

研究班番号【107】
ミナミメダカの新息地、発見へ。

生物班:真栄田 晋作、高村 亮太郎、外濱 幸音、堀田 暁友

Abstract

The purpose of this research is to discover a habitat of *Oryzias latipes* (Japanese name is *Minamimedaka*) and make use of it for conservation activities. This time, we investigated it by using the Environmental DNA method. We drew water from four rivers. However, as a result, the DNA wasn't detected. The cause of it is, we can guess, there may be some defects in the process of this experiment.

要約

本研究の目的はミナミメダカの生息地を発見し、保護活動に役立てることである。本実験は環境DNA手法を用いて調査した。4箇所の河川から水を採取し、実験したが結果はどこからもミナミメダカのDNAは検出されなかった。これについては実験過程でなんらかの不備があったことが考えられる。

1.はじめに

近年、外来種の持ち込みにより我々の周りの生態系が破壊されてきている。ミナミメダカは絶滅危惧種2類に認定されており、絶滅が心配されている。ミナミメダカは河川に生息し、主に川の流れが緩やかで、周りに植物が多い環境で生活しているということがわかっている。しかし、まだ見つけていないだけで新たな生息地があるのではないかと我々は考えた。そこで、本研究ではミナミメダカが生息していると明らかになっている河川と、そうでない流れが緩やかで植物が多い河川を、環境DNA分析手法を用いて調査した。

2.研究手法

《実験1》採水

淀川の生息が明らかな芥川と大正川、明らかでない神崎川と安威川からペットボトルを用いて、各箇所1Lずつ採水を行った。

《実験2》濾過

グラスファイバーフィルターを用いて、サンプルの濾過を行う。

《実験3》DNAの抽出

①サリベットチューブにフィルター入れ、Buffer AL(400 μ L)、Proteinase K1(40 μ L)を加える。

②恒温器でサリベットを56°Cで30分保温する。

③3000Gで3分間遠心分離を行う。

④TEバッファ(220 μ L)を加えて、1分間静置する。

⑤3000Gで3分間遠心分離を行う。

⑥サリベットチューブの上部を取り外して、下部にエタノール(400 μ L)を加える。これをピペティングでよく混ぜる。

⑦サリベットチューブ下部の液体をDNeasyカラムに650 μ L移す。

⑧6000Gで1分間遠心分離を行う。

⑨サリベットチューブ下部に残っているDNA溶液を再びカラムに移して6000Gで1分間遠心分離を行う。これを溶液がなくなるまで繰り返す。

⑩カラムを新しい2mLコレクションチューブにのせかえてバッファAW1(500 μ L)を加える。これを6000Gで1分間遠心分離を行う。

⑪カラムを新しい2mLコレクションチューブにのせかえてバッファAW2(500 μ L)を加える。

⑫使用している遠心分離機の最大速度(12000G)で2分間遠心分離を行う。

⑬低吸着の1.5mLチューブにのせかえる。

⑭100~200mLのバッファAEを加えた後に1分間静置する。

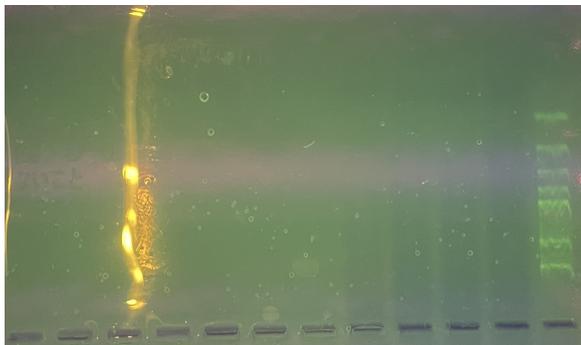
⑮6000Gで1分間遠心分離を行う。



《実験4》PCR法

3. 結果

生息が確認されていた芥川と大正川、確認されていなかった神崎川と安威川のすべてでミナミメダカのDNAは確認されなかった。



↑確認されなかったDNA

4. 考察

結果で過去にミナミメダカの生息が確認されていた芥川と大正川でもミナミメダカのDNAが発見されなかったということから、実験内で何らかの不備があり実験が失敗した可能性があるといえる。今回の実験でミナミメダカのDNAが検出されなかった原因として、採水した4つの河川の水にミナミメダカの痕跡が含まれていなかった可能性があったことに加え、実験過程の中にサンプルが少ない、実験過程で使用する薬品などの量を誤ったなどの問題があったことが挙げられる。

5. 結論

淀川の支流、4箇所のうち2箇所がミナミメダカの生息が確認されている。しかし、今回の実験では4つのサンプルからミナミメダカのDNAが検出されなかった。改善点としては実験過程における準備不足、そして計画的に実験を行い余裕を持てるようにするなどの点が考えられる。

6. 参考文献ならびに参考Webページ

環境DNA学会<https://ednasociety.org/>

Scientific Reports<https://www.nature.com/srep/>

大阪市立自然史博物館<https://osakana-chan.wixsite.com/project-a>