている「有明海特産種（23種）」など独特で豊かな生態系を有している。しかし、近年地元では、漁獲量の減少がささやかれている。そこで、有明海の海洋生物の生態調査を行い、その現状を把握したいと考えた。その方法として、大牟田魚市場で季節ごとに水揚げされる魚介類の調査を行った。また、大牟田魚市場の6年間の水揚げ量のデータを分析することで、有明海から水揚げされる魚介類の特徴が見えてきた。さらに、夏季に三池港における魚種についての環境DNA調査を行い、魚市場での調査結果との比較を行った。その結果、環境DNA調査で確認された魚種と魚市場に水揚げされた魚種と一致したのは、36種中4種であった。今回、これらの結果から見えてきた有明海の海洋生物の生態と水産資源としての特徴を報告する。

The Ariake Sea has a unique and rich ecosystem, including "Ariake Sea Specialty Species (23 species)," which have been confirmed to live only in the Ariake Sea in Japan. However, in recent years, there have been whispers in the local community of a decline in fish catches. Therefore, we wanted to conduct an ecological survey of marine organisms in the Ariake Sea to understand their current status. As a method, we conducted a survey of fish and shellfish landed seasonally at the Omuta fish market. In addition, by analyzing six years of landings data from the Omuta fish market, the characteristics of the fish and shellfish landed from the Ariake Sea became apparent. Furthermore, an environmental DNA survey was conducted on fish species at the Port of Miike during the summer season, and the results were compared with those from the fish market. As a result, four of the 36 fish species identified in the environmental DNA survey matched the species landed at the fish market. In this report, we describe the ecology of marine organisms in the Ariake Sea as revealed by these results and their characteristics as fishery resources.

【P-43】

Survey on water quality and biodiversity of Lake Tokiwa

*平野 耀大¹、Yamada Natsuki¹、Fujishige Sota¹、Shintani Harukusa¹、Takase Yukina¹

*Akihiro Hirano¹, Natsuki Yamada¹, Sota Fujishige¹, Harukusa Shintani¹, Yukina Takase¹

1. 山口県立宇部高等学校

1. Yamaguchi Prefecturai Ube Senior High School

Lake Tokiwa in Ube City, Yamaguchi Prefecture, is home to a variety of fish. However, the transparency of the lake water is low, and there is a lot of garbage. Therefore, we conducted a survey at Lake Tokiwa to learn about the current situation of Lake Tokiwa, and we wanted to improve biodiversity and water quality. The first survey method is to comprehensively investigate the fish living in Lake Tokiwa using environmental DNA. The second is to conduct pack tests to investigate the quality of Lake Tokiwa's water from a chemical perspective. As a result of the fish survey, we came to the conclusion that the water quality of Lake Tokiwa may not be very good from the types of fish that could be confirmed. However, the results of the pack test showed that the water quality of Lake Tokiwa was relatively good. As for the future prospects, we will conduct a survey similar to the survey at Lake Tokiwa, which is a lake that is considered to have relatively better water quality than Lake Tokiwa in the vicinity. We would like to compare these results with those of Lake Tokiwa to determine what is necessary to improve the water quality of Lake Tokiwa and improve biodiversity.

【P-44】

河川における在来魚類と外来魚類の分布状況について

Distribution of native and non-native fish species in rivers

*太田井 麻令乃¹、橋本 渚²、國政 祐太²、平山 一槻²、山本 義彦^{3,2}、坂田 雅之⁴、源 利文²

*Marina Otai¹, Nagisa Hashimoto², Yuta Kunimasa², Kazuki Hirayama², Yoshihiko Yamamoto^{3,2}, Masayuki Sakata⁴, Toshifumi Minamoto²

1. 神戸大学国際人間科学部、2. 神戸大学大学院人間発達環境学研究科、3. 大阪府立環境農林水産総合研究所生物多様性センター、4. 北海道大学

1. Kobe Univ. Global Human Sciences, 2. Kobe Univ. Graduate School of Human Development and Environment, 3. Research Institute of Environment Agriculture and Fisheries Osaka Prefecture, 4. Hokkaido Univ.

外来種は、過去或いは現在の自然分布域外に導入された種、亜種、或いはそれ以下の分類群のことで、人間によって意図的、非意図的に導入された生物である。在来種に対して捕食圧を与える種や競争関係にある種の存在が一般的に認知されており、侵入することで種数が激減し、駆除することで在来種の出現が認められるなど、その事実を裏付ける先行研究は数多くなされている。しかし、兵庫県の河川における先行研究では、相反するような結果も得られている。そこで本研究では、国内の一級河川6河川を対象に環境DNAによるメタバーコーディング分析を用いて、魚類における在来種と外来種の分布状況を改めて確認し、これらの種の分布状況を調べることを目的とした。この結果をもとに、外来種と在来種との関係を再検討し、外来種への対応方法について議論することを目指している。

Alien species are species, subspecies, or subgroups of taxa that have been intentionally or unintentionally introduced outside their past or present natural distribution range by humans. It is generally recognized that there are species that exert predation pressure or competition on native species, and there are many previous studies that support this fact, such as the fact that invasion can drastically reduce species diversity, and that eradication can lead to the re-emergence of native species. However, previous studies in rivers in Hyogo Prefecture suggested that have yielded conflicting results. The purpose of this study was to confirm the distribution of native and non-native species in fish and to examine the details of the relationships using environmental DNA metabarcoding analysis. Based on the results, we aim to find out possible relationships other than the direct negative impact of non-native species and to discuss how to deal with non-native species.

【P-45】

環境DNAによる能登地域の河川の魚類相調査

Fish Faunal Survey of Rivers in Noto Area by Environmental DNA

*延田 考聡¹、浅田 遥音¹、金沢 寧々¹、竹澤 翔¹、山口 色葉¹、岡峰 尚歳¹、田中 竣¹

*Takaaki Nobuta¹, Harune Asada¹, Nene Kanazawa¹, Syou Takezawa¹, Iroha Yamaguchi¹,
Hisatoshi Okamine¹, Syun Tanaka¹

1. 石川県立七尾高等学校

1. Nanao High School

石川県の河川における淡水魚類相の調査は、1970年代と1990年代に広く実施されている（石川県，1978，1996）。能登地域においても、複数の水系（羽咋川，米町川，輪島川，町野川）や御祓川，熊木川など複数の河川で調査が行われている。しかしながらこれ以降は大規模な一斉調査は行われていない。淡水魚類の多様性は、河川改修や外来種の導入，気候条件の変化などの影響により変化していることが考えられる。淡水魚類相に対するこれらの影響について検討するためには、現在生息する魚類相や分布状況を広く調査する必要がある。本研究では、石川県立七尾高校のある七尾市の河川を中心に環境DNAを用いた魚類相の調査を行った。採水は50地点で夏期（7～8月）と秋期（10～11月）の2回行った。このサンプルを用いて、①ドジョウとアユを対象とした種特異的解析と②網羅的解析を行い地点間，河川間で比較した。

Surveys of freshwater fish fauna in rivers in Ishikawa Prefecture were widely conducted in the 1970s and 1990s (Ishikawa, 1978, 1996). In the Noto area, surveys were also conducted in several water systems (Hakui River, Konmachi River, Wajima River, Machino River) and several rivers such as the Misogi River and Kumaki River. However, no large-scale, simultaneous surveys have been conducted since then. The diversity of freshwater fish species may be changing due to river improvement, the introduction of alien species, and changes in climatic conditions. In order to examine these effects on freshwater fish fauna, it is necessary to conduct a broad survey of the current fish fauna and distribution. In this study, we investigated the fish fauna using environmental DNA mainly in the rivers of Nanao City, where Ishikawa Prefectural Nanao High School is located. Water samples were collected at 50 sites twice, once in summer (July-August) and once in autumn (October-November). Using these samples, (1) species-specific analysis for loach and ayu, and (2) comprehensive analysis were conducted and compared among sites and rivers.

【P-46】

環境DNAの活用による魚道群における長期的なモニタリングの効率化

Improving the efficiency of long-term monitoring of fishways group using environmental DNA

*枅本 拓¹、原田 泰行¹、木伏 宏俊¹、野中 俊文²、山田 規世³、加藤 秀男³

*Taku Masumoto¹, Yasuyuki Harada¹, Hirotooshi Kibushi¹, Toshifumi Nonaka², Noriyo Yamada³, Hideo Katou³

1. 東日本旅客鉄道株式会社、2. 株式会社建設技術研究所、3. 株式会社CTIリード

1. EAST JAPAN RAILWAY COMPANY, 2. CTI Engineering Co., Ltd., 3. CTI REED Co., Ltd.

J R東日本が所有する宮中取水ダムでは、2012年の“せせらぎ魚道”の新設により魚道群が完成して以来、毎年6月に、1か月間の捕獲調査を継続している。長期的にモニタリングを継続するため、捕獲調査に伴う魚類への負荷と多大な努力量を軽減する代替手法として、当社は環境DNAの活用を検討している。2019年から2022年に実施した捕獲調査と環境DNA分析の結果から、環境DNAを活用した魚道群における基本的な調査手法を確立した。また、ダムの上流と下流の両方で春、夏、秋、冬に環境DNA分析を実施することで、年間の魚類相の変化を把握した。そして、アユの定量PCR分析により、遡上量を推定する手法を体系化した。これらの結果、魚道群における魚類相とその主要魚種による魚道の選好状況を把握することができ、魚類相の状況を長期的に把握するうえで、環境DNAの活用は効率的なモニタリング手法として有効であることが分かった。

At the Miyanaka Intake Dam owned by East Japan Railway Company, a group of fishways was completed in 2012 with the construction of a new Rock-ramp fishway (Seseragi fishway). Since 2012, a month-long capture survey has been conducted every June. To enable long-term monitoring, we are considering the use of environmental DNA as an alternative method to reduce the burden on fish and the large amount of effort associated with capture surveys. Based on the results of capture surveys and environmental DNA analysis conducted from 2019 to 2022, we established a basic research method that utilizes environmental DNA in fishways group. Annual changes in the fish fauna were determined by conducting environmental DNA analysis in spring, summer, autumn, and winter both upstream and downstream of the dam. A method for estimating the amount of Ayu *Plecoglossus altivelis* migrated upstream using quantitative PCR analysis has been organized. As a result, the fish fauna and the preference status of fishways by the main fish species in the fishways group were determined. The use of environmental DNA was effective as an efficient monitoring method in order to understand the status of fish fauna in fishways group over the long term.

【P-47】

福岡県内河川における魚類を対象とした季節別環境DNA分析

Seasonal environmental DNA analyses of fish in rivers in Fukuoka Prefecture, Japan

*平川 周作¹、中島 淳¹

*Shusaku Hirakawa¹, Jun Nakajima¹

1. 福岡県保健環境研究所

1. Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

山系を境に区分されている福岡県内の2地域の河川について、季節別に環境DNA分析を実施し、検出される魚種の傾向を調査した。調査地点は筑前地域にある那珂川の5地点及び筑後地域にある二ッ川の3地点とし、2021年11月、2022年2月、5月、8月に環境DNA分析を実施した。検出魚種の数を経営別に比較すると、全調査地点において2022年5月が最も多かった。また、アユは那珂川の3地点及び二ッ川の全地点で検出されたが、どの地点においても2022年2月の調査では検出されなかった。両側回遊魚であるアユの生活史を反映した結果と考えられ、環境DNA分析を用いた時系列調査により魚類の生活史を反映したデータを取得できる可能性が示唆された。発表では、各調査地点で検出された魚種とその傾向、文献等の調査記録との比較についても紹介する。本研究はJSPS科研費JP19K04682及び22K04390の助成を受けて実施した。

In this study, environmental DNA (eDNA) analyses were conducted for rivers in two areas of Fukuoka Prefecture, which are divided by mountains, by season to investigate trends in fish species detected. The survey sites were five sites on the Nakagawa River in the Chikuzen area and three sites on the Futatsugawa River in the Chikugo area, and eDNA analyses were conducted four times in November 2021, February, May, and August 2022. Comparing the number of fish species detected by season, the highest number of fish species detected at all survey sites was in May 2022. Ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) was detected at three sites in the Nakagawa River and all sites in the Futatsugawa River, but was not detected in the February 2022 survey at any site. This result was considered to reflect the life history of Ayu, which is an amphidromous fish, suggesting the possibility of obtaining data reflecting the life history of fish species through time-series surveys using eDNA analysis. The presentation will also include the frequency of fish species detected at each survey site, their trends and comparison with the survey records. This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Number JP19K04682 and 22K04390.

【P-48】

環境DNA分析を利用した富山県氷見市万尾川水系におけるタナゴ類の生息状況調査～本来いないはずのニッポンバラタナゴの謎を追う～

Research of the habitat status for *Rhodeus ocellatus* subspecies in the Moo River systems in Himi City, Toyama Prefecture with environmental DNA analysis -Pursuing the reason of *Rhodeus ocellatus kurumeus* that shouldn't exist in the first place-

*浅野 陽慶¹、新谷 青空¹、谷脇 鉄平¹、山崎 裕治²

*Haruchika Asano¹, Sora Shintani¹, Teppei Taniwaki¹, Yuji Yamazaki²

1. 学校法人大阪学園大阪高等学校、2. 富山大学

1. Osaka High School, 2. University of Toyama

2020年に富山県氷見市万尾川水系で環境DNA分析を利用した魚類相の網羅的調査を行った結果、万尾川でタイリクバラタナゴやゲンゴロウブナに加えて、従来報告がなかったニッポンバラタナゴのDNAを検出した。

なぜニッポンバラタナゴのDNAが検出されたのか、という謎を解明するために、2021～2023年に万尾川水系と周辺の溜池で環境DNA分析を利用した種特異的調査、並びにタナゴ類の捕獲や移入経路の探索を目的とした現地調査を行った。

種特異的調査の結果、万尾川および溜池でタイリクバラタナゴとニッポンバラタナゴのDNAを検出した。現地調査では、万尾川でタイリクバラタナゴを捕獲すると共に、溜池でゲンゴロウブナの放流を確認した。

以上の結果から、溜池にゲンゴロウブナを放流した際、ニッポンバラタナゴの遺伝子を持つ個体が混在した可能性が考えられる。

In 2020, we conducted a metabarcoding analysis of the fishes with environmental DNA analysis in the Moo River systems in Himi City, Toyama Prefecture.

As a result, DNA from *Rhodeus ocellatus kurumeus*, which had not been previously reported, was detected in the Moo River, in addition to DNA from *Rhodeus ocellatus ocellatus* and *Carassius cuvieri*. In order to find the reason why *Rhodeus ocellatus kurumeus* DNA was detected, we conducted a species-specific analysis with environmental DNA analysis in the Moo River systems and around reservoir from 2021 to 2023.

In addition, we conducted field research to discover the capture and infiltration route of *Rhodeus ocellatus* subspecies.

As a result of a species-specific analysis, *Rhodeus ocellatus ocellatus* and *Rhodeus ocellatus kurumeus* DNA were detected in the Moo River and a reservoir.

During the field research, we captured *Rhodeus ocellatus ocellatus* in the Moo River and confirmed that *Carassius cuvieri* was released into the reservoir.

Based on the above results, it is supposed that individuals with the genes of *Rhodeus ocellatus kurumeus* were mixed when the *Carassius cuvieri* was released into the reservoir.

【P-49】

琵琶湖および瀬田川における特定外来生物チャネルキャットフィッシュの環境DNAを用いた生息調査

Habitat survey of Channel Catfish, specified invasive alien species, in Lake Biwa and the Seta River using environmental DNA

*松田 涼¹、堀江 怜平¹、石崎 大介²、山本 充孝²、近藤 昭宏¹、中村 昌文¹、山中 裕樹³

*Ryo Matsuda¹, Ryohei Horie¹, Daisuke Ishizaki², Michitaka Yamamoto², Kondo Akihiro¹, Masafumi Nakamura¹, Hiroki Yamanaka³

1. 株式会社 日吉、2. 滋賀県水産試験場、3. 龍谷大学

1. Hiyoshi corporation, 2. Shiga Prefectural Fisheries Experiment Station, 3. Ryukoku University

チャネルキャットフィッシュ(*Ictalurus punctatus*)は特定外来生物として指定されており、1971年に養殖目的で日本に導入されて以降、各地で分布を拡大している。滋賀県では、琵琶湖南湖および瀬田川において2001年に本種の生息が確認され、2019年から駆除活動が行われている。環境DNA解析の情報を生息調査に活用できないか検証するため、琵琶湖南湖および瀬田川で延縄調査を行い、同地点で採水を行った。採水した水はDNA抽出を行い、リアルタイムPCRにより地点ごとで本種のDNAの有無を調査した。駆除活動の結果、CPUEは低く維持されており、本種の駆除効果は確認できている。一方で本種は少ないながらも採捕され続けており、同様にDNAも低いレベルながら検出され続けている。このことから本種は生息量の多い瀬田川下流から遡上して琵琶湖へ侵入している可能性が考えらる。

The channel catfish (*Ictalurus punctatus*) is designated as a specific alien species native to North America, and since it was introduced to Japan for fisheries purposes in 1971, it has expanded its distribution in various places. In Shiga, this species was confirmed to exist in Lake Biwa and the Seta River in 2001, and extermination efforts have been underway since 2018. In order to verify whether information from environmental DNA analysis could be used for habitat surveys, we conducted longline surveys in Lake Biwa and the Seta River once a month, and sampled water at the same locations. The sampled water was filtered and DNA was extracted. The extracted DNA was subjected to real-time PCR analysis using primers and probes specific to this species, and the presence or absence of DNA of this species was investigated at each site. As a result of extermination activities, CPUE has been maintained at a low level, and the extermination effect of this species has been confirmed. On the other hand, this species continues to be collected, although in small numbers, and its DNA continues to be detected, albeit at low levels. This suggests that this species may have migrated upstream from the lower reaches of the Seta River and invaded Lake Biwa.

【P-50】

セトウチサンショウウオの繁殖環境に関する研究

Study on the breeding environment of *Hynobius setouchi*

*久富 早織^{1,2}、坂田 雅之^{3,4}、中村 仁湖⁴、源 利文⁴

*Saori Hisatomi^{1,2}, Masayuki Sakata^{3,4}, Niko Nakamura⁴, Toshifumi Minamoto⁴

1. 東京農工大学農学府生物生産科学、2. 神戸大学国際人間科学部、3. 北海道大学大学院農学研究院、4. 神戸大学大学院人間発達環境学研究科

1. Graduate School of Biological Production, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Faculty of Global Human Science, Kobe University, 3. Research Facility of Agriculture, Hokkaido University, 4. Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University

淡水域における生物多様性の喪失は、地球規模で極めて深刻な状況にある。中でもため池は希少生物のレフュージアでもあるため、多様性保全において重要である。六甲山系の神戸市北区小河地区には多くの放棄ため池が残っており、そのうちのひとつで絶滅危惧Ⅱ類に指定されたセトウチサンショウウオの生息が確認されている。しかし近隣に存在する他の放棄ため池における生息の有無は十分にわかっていない。そこで、本対象地域における本種の生息域を把握するため、環境DNA手法を用いてため池ごとの本種の在/不在を調査した。その結果、今まで生息が未知であった複数のため池から、本種のDNAが検出された。隔月のサンプリングによって得られた結果は本種の生活史を反映したものであると考えられた。また、ため池が放棄されてからの期間が長いほど検出率が下がる傾向がみられ、これにより放棄年数が経つにつれ本種の生息環境が悪化することが示唆された。

The loss of biodiversity in rivers, ponds, and other freshwater bodies is extremely serious on a global scale. Agricultural ponds are particularly important for biodiversity conservation because they contain a large number of species per unit area and provide refuges for rare species. In the Ogo area of Kobe City, located at the northwestern edge of the Rokko Mountains, there are many abandoned agricultural ponds, one of which is confirmed to be inhabited by *Hynobius setouchi*, which is listed as a vulnerable species in the Red List of Japan. However, it is not fully known whether other nearby reservoirs are also inhabited by this species. Therefore, in order to understand the habitat of this species in the target area, we developed a new species-specific probe and investigated the presence/absence of this species in each reservoir using an environmental DNA analysis. As a result, DNA of *Hynobius setouchi* was detected in several reservoirs where the species was not previously known to occur. The results obtained by time-series sampling were considered to reflect the breeding and larval periods of this species. The detection rate tended to decrease with the length of time since the reservoir was abandoned, suggesting that the habitat of this species deteriorates with the years after abandonment.

【P-51】

観察が難しいヨシ原の鳥類を環境DNAで捉える

Using environmental DNA to identify difficult-to-observe bird species in reed beds.

*大井 和之¹、岡部 海都¹、西 星哉¹、城内 智行¹

*Kazuyuki Ooi¹, Hiroto Okabe¹, Seiya Nishi¹, Tomoyuki Jouuchi¹

1. 一般財団法人九州環境管理協会

1. Kyushu Environmental Evaluation Association

鳥類の調査は熟練した調査員による目視調査が基本となっているが、ヨシ原などの茂みに生息して見つけにくい種や夜行性の種のように、調査で確認されにくい種が存在する。本研究は、環境DNA分析技術を適用して、目視で確認が難しい種を含めた鳥類リスト作成を効率的に行う手法の確立を目指すものである。

夏鳥が飛来する5～6月に、ヨシ原内の水たまりや近接する河川河口域で採水し、MiBirdプライマーを用いて鳥類を対象としたメタバーコーディング解析を実施した。鳥類の確認種は限られていたが、目視調査では確認できていなかった種も記録された。環境DNAで確認された種類を意識した目視調査を行うことで、確認が難しい種を効率的に発見できる可能性が拓かれた。

Bird surveys are based on visual surveys by skilled surveyors, but there are some species that are difficult to identify in surveys, such as those that inhabit reed beds and other thickets and are difficult to find, and nocturnal species. This study aims to establish an efficient method of compiling a bird list, including species that are difficult to identify visually, by applying environmental DNA analysis technology. Metabarcoding analyses were conducted for birds using MiBird primers by collecting water in puddles within reedbeds and in nearby river estuaries during May and June, when summer birds are flying in. Although the number of confirmed bird species was limited, some species that had not been identified during visual surveys were recorded. The possibility of efficiently detecting difficult-to-identify species was opened up by conducting visual surveys with an awareness of the species identified by environmental DNA.

【P-52】

大阪湾におけるスナメリの分布解明

Elucidation of the distribution of finless porpoise in Osaka Bay

*橋本 渚¹、木谷 亮太¹、岩田 高志¹、源 利文¹

*Nagisa Hashimoto¹, Ryota Kitani¹, Takashi Iwata¹, Toshifumi Minamoto¹

1. 神戸大学

1. Kobe University

ネズミイルカ科の一種であるスナメリは日本では5つの海域に分布し、その一つに大阪湾を含む瀬戸内海東部がある。大阪湾では盛んな人間活動の影響で個体数減少が懸念されているが、詳細な分布は明らかになっていない。一般に海生哺乳類の分布調査は目視で行われるが、スナメリには背びれが無く大きな群れを作らないため目視での調査が難しい。そこで本研究は環境DNA分析を用いた大阪湾におけるスナメリの分布解明を目的とし、2022年11月（秋季）2023年2月（冬季）5-6月（春季）8月（夏季）に大阪湾全域で目視調査および100定点での採水を行った。秋季、冬季の調査は目視で観察されなかったが、秋季は55地点、冬季は54地点で環境DNAを検出した。春季は3地点で群れを確認し、41地点で環境DNAを検出、夏季も2地点で群れを確認した。これらの結果をもとにスナメリの分布解明における環境DNA分析の有効性について議論する。

Finless porpoise (*Neophocaena asiaeorientalis*) is a species of the Phocoenidae. They are distributed in five main areas in Japan, and the eastern part of the Seto Inland Sea including Osaka Bay, one of their distribution areas, is with a lot of human activities such as fishery, vessel traffic, and coastal development. As a result, there is concern about the decline in the population affected by human activity. However, its detailed distribution is not understood. In general, distributional surveys of marine mammals are conducted visually, but since finless porpoise has no dorsal fin and does not form large groups, it is difficult to conduct a visual survey. In this study, we investigated the distribution of finless porpoise in Osaka Bay using eDNA analysis. We took water samples from 100 sites throughout Osaka Bay, and simultaneously conducted visual surveys in November 2022 (fall), February 2023 (winter), May and June (spring), and August (summer). As a result, although no finless porpoises were visually observed in the fall and winter, eDNA was detected at 55 sites in the fall and 54 sites during in the fall. In the spring, they were observed at three sites and eDNA was detected at 41 sites, and they were also observed at two sites in the summer. Based on these results, we will discuss the effectiveness of eDNA analysis in elucidating the distribution of finless porpoise.



第6回環境DNA学会 九州大会実行委員

The 6th Annual Meeting of The eDNA Society Committee

清野 聡子(九州大学) Satoquo Seino (Kyushu U.)

鵜木 陽子(九州大学) Yoko Unoki (Kyushu U.)

源 利文(神戸大学) Toshifumi Minamoto (Kobe U.)

山中 裕樹(龍谷大学) Hiroki Yamanaka (Ryukoku U.)

山本 哲史(農業・食品産業技術総合研究機構) Satoshi Yamamoto (NARO)

今藤 夏子(国立環境研究所) Natsuko Kondo (NIES)

小出水 規行(農業・食品産業技術総合研究機構) Noriyuki Koizumi (NARO)

村岡 敬子(土木研究所) Keiko Muraoka (PWRI)

土居 秀幸(京都大学) Hideyuki Doi (Kyoto U.)

近藤 倫生(東北大学) Michio Kondoh (Tohoku U.)

荒木 仁志(北海道大学) Hitoshi Araki (Hokkaido U.)

坂田 雅之(北海道大学) Masayuki Sakata (Hokkaido U.)

乾 隆 帝(福岡工業大学) Ryutei Inui (Fukuoka Institute of Technology)

中島 颯大(土木研究所) Souta Nakajima (PWRI)

大井 和之(一般財団法人九州環境管理協会) Kazuyuki Ooi (Kyushu Environmental Evaluation Association)

明石 信宏(NECソリューションイノベータ株式会社) Nobuhiro Akashi (NEC Solution Innovators, Ltd.)

生駒 優佳(事務局) Yuka Ikoma (Secretariat, The eDNA Society)

小林 有季子(事務局) Yukiko Kobayashi (Secretariat, The eDNA Society)

乗地 真里(事務局) Mari Norichi (Secretariat, The eDNA Society)

光崎 とも子(大会事務局) Tomoko Mitsuzaki (Secretariat, The eDNA Society)



第6回環境DNA学会九州大会 要旨集 The 6th Annual Meeting of The eDNA Society Abstracts

日 程: 2023年12月2日-5日(九州大学西新プラザ・九州大学椎木講堂) December 2nd - 5th (Nishijin Plaza・Shiiki Hall (Kyushu University))

2023年11月10日発行 Published: November 10th, 2023

発行元: 一般社団法人環境DNA学会 〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷1-5 龍谷大学内

Issued-by: The eDNA Society c/o Ryukoku University 1-5, Yokotani, Seta Oe-cho, Otsu, Shiga, 520-2194, Japan

【問い合わせ】 e-mail: office@ednasociety.org

【ホームページ】 Homepage: <http://ednasociety.org/>

Copyright 2023 The eDNA Society, Japan All rights reserved (無断転載不可)

