

# 桶ヶ谷沼の保全とベッコウトンボの環境 DNA の検出

静岡県立掛川西高等学校  
自然科学部 2年 佐々木太一 他2名

## 1 研究の目的

生息環境の消失により、希少種ベッコウトンボの個体数は全国的に減少している。NPO 法人「桶ヶ谷沼を考える会」が行った個体数調査(表 1)では、令和 4 年 5 月に 380 頭の個体の飛翔が確認された。昨年度の調査で 67 頭確認されていたことから、1 年間の保全活動の成果が出たと考えられる。ヤゴ(図 1)からの羽化は 232 頭の個体がプラスチックの飼育コンテナで確認されており、これはエサやりなど人の手が入った区画のものである。反して、自然区である桶ヶ谷沼の沼地からヤゴからの羽化は、令和 3 年度、令和 4 年度ともに確認されていない。鶴ヶ池からはヤゴからの羽化が確認されている。

本校自然科学部は、昨年度の研究でベッコウトンボの DNA を増幅する起点として必要な塩基配列であるプライマーと近縁種であるヨツボシトンボのプライマーを作成した。どちらもその胸筋を試料として PCR 法を行い、その有効性を示すことができた。また、それぞれのトンボの DNA を特異的に増幅することも確認した。これを用い、水中に放出される環境 DNA の検出を行った。ここでの環境 DNA とは、トンボの代謝産物から得られる DNA をさす。

昨年度の研究では、本校のマニュアルでは、飼育水からの増幅が出来なかったため、2021 年 12 月 27 日に神戸大学の源利文教授から環境 DNA 学会のマニュアルに基づく検出方法について教えていただいた。この方法に基づいて、本年度の研究では、産卵を確認し、代謝産物があるという仮説を立てた上で採水し、ベッコウトンボの環境 DNA を検出した。

さらに、1 月から 6 月にかけて、磐田市環境課や NPO 法人「桶ヶ谷沼を考える会」と共に桶ヶ谷沼や鶴ヶ池の保全活動に参加した。

## 2 桶ヶ谷沼

静岡県磐田市の桶ヶ谷沼地域は、桶ヶ谷沼(図 2)と鶴ヶ池という淡水性の沼地で構成されており、絶滅が危惧されている生物も含めて多様な生物が生息している。本校自然科学部は 4 年前から桶ヶ谷沼を考える会の活動に参加し、桶ヶ谷沼地域で真菌の観察等を行ってきた。桶ヶ谷沼地域は県内唯一のベッコウトンボの生息地であり、飼育コンテナ(図 3)を用いてエサやり等人の手を加えることで産卵や羽化の場が確保されている。

調査地域	令和 3 年度	令和 4 年度
台地東(コンテナ)	35	232
台地西	0	15
沼縁入り江	2	49
菜の花畑	1	14
沼北	29	70
合計	67	380

表 1 ベッコウトンボの個体数 (磐田市発表)



図 1 ベッコウトンボのヤゴからの羽化



図2 1月の桶ヶ谷沼



図3 飼育コンテナ

### 3 本年度の保全活動

NPO法人「桶ヶ谷沼を考える会」が中心となって、ベッコウトンボの保護活動がこれまで行われてきた。本校自然科学部は、本年度、神奈川県立生命の星・地球博物館の学芸員の荻部治紀先生からご指導頂き、以下の保全活動を行った。保護区の飼育コンテナだけでなく、自然区からの羽化を促進することを目的とし、抽水植物の浚渫や鶴ヶ池のオオフサモの除去を行った。また、ベッコウトンボの代謝産物のある区域の見当をつけるため、保護区の飼育コンテナのヤゴの頭数調査と産卵の確認を行った。

#### (1) ヤゴの頭数調査(2022年1月10日、3月7日)

NPO法人「桶ヶ谷沼を考える会」が2011年から行ってきた保護活動で、約10年間自然に任せた飼育コンテナをいただき、時期を分けて2日間行った。網でヤゴをすくい、図鑑を用いて種を判別した。(図4)た、判別が困難な種については、「桶ヶ谷沼を考える会」の福井順治先生に助言をいただいた。その結果、1月10日に行った調査で、ベッコウトンボのヤゴを6匹確認することができた。また、ヨツボシトンボのヤゴは、両日計37匹確認できた。(表2)

トンボの種/月日	1月10日	3月7日	計
ショウジョウトンボ	206	82	288
チョウトンボ	7	12	19
シオカラトンボ	6	1	7
ヨツボシトンボ	23	14	37
ベッコウトンボ	6	0	6

表2 調査の結果



図4 調査したヤゴ

## (2) 産卵の準備、確認(2022年4月9日、4月23日、4月30日)

頭数調査によって、ベッコウトンボのヤゴを確認することができたため、この自然に任せたコンテナでは過去に産卵が行われたと考えられる。これを確かめるため、そのコンテナを一度空にし、水、土、草を入れることで、再び産卵が行われるようにした。水は雨水を1月から溜めたものを利用し、12月に沼を浚渫した時の草と根の土を3月まで天日干したものを用了。

その後、杭を打ってトレイルカメラを設置し、連続のべ 1440 時間の撮影を行って、産卵の様子を確認した(図5, 6)。保護活動の方々にコンテナの区別をしていただくため看板を立てた(図7)。

その結果、水や草を入れ替えた、新しいコンテナ(図8)に4月30日にベッコウトンボの産卵が見られたため、飼育コンテナの水にトンボの代謝産物があると考えた。



図5 トレイルカメラの設置



図6 トレイルカメラ



図7 看板



図8 新たなコンテナ

## (3) 抽水植物の浚渫(2022年4月30日)

アシやマコモなどの抽水植物で覆われていたところにまばらな水面を整備すると、ベッコウトンボの産卵場所となる。(図9) 桶ヶ谷沼の沼縁に繁茂するアシやマコモの根を30cm四方に切り出して除去し、4㎡ほどの水面を確保した。(図10)

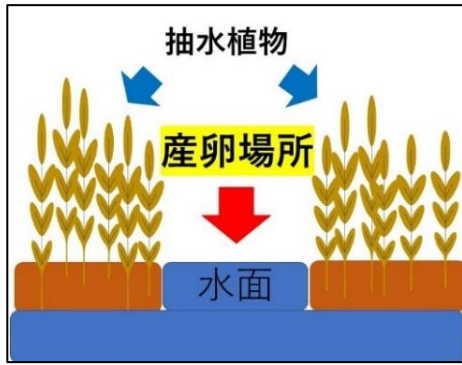


図9 産卵場所



図10 浚渫後の様子

#### (4) 鶴ヶ池の保護(2022年6月12日)

鶴ヶ池には、オオフサモなどの外来種が繁茂しており、マコモなどの在来種の生育が阻害されている。(図11)マコモはベッコウトンボの産卵場所に欠かせないため、ベッコウトンボの産卵場所を確保することを目的とし、オオフサモを浚渫した。オオフサモの茎は折れやすく、折れた茎の断面から根を生やし、再生するため繁茂しやすい。そのため、網を用いて断片を残すことなく回収した。(図12,13)



図11 浚渫前の様子



図12 浚渫の様子



図13 浚渫後の様子

#### 4 環境DNA学会で発表された昆虫の環境DNAに関する研究

本校自然科学部は、2021年11月20日に行われた環境DNA学会第4回大会でポスター発表を行った。また、世界各地の環境DNAに関する研究者の発表のうち、クチクラを持つ生物を対象とした研究についての発表の数を調べた。

昆虫(ハチ)、水生昆虫(カゲロウなど)、水生甲殻類(ザリガニ、エビ)、その他に分類した。全ての発表86件のうち、クチクラを持つ生物を対象に研究を行っていたのは7件の発表だけであった。(図14)

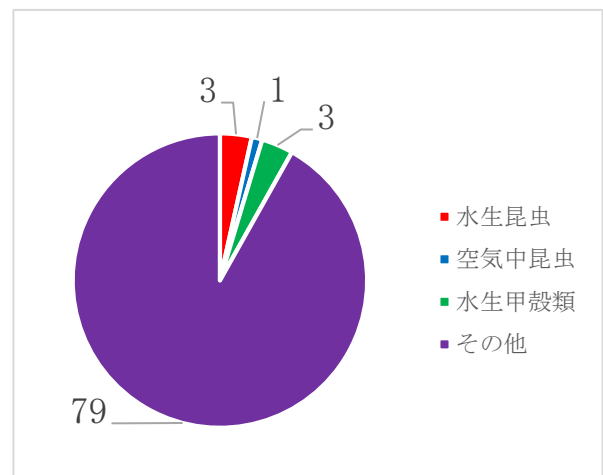


図14 対象生物の内訳

#### 5 PCR法を用いた昨年度の研究

##### (1) ベッコウトンボとヨツボシトンボのプライマーの設計

プライマーとは、DNAを複製する領域の塩基配列と相補的な、短い1本鎖DNAである。PCR法(ポリメラーゼ連鎖反応法)を利用してDNAを複製する際、プライマーは複製の起点となる。PCR法の原理は以下の通りである。

ア DNA溶液を95°Cに加熱し、2本鎖DNAを解離する。

イ 50~60°Cに下げ、プライマーを結合させる。

ウ 約72°Cに上げ、DNAポリメラーゼが作用し、プライマーが伸長する。

この操作を繰り返すことで、目的の DNA を複製することができる。(図 15)

しかし、ベッコウトンボの DNA を特異的に増幅できるプライマーがデータベースに無く、高校生でも作成が可能と、神戸大学 源先生の助言を受け、ベッコウトンボのプライマーを作成した。(図 17) また、ベッコウトンボと羽化時期が重なり、近縁種であるヨツボシトンボのプライマーも作成した。(図 18)

これにより、2種の環境 DNA の判別を可能にできると考えた。

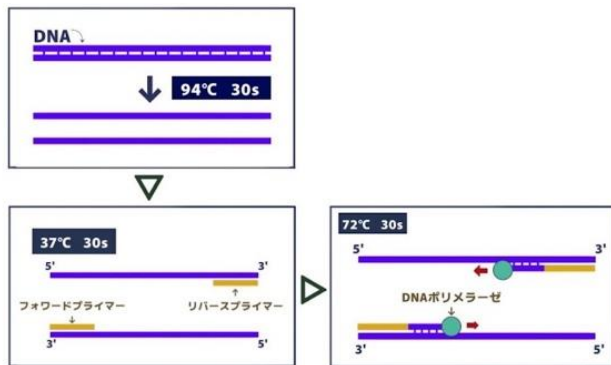


図 15 PCR 法の原理



図 16 プライマーの設計

F 5' -CTATGGGCTCTAGGATTTGTATTTTC-3'  
R 5' -TATTGATAGTACATAGTGAAAGTGG-3'

図 17 ベッコウトンボのプライマー 増幅長 135bp

F 5' -CCTTATTATGAGCTCTAGGATTCGTATTC-3'  
R 5' -GCCCCTATTGATAAACATAATGGAAATGAG-3'

図 18 ヨツボシトンボのプライマー 増幅長 145bp

### (2) 作成したプライマーの有効性の確認

トンボの胸筋を試料として PCR 法を行い、DNA の増幅を確かめた。その結果、ベッコウトンボのプライマーはベッコウトンボの DNA を種特異的に増幅したが、ヨツボシトンボのプライマーはベッコウトンボ、ヨツボシトンボの DNA をともに増幅した。(図 19) よって、2種のプライマーを併用することで種の判別が可能となることが確認できた。

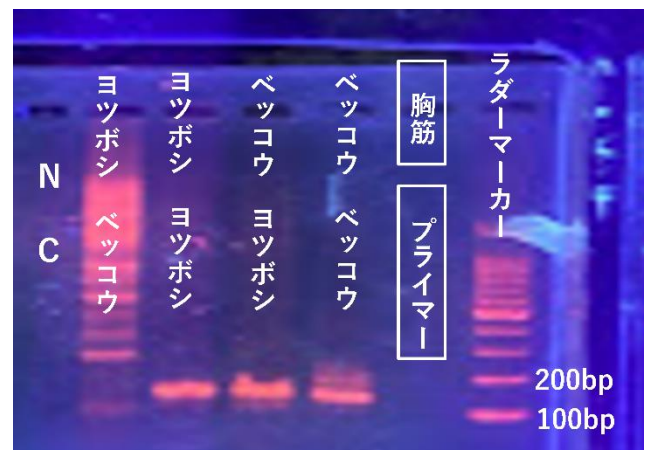


図 19 電気泳動の結果

### (3) 飼育水からの環境 DNA の検出

10月から、コンテナから20回採水し、サーマルサイクラーを用いて増幅を試みたが、増幅産物は得られなかった。12月に神戸大学の源利文教授から環境 DNA 学会のマニュアルに基づく検出方法について教えていただき、1月から増幅を試みたが3月まで30回行ったが増幅できなかった。

## 6 本年度の研究

4月30日に産卵を確認することができたため、飼育コンテナには代謝産物が必ずあると仮説を立てた。産卵を確認したコンテナから慎重に上澄みを採水し、アスピレーターを用いてろ過する。その際、ガラスフィルターはWhatman GF/Fを使用した。フィルターに残ったもの(図20)をサンプルとしてDNA抽出液を精製する。環境DNA学会のマニュアルに基づき、水中に放出されたDNAの抽出を行った。(図21)

採水直後にDNAの抽出を行うため、DNAの抽出までの作業は桶ヶ谷沼ビジターセンターの実験室をお借りして行った。DNA抽出液2 $\mu$ LにDNAポリメラーゼとしてKOD one Master Mix 25 $\mu$ L、前研究で有効性が確認された、ベッコウトンボやヨツボシトンボのプライマー(図17、18)を2 $\mu$ L加え、蒸留滅菌水で50 $\mu$ Lに調製した。サーマルサイクラーを用い、図22に示される温度サイクルで対象とするトンボのDNAを増幅させた。対象とするトンボのDNAの増幅を確認するため、2%アガロースゲルを用いて電気泳動法を行った。



図20 サンプル



図21 DNA抽出

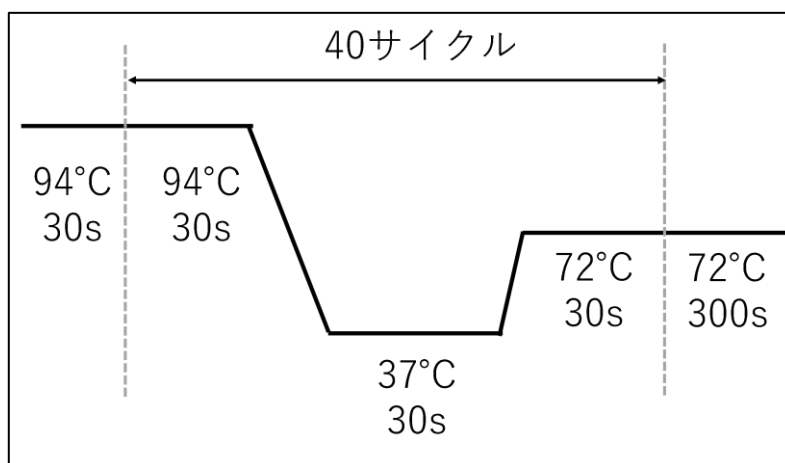


図22 温度サイクル

## 7 結果

2022年3月31日に行った電気泳動の結果Iでは、ヨツボシトンボのプライマーを用いた増幅で100bp~200bpのバンドが得られたが、ベッコウトンボのプライマーを用いた混合液からバンドを検出できなかった。(図23)

2022年6月20日の結果IIでは、ベッコウトンボの産卵を確認できた飼育コンテナから採水した試料を用い、ベッコウトンボ、ヨツボシトンボのプライマーを用いた増幅とともに100bp~200bpのバンドが得られた。(図24) DNA抽出液と抽出前の試料をそれぞれ蒸留滅菌水に置き換え、2種類のネガティブコントロールを設定した。これにより、抽出時のコンタミネーションを否定することができた。

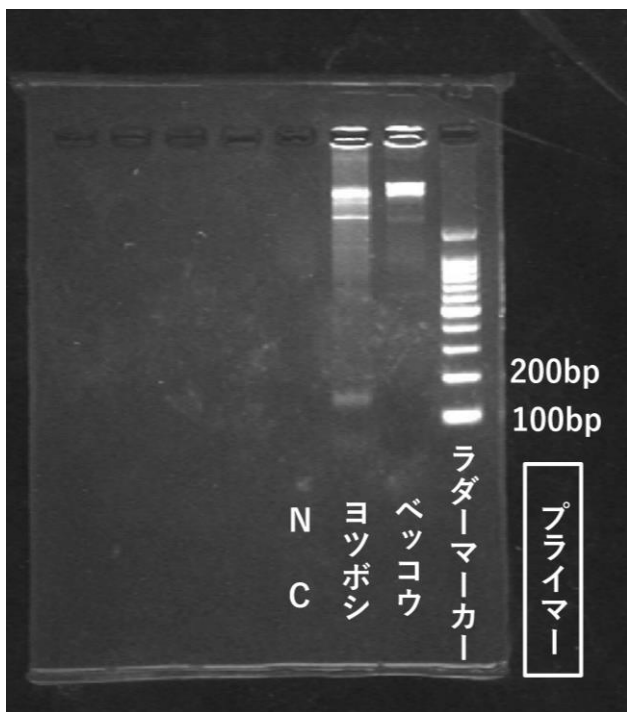


図23 結果I

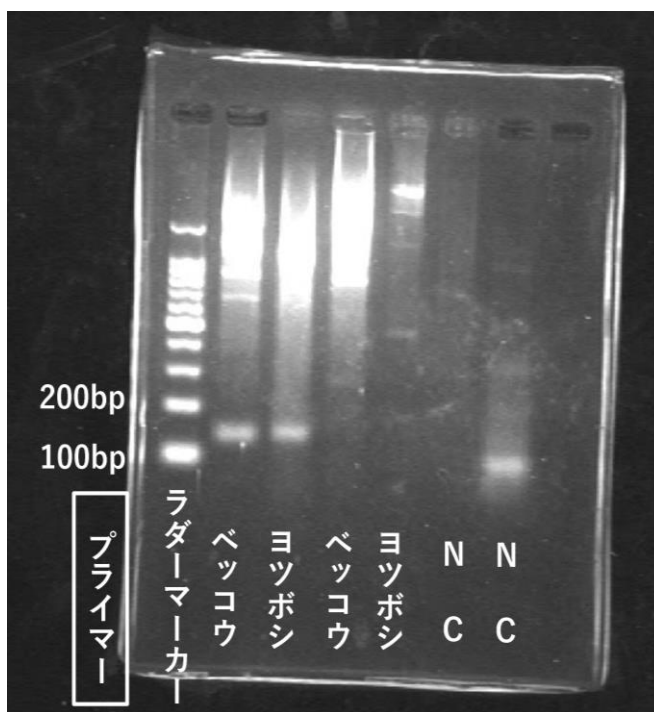


図24 結果II

## 8 考察

2022年1月以来本実験を約30回行ったが、初めてベッコウトンボのプライマーを用いた増幅で100bp~200bpのバンドが得られたのは6月20日である。この時期はヤゴが孵化後成長し代謝産物が多いと考えられる。本実験の成功回数が少ないことや、冬季の代謝が落ちる時期のベッコウトンボの環境DNAの検出は難しいと判断した。孵化後の急激な成長期、すなわち代謝活性が高い時期は環境DNAを検出し易いのではないかと考えた。

## 9 今後の展望

本研究によって、トンボの水中の環境DNAを検出できるということが確認できた。増幅産物を今後シーケンス解析に出せばベッコウトンボの代謝産物がある確証が得られる。本研究では、産卵を確認し、代謝産物があると仮説を立てたコンテナから採水した試料を用いて環境DNAの検出を行ったため、桶ヶ谷沼地域の自然区にベッコウトンボが生存しているということを証明するものではない。現在、桶ヶ谷沼や鶴ヶ池、小笠山から採水した試料の環境DNAの検出を行っている。桶ヶ谷沼地域の自然区にベッコウトンボが生存しているということを証明するため、環境DNAの検出を成功させたい。

環境DNA学会でクチクラを持つ生物の環境DNAに関する研究の発表が少なかった。クチクラを持つ生物の環境DNAを対象とする先行研究を探し、この研究を継続したい。

## 10 謝辞

本研究にご協力いただいた、磐田市、神戸大学教授の源利文様、神奈川県立生命の星・地球博物館の学芸員の苅部治紀様、NPO 法人「桶ヶ谷沼を考える会」、福井順治先生の方々に心から感謝申し上げます。

## 11 参考文献

- (1) 高橋 純一・福井 順治・椿 宜高・京都大学生態学研究センター・静岡県立磐田南高等学校  
「静岡県桶ヶ谷沼地域における 絶滅危惧種ベッコウトンボ (*Libellula angelina*) の遺伝的多様性」  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/hozen/14/1/14\\_KJ00005576307/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/hozen/14/1/14_KJ00005576307/_pdf)
- (2) 福永健一・富田正章・澄田和歌子・歳弘克史・手島義人・片山淳  
山口環境研業報 第23号(2002). 山口県環境保健研究センター  
「ヨツボシトンボの遺伝子解析から見たベッコウトンボの保護」  
<https://kanpoken.pref.yamaguchi.jp/soshiki/syohou/2002g01.pdf>
- (3) 静岡県立掛川西高等学校自然科学部 「空中環境DNAを使った鳥類調査法の確立を目指して」  
<https://gakusyuu.shizuoka-c.ed.jp/science/sonota/ronbunshu/h30/183184.pdf>
- (4) 静岡県立掛川西高等学校自然科学部 「空中孢子DNA検出によるキノコの判別と生育域調査」  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/kagakutoseibutsu/59/3/59\\_590306/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/kagakutoseibutsu/59/3/59_590306/_pdf)
- (5) 一般社団法人環境DNA学会 「環境DNA調査・実験マニュアル」  
[https://ednasociety.org/wp-content/uploads/2022/06/eDNA\\_manual\\_ver2\\_2.pdf](https://ednasociety.org/wp-content/uploads/2022/06/eDNA_manual_ver2_2.pdf)
- (6) 一般社団法人環境DNA学会 土井秀幸・近藤倫生 編 「環境DNA生態系の真の姿を読み解く」