

形態的特徴と環境 DNA 解析を用いた宍塚大池の藻類フロラ

大河原 由貴 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 石田 健一郎 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

淡水環境における生物多様性は、経済、文化、教育などの観点からその重要性が認識されている。しかしながら、近年では水質汚染や生息地の破壊などの影響により、世界中で淡水生態系の縮小が危惧されている(Dudgeon et al., 2006)。今後淡水環境を適切に管理していくために、現在の水域にどのような生物が存在しているのか、正確に把握することが求められる。

茨城県土浦市西部に位置する宍塚地域は、開発の進む関東平野において 100 ha の里山環境が広がり、高い生物多様性を維持している。1980 年代より NPO を主体とした保全活動が行われており、2015 年には環境省による「生物多様性保全上重要な里地里山」にも選定された。宍塚地域における生態系の調査は動物、および陸上植物で 1000 種近くが報告されている(及川ひろみ, 1998)。一方で、藻類に着目した生物相の研究は 1978 年の所属研究室の卒業研究による観察記録があるのみで(後藤道美, 1979)、以来調査が全くなされていない。地域の生物多様性をより詳細に理解し今後の保全活動に生かしていくためには、微細藻類を対象とした生物相の基礎的データの更新が望まれる。

本研究では、宍塚大池の藻類、及びそれに近縁な真核生物を対象に、顕微鏡観察から得られる形態的特徴と環境 DNA 解析によって得られる 18S rRNA 遺伝子配列に基づいて、生物相調査を行った。

【方法】

1) 調査地及びサンプリング方法

宍塚地域の中心に位置する宍塚大池を調査地とした。宍塚大池は農業用に 3 つの谷をせき止めて造られたため池である。水域面積は約 3.3 ha で、江戸時代の古地図ではすでにその位置を確認できることから、長い歴史を持ち豊かな生態系が確立されていることが推察される。本研究では、大池北部の灌漑用水口、雑木林が池の縁まで迫った東部、また西側のイナリヤツ湿地の 3 地点において、2022 年 4 月から 12 月にかけて、毎月サンプリングを行った。試料の採集方法として、プランクトンネット法、葉洗い法、直接法、また池の水が干上がっていた場合に限り土壌サンプルを持ち帰り、AF-6 培地を加えたものを観察した。加えて、環境 DNA のフィルター試料作成と粗培養観察に利用するため、環境水も約 1 L 採集した。

2) 形態観察

AXIO ImergerA2 (ZEISS) と CKX31 (OLYMPUS) の顕微鏡を用いてサンプルの観察を行った。AXIO ImergerA2 で観察された細胞はできる限り顕微鏡カメラ DP73 (OLYMPUS) で写真記録を取った。

3) 環境 DNA の抽出

環境水サンプルは採集当日中に GF/F filter (Whatman) で濾過し、-80 °C で保存した。ビーズ式細胞破碎と Dneasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いてフィルターから DNA を抽出した。National Center for Biotechnology Information (NCBI) データより多様な真核スーパーグループを含む 51 種の 18S rRNA デー

タベースを作成し、アライメントエディタ上で PR4, PR9 プライマー (Nakayama et al., 1996) の有効性を検討した後、TaKaRa Ex Taq を用いた PCR によって V4 - 5 領域を増幅できることを確認した。その後、PR4, PR9 を用いた PCR によるライブラリー作成と、MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) を用いたシーケンシング解析を依頼した。

4) 環境 DNA の解析

メタゲノムデータ解析を行うパイプラインである QIIME2 (Bolyen E et al., 2019) と mothur (v.1.48.0) (Schloss et al., 2013) を用いて、系統解析を行った。ペアエンドのクオリティを確認し、Forward リードを用いたシングルリード解析とした。DADA2 処理を行い、シーケンスエラーの修正と Amplicon Sequence Variant (ASV) へのグルーピングを行った。加えて系統解析では、PR² database (v.4.14.0) (Guillou et al., 2013) を参照し、単純ベイズ分類器を利用して ASV 配列の各分類群への割り当てを行った。

【結果・考察】

1) 形態観察

これまでに 10 門 92 属を観察した。最も多くの属が見られたのは緑藻植物門であり、合計で 45 属を観察することができた。他に観察された生物群は、シアノバクテリア 12 属、渦鞭毛藻 4 属、ストラメノパイル 13 属、ケルコゾア 1 属、ユーグレノゾア 9 属、アメーボゾア 4 属、クリプト藻 3 属、太陽虫 1 属であった。

2) 環境 DNA 解析

合計 193,262 配列 (Forward) から 569 の ASV を得た。系統解析としては、9 門 19 綱 38 目 58 科 75 属 107 種の配列を検出した。これらの中には、形態観察で記録することのできなかつた Apsozoa や Opalozoa に属する原生物の配列も含まれる。また、Perkinsea など、寄生性の生活様式をとる生物群についても環境 DNA の検出によってその存在が示唆される。

卒業研究発表では、形態観察及び環境 DNA 解析から得られたデータを統合し、現在の宍塚大池における藻類相について考察するとともに、40 年前のデータとも比較し、藻類相の変遷についても議論する予定である。

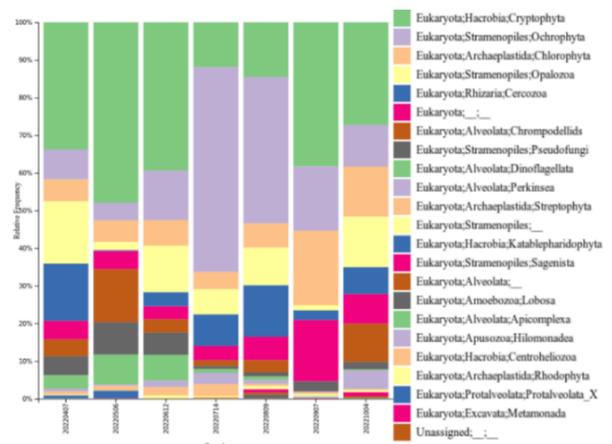


図 1. 4-10 月の環境水における綱レベルでのリード数占有率