# ニッポンバラタナゴの保護に向けた環境DNA検出系の開発

大阪府立高津高等学校

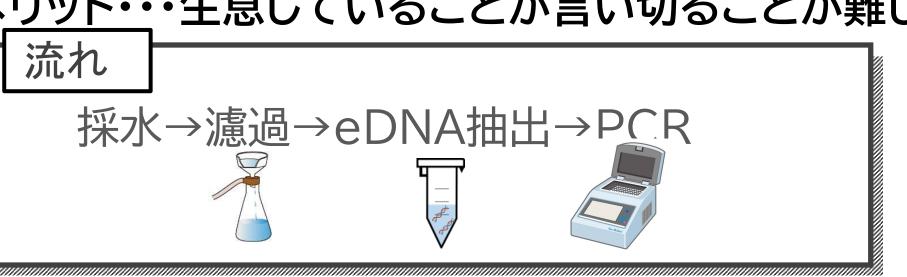
## 背景•目的

環境DNAとは・・・

川やため池、海などの水中に溶けているDNAのことで、生物が生息している 水を採水し、DNAを抽出するだけでその場所にどんな生物が生息しているの かを推定することができる。

・メリット・・・生態系を傷つけることなく生息種を判別することができる。

・デメリット・・・生息していることが言い切ることが難しい



ニッポンバラタナゴ(Rhodeus Ocellatus Kurumeus)

(以下略:ニッパラ) はコイ科コイ目タナゴ亜科バラタナゴ属 かつては西日本のため池、農業用水路などに生息していた。

しかし、現在は個体数が減少し、絶滅危惧種IA類(CR)に指定されている

外来亜種であるタイリクバラタナゴ(Rhodeus Ocellatus Ocellatus)(以下 略:タイバラ)の侵入・ニッパラとの交雑

現在の状況:保護団体により、ニッパラの保護池の保持によってかろうじて 生態系を維持している。そこでニッパラを保護しし、保全したいと考えた。

問題点:ニッパラとタイバラの形態が非常に似ている 目視で判別することは難しい

そこで・・・

環境DNA法を用いて、簡便かつ、生態系を破壊することなく ニッパラを保全することができるのではないかと考えた。

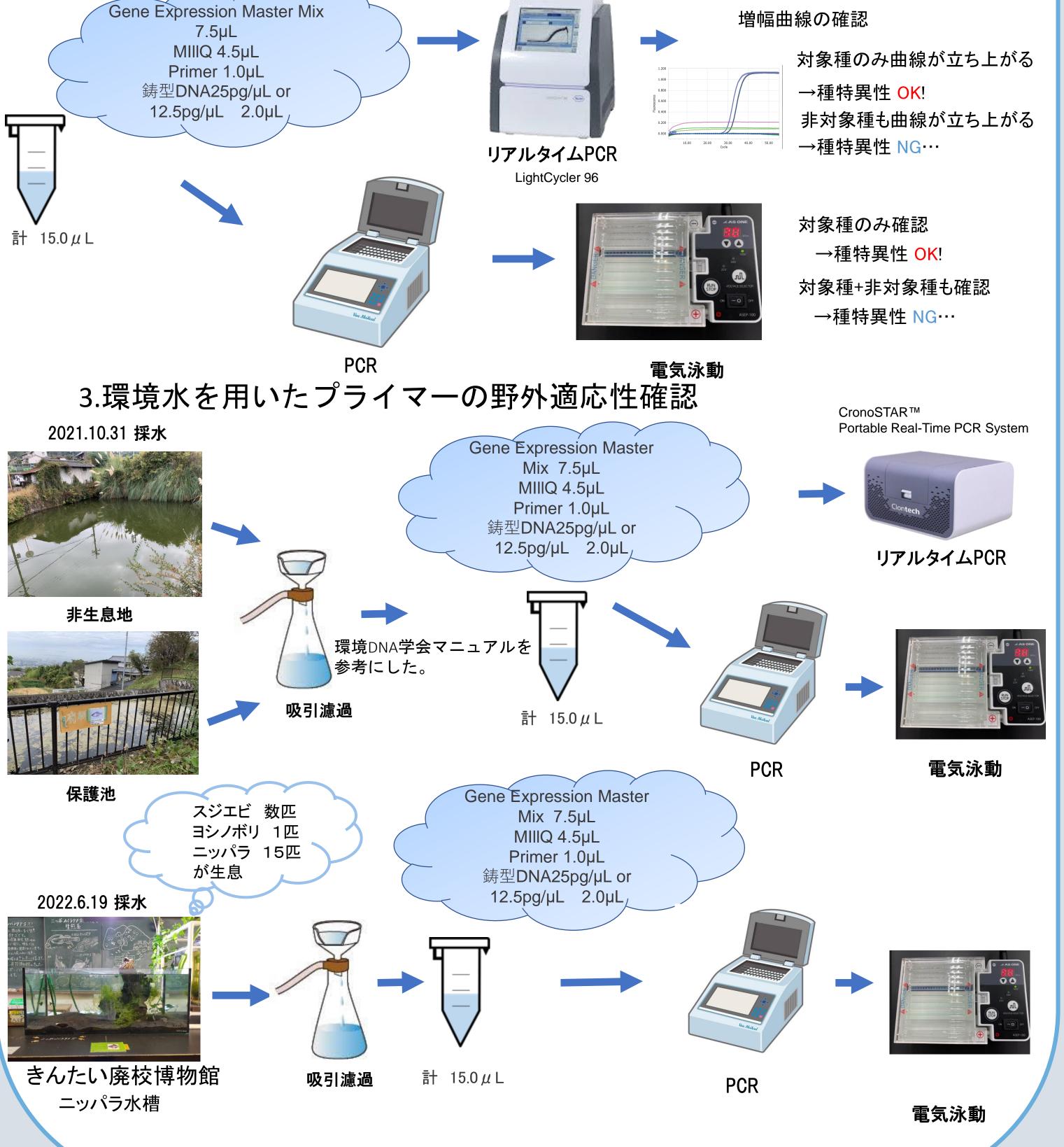
## 研究方法

#### 1.各種に特異的なプライマーの作成

(1) ニッパラ、タイバラ+イチモンジタナゴ、シロヒレタビラ、カネヒラ、ヤリ タナゴ、アブラボテ(関西圏に生息するタナゴ類)のミトコンドリアDNAのND1領域 の配列情報をNCBIから取得

- (2)3末端が各種に特異的な塩基になるような位置にプライマーを設計
- (3) Primer Blastを使用して、各プライマーが対象種のみに増幅することを確認

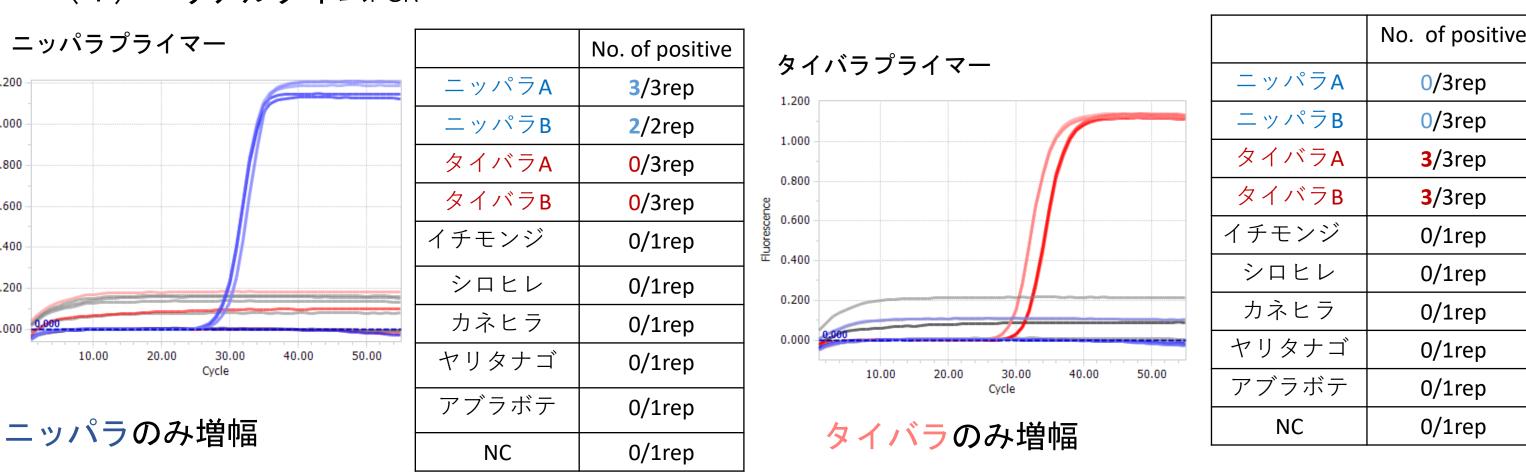
#### 2.組織DNAを用いたプライマーの種特異性確認



#### 結果

## 2.組織DNAを用いたプライマーの種特異性確認

(1) リアルタイムPCR



(2) PCR+電気泳動

ニッパラプライマー

ニッパラ

個体A 個体B 個体A 個体B 個体A 個体B a ニッパラ タイバラ

増幅が確認された

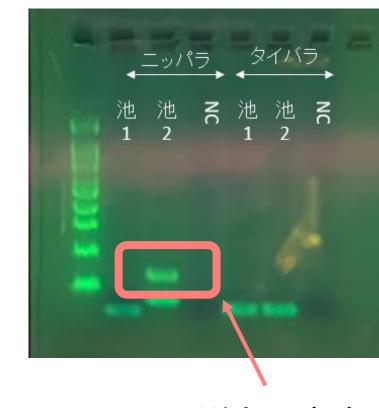
うっすら増幅が確認された 増幅が確認されなかった 増幅が確認された

#### 3.環境水を用いたプライマーの野外適応性 保護池

(1) リアルタイムPCR Primer Probe set ニッパラ タイバラ

池2

(2) PCR十電気泳動

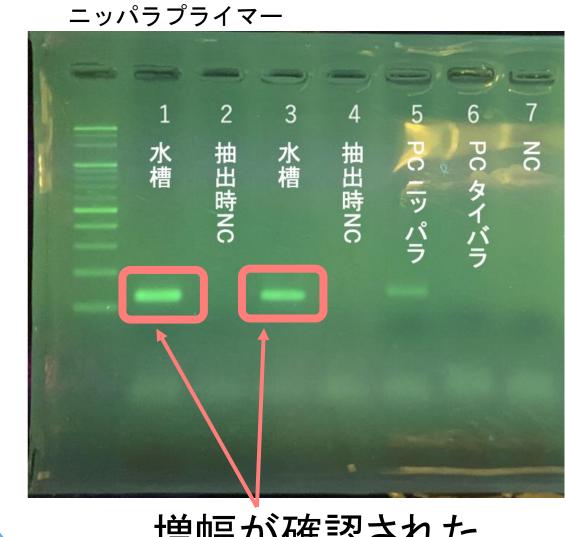


池1 ニッパラ非生息地 池2 ニッパラ保護池

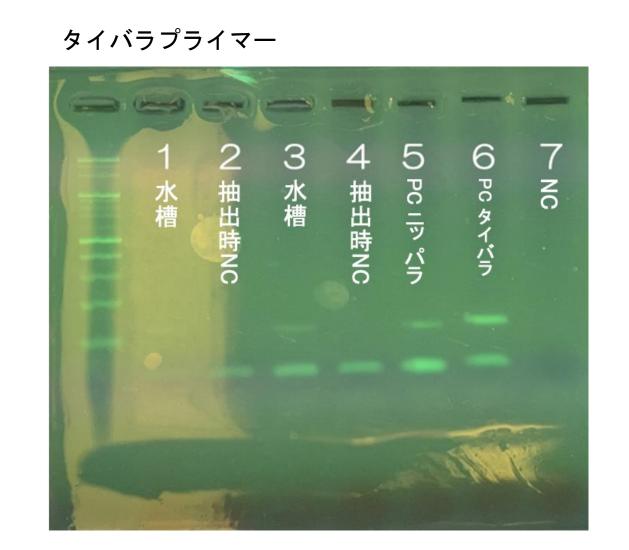
増幅が確認された。

タイバラプライマー

水槽 PCR十電気泳動



増幅が確認された。



### 考察

#### ~組織DNA~

- リアルタイムPCRにより、両プライマー・プローブともに対象の種のみ増幅が 確認できた。よって、各プライマーは種特異性があるといえる。
- PCRと電気泳動より、ニッパラプライマーは対象種のみ増幅が確認できた。 タイバラプライマーは対象種の増幅は確認できたが、template DNAが二ッパ ラの時にも増幅が少し確認された。そこで、template DNAの濃度を半量の 12.5pg/μLに変更すると、増幅は確認できなくなった。実際の環境水には ニッパラのDNAが12.5pg/ $\mu$ Lより濃度が低いと考えられる。よって、両プライ マーともに、種特異性があるといえる。

# ~環境水~

- リアルタイムPCRにより、ニッパラプライマーが保護池のeDNA ニッパラ水槽 のときのみ増幅が確認された。そのため、野外適応可能といえる。
- PCRと電気泳動においても、ニッパラプライマーが保護池のeDNAの時のみ 増幅が確認された。よって、プライマーの野外適応可能といえる。また、問 題視されていた、タイバラプライマーにおいては保護池の調査時に増幅が 確認されなかったため、これも野外適応可能と考えられる。

## 結論•展望

種特異性のあるニッパラ、タイバラのプライマー・プローブが完成した。また、完成した、プライマー・プローブは野外でも適応可能なことが確認された。 今後は、この完成した、プライマー・プローブセットを用いて、ニッパラ保護池へのタイバラ侵入検出を定期的に行う、未知のニッパラ残存生息地の発見 を行いたい。