

| 学 位 論 文 要 旨  |   |            |                  |
|--|---|------------|------------------|
| 学位論文等提出者   | 専 攻   | 生物生産環境科学専攻 |                  |
|  | 氏 名   | 安藤慶次       |                  |
| 学位論文等題目  | 絶滅危惧種カワシンジュガイ <i>M. laevis</i> の環境DNAによる検出系の確立と個体群生息地推定への利用 |            |                  |
| 論文審査委員   | 主 査   | 伊藤健吾       | 副 査              |
|  |   |            | 千家正照 乃田啓吾        |
| <p>イシガイ目カワシンジュガイ科に属するカワシンジュガイ <i>Margaritifera laevis</i> は、環境省レッドリストで絶滅危惧IB類に指定されている。岐阜県の養魚場でも本種個体群が確認されているが、この個体群の由来となる母貝集団の自然河川での生息地は未だ明らかでない。そこで、環境DNA (eDNA) 分析に着目し、本種のeDNA検出系を確立し、母貝集団を特定することを目的に研究を行った。</p> <p>研究は以下の4つに大別される。(1) 通常のPCR (cPCR) 用とリアルタイムPCR (qPCR) 用の2種類の種特異的プライマーを設計した。特異性を確認するために他のイシガイ類のDNA増幅試験を行い、養魚場の水で本種DNAを増幅できるかどうか確認した。(2) 本種組織から抽出したDNAを段階希釈した溶液を用い、2種類のPCR法の検出感度を検証した。1倍希釈から10<sup>6</sup>倍希釈までの7段階の希釈溶液を用意し、3回のPCR反復を行った。(3) DNAが運搬される距離を明らかにするために、水路を用いてDNA流下実験を行った。計10地点から2L採水した。qPCRで分析を行い、3回のPCR反復のうち1回でも増幅が確認された場合、そのサンプルは陽性と判定した。3回の反復で増幅できなかったサンプルについては、追加で3回の反復を行った。(4) 本研究地内の自然河川の一部と、養魚場へと河川水を導入する取水口でeDNA分析を行った。自然河川では、河口から200m毎に区切った地点で2Lの採水を行い、計9地点のサンプルを集めた。取水口では、2Lの採水を行った。それぞれのサンプルから3回のPCR反復を行った。</p> <p>以上の調査実験から、以下の結果を得た。(1) 2種類のPCR法で増幅が確認された。他のイシガイ類のDNAは全く増幅しなかったため、本プロトコルは類似種間では高い特異性を有していると考えられた。養魚場の水からも単一の増幅産物が確認され、本種DNA由来の産物であることも確認された。したがって、本プロトコルを用いて本種のeDNAを検出できることが示された。(2) qPCRによる10<sup>6</sup>倍希釈溶液からの1回の反復試料を除いて、全てのサンプルおよび反復試料で増幅が確認された。一般的にはqPCRの方が感度は優れることが知られているが、本実験においては大きな差は現れなかった。したがって、少なくとも今回の組織DNA (67ng/μL) の10<sup>6</sup>倍希釈濃度相当のeDNAであれば、どちらのPCR法を用いても検出できると考えられた。(3) eDNAは、水路の終点(1410m)でも検出することができた。水路が3面コンクリートであることによる単調な流れと、eDNAが分解されにくい水温および水質であったことから、eDNAがほとんど分解されずに終点まで運搬されたと考えられた。3回のPCR反復で陰性だった地点は、追加の3回の反復で陽性と判定された。したがって、反復回数を増やすことは偽陰性のリスクを減少させると考えられた。(4) 今回eDNA分析を行ったどの地点からも増幅は確認できなかった。このことから、その地域には本種が存在しないか、本種の生息数がわずかであったために検出できなかった可能性が考えられた。もしくは、冬季に分析を行ったため、本種の代謝活性が著しく減少したことによる偽陰性の可能性もある。今後の調査を、水中eDNA濃度が上昇するとされる繁殖期に行うことで、より信頼性のある結果が得られると考えた。</p> |   |            |                  |
|  |   |            | 岐阜大学大学院自然科学技術研究科 |