

大戸川の詳細な魚類相調査に基づいた復元目標の設定

藤田宗也

滋賀県

1. はじめに

大戸川は滋賀県南部を流れる一級河川である。魚類は滋賀県レッドデータブック掲載の約 15 種や、県内で分布が限られる種、大戸川にのみ生息する種が確認されている。そのため、その希少性と特異性が専門家によって注目されており、包括的な魚類の分布調査が期待されている。しかし、中流域のダム建設や下流域の圃場整備が計画されており、大きな環境改変に伴う魚類相の劣化が予想される。大戸川における魚類相の記録は散発的な標本や暗黙知に留まっており、大きく環境改変された場合、保全に必要な基盤情報が存在しない。本研究では、標本採集と環境 DNA 分析を用いて大戸川流域内の詳細な魚類相を明らかにし、保全案を提案する。

2. 方法**2. 1. 調査地**

大戸川本流の大戸川および支流の天神川、萱尾川、吉祥寺川、田代川、馬門川、隼人川、信楽川、中手川、小山川、滝川、周辺の農業用水路網を含む大戸川流域 98 地点を対象に野外調査および環境 DNA 分析に供する水サンプルの採水を行った。以下に調査の詳細を記す。

2. 2. 野外標本採集

2023 年 4 月 2 日から 11 月 26 日の期間に、本流の大戸川および支流の天神川、萱尾川、吉祥寺川、田代川、馬門川、隼人川、信楽川、中手川、小山川、滝川、周辺の農業用水路網を含む大戸川流域 61 地点を対象に魚類の採集を行った。採集は 2 名から 4 名の調査員によって行われ、たも網を中心に適宜投網を併用して原則として 1 地点 1 時間以上の採集を行い、一部の調査は夜間に行われた。そのほか、採集されなかったものの目視にて確認された種は種名を記録した。また、一部の地点においては複数回調査を行った。

採集された魚類はオイゲノールを用いて麻酔し、同定後に個体数を記録した。また、現地で同定不可能だった個体については可能な限り下位の分類群まで同定し、記録した。さらに、右腹鰭の一部を切除し、99%エタノールに液浸して DNA サンプルとした。

その他、各地点、各魚種 3 個体程度を 10%ホルマリン溶液に液浸して固定し、標本として持ち帰った。標本はその後 70%エタノールに置換し、滋賀県立琵琶湖博物館に移管する予定である。

2. 3 環境 DNA 分析**2. 3. 1 採水・濾過**

2023 年 11 月 19、27、28 日の 3 日間に、本流の大戸川および支流の天神川、萱尾川、吉祥寺川、田代川、馬門川、隼人川、信楽川、中手川、小山川、滝川、周辺の農業用水路網を含む大戸川流域 72 地点を対象に環境 DNA 分析に供する水試料の採水を行った。各地点使い捨ての採水カップを用いて、各地点の岸際の表流水 500ml を採水し、採水ボトルに

保管した。その後、現地にて速やかに採水ボトルの水を 47 μ m 孔径のガラスファイバーフィルター(1825-047,GE,Healthcare,Buckinghamshire,UK)を用いて全量濾過した。濾過を行ったフィルターは残渣面を内側として半分に折り、アルミホイルで包んだのち保冷材で氷冷し実験室に持ち帰り、 -20°C の冷凍庫で保管した。また、採水時の汚染を確認するため、各採水日、10 地点ごとにネガティブコントロールとして超純水 500ml を環境水と同様の手順で濾過し、保管した。

2. 3. 2. DNA 抽出

DNA 抽出は濾過後 1 か月以内に行った。次にあげる試薬のうち、超純水、TE Buffer を除き DNeasy Blood&Tissue Kit (QIAGEN, Hiden, Germany) に付属している試薬を用いた。

シリカゲル膜を除去したスピнкаラム (SD5005, Bio basic inc, Markham Ontario, Canada) に残渣面が内側になるように筒状に丸めたフィルターを挿入し、フィルター内の余分な水分を除去するため $6000 \times g$ で 1 分間遠心分離を行った。1 サンプル当たり Buffer ATL 270 μ l、ProteinaseK 30 μ l を混合した試薬をカラム中のフィルターにまんべんなく浸透するように添加し、 56°C で 30 分間インキュベートを行った。インキュベート後、 $6000 \times g$ で 1 分間遠心分離を行った。遠心分離後、フィルターに残った DNA を抽出するため各サンプルに TE buffer を 200 μ l ずつ添加し、1 分間静置した後 $6000 \times g$ で 1 分間の遠心分離を行った。その後、スピнкаラム上部を除去し、スピнкаラム下部のコレクションチューブにそれぞれ Buffer AL および 100%エタノールをそれぞれ 500 μ l 添加した。各サンプルを混和後に DNeasy のカラムへ全量を移し、 $6000 \times g$ で 1 分間の遠心を行った。カラムを新しいコレクションチューブにませ換え、Buffer AW1 を 500 μ l 添加し $6000 \times g$ で 1 分間の遠心を行った。上部のカラムを新しいコレクションチューブにませ換え、Buffer AW2 を 500 μ l 添加し、 $20300 \times g$ で 2 分間の遠心を行った。上部のカラムを DNA LoBind チューブへませ換え、Buffer AE を 200 μ l 添加し、1 分間静置した後 $6000 \times g$ で 1 分間の遠心を行った。上部のカラムを廃棄し、DNA LoBind チューブ中に溜まった抽出物を -20°C で保管した。

2. 3. 3. ライブラリ調整

ライブラリ調整では 2 段階の PCR によって行った。

第一段階では、ミトコンドリア 12SrRNA 遺伝子の断片を Mifish-U-6N-F および Mifish-U-6N-R (Miya et al. 2015) を用いて増幅させた。PCR 試薬として Platinum SuperFi II Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた。1stPCR は 5 $\times$ SuperFi II Buffer を 2.4 μ l、dNTP を 0.24 μ l、2 $\times$ Platinum SuperFi II DNA Polymerase を 0.24 μ l、Mifish-U-6N-F,R (どちらも 5 μ M) をそれぞれ 1.2 μ l、10 倍に希釈した各地点の DNA テンプレート 2 μ l、および超純水を含む反応総量 12 μ l で行った。なお、予備実験段階で原液においては増幅の確認できなかった地点が確認された。これは PCR 阻害物質によるものであると考え、本実験では抽出物を 10 倍希釈したものを用いた。また、PCR

時の汚染を確認するため、DNA テンプレートの代わりに超純水 2 μ l を添加した PCR ネガティブコントロールを PCR 実験ごとに作成した。PCR の温度条件は 98°C30 秒 (初期変性) を行い、98°C10 秒 (変性)、60°C10 秒 (アニーリング)、72°C30 秒 (伸長) を 40 サイクル行い、最後に 72°C で 5 分 (最終伸長) を行った。反応には SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, CA, USA) を用いた。それぞれのサンプルを 8 反復で増幅し、各プレートには DNA テンプレートの代わりに超純水を加えたネガティブコントロールを同様に 8 反復加えた。その後、プライマーダイマーおよび dNTP を除去するため、1stPCR 産物の精製を行った。各 PCR 複製物を 8 繰り返しから 5 μ l ずつ集約し、超純水 3.6 μ l、Exosap-IT (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) 0.4 μ l を添加し、SimpliAmp Thermal Cycler を用いて 37°C15 分、80°C15 分の温度条件で反応した。

第 2 段階では、1stPCR 産物を鋳型とし、末端に各サンプルを識別するためのインデックス配列 (Hamady et al.2008) を付加した。2ndPCR は 5 $\times$ SuperFi II Buffer を 2.4 μ l、dNTP を 0.24 μ l、2 $\times$ Platinum SuperFi II DNA Polymerase を 0.24 μ l、超純水 4.72 μ l からなる Mix3.8 μ l および DNA テンプレートを 1 μ l、インデックスプライマーをそれぞれ 1.2 μ l を含む反応総量 11 μ l で行った。PCR の温度条件は 95°C3 分 (初期変性) を行い、98°C10 秒 (変性)、60°C10 秒 (アニーリング)、72°C30 秒 (伸長) を 10 サイクル行い、最後に 72°C で 5 分 (最終伸長) を行った。最後に、各 2ndPCR 産物の増幅確認を電気泳動で行った。

シーケンスを行う前に、2ndPCR 産物の増幅が乏しかった 8,48,50 地点を 4 μ l、ネガティブコントロールを 8 μ l その他の地点を 2 μ l の量で混合した。混合したサンプルを Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いて精製した。サンプル 1 μ l あたり AMPureXP 0.8 μ l を混合し、その後キットの説明書に従って作業を行った。その後、精製したサンプル 27 μ l を E-Gel SizeSelect (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) にアプライし、標的のバンド (370 bp) を回収した。次いで、Qubit dsDNA HS assay kit and a Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて、DNA 濃度を測定した。最後に、精製した DNA の質を確認するために Qsep1 (Bioptic) を用いた。分析機器の 8-well Sample Tray に 200 μ l 蓋無しチューブを入れ、トレーの奥のチューブから順にそれぞれ Separation Buffer 200 μ l、超純水 50 μ l、超純水 200 μ l、Alognment Marker 20 μ l、残りのチューブに DNA サンプル 2 μ l と Dilution Buffer 18 μ l を添加した。カートリッジを付属のピンを突き刺し、キャピラリー部分をキムワイプでふき取った後、機器に挿入した。ソフト内の設定を操作し分析を実行した後、結果から励起した部分が対象の DNA の増幅長であるか、対象の増幅長以外に励起している部分がないかを確認し、DNA 濃度の結果と総合的に判断し、最終的なシーケンシングに用いるサンプルを決定した。

2. 3. 4. シーケンシング

シーケンシングは Illumina Miseq を用いて行った。カートリッジは Miseq 試薬マイクロキット v2、300 サイクルを使用した。DNA を編成するため、終濃度 0.2 M の NaOH を調整し、pH 試験紙を用いて pH > 13 であることを確認した。その後、DNA ライブラリ 20

μl 、0.2 M NaOH 20 μl を添加し攪拌後、遠心分離を行った。その後、室温で 5 分間静置し、200 mM Tris-HCl を 20 μl 、HyB Buffer を 940 μl 添加した。次に、シーケンシング時の蛍光にばらつきを与えるため、PhiX を追加した。10 mM PhiX 2 μl に超純水 3 μl を加え、0.2 M NaOH 5 μl を添加した。その後、攪拌、遠心分離を行い、5 分間室温で静置した。静置後、HyB Buffer を 990 μl 添加し、終濃度 20 pM に調整した。ライブラリの最終調整として、20 pM PhiX 24 μl 、20 pM DNA ライブラリ 216 μl 、HyB Buffer 360 μl で調整し、10% PhiX、終濃度 6 pM ライブラリになるように調整した。その後、Miseq の設定を操作し、フローセルを洗浄した。カートリッジの 17 番ポートに穴をあけ、採集ライブラリを全量加え Miseq にセットし、シーケンシングを行った。

2. 3. 5. バイオインフォマティクス解析

バイオインフォマティクス解析は MitoFishPipeline(Zhu et al. 2023 ; Sato et al. 2018 ; Iwasaki et al.2013)を使用した。パイプラインでは、シーケンシングで得られた FASTQ ファイルのクオリティチェックおよび Tail trimming は fastp(Chen et al. 2018)を用いて行い、FLASH(Magoc et al. 2011)を用いてペアエンド配列をマージした。プライマー配列の除去は Cutadapt(Martin 2011)を用いて行った。また、配列のデノイジングおよびキメラ配列の除去、OTU の決定は USERCH(Edger 2010)を用いて行った。得られた OTU 配列を閾値 0.98 で BLAST を行い、類似配列をまとめ、近隣結合法を用いて query 配列を含めた系統樹を作成した。

2. 3. 5. 同定精度の精査

得られた系統樹から、query 配列と同一クラスターに存在する配列名を手動で確認し、学名が統一されているか確認し、種判別を行った。

以下の種は系統樹の同一クラスター内に複数の学名が存在していたため、種レベルでの同定が困難であると判断し、属レベルに同定し、データを統合した。

キンギョ *Carassius auratus*、ギンブナ *C. langsdorfii*、フナ属の一種 *Carassius* sp.はフナ属 *Carassius* sp.に統合した。コイ *Cyprinus carpio*、コイ属の一種 *Cyprinus carpio haematopterus*、コイ属の一種 *Cyprinus megalophthalmus* はコイ属の一種 *Cyprinus* sp.に統合した。タモロコ *Gnathopogon elongatus elongatus* はタモロコ属の一種 *Gnathopogon* sp.に同定した。ニゴイ *Hemibarbus barbus*、ニゴイ属の一種 *Hemibarbus umbrifer* はニゴイ属の一種 *Hemibarbus* sp.として統合した。クロヨシノボリ *Rhinogobius brunneus*、シマヨシノボリ *Rhinogobius nagoyae*、オウミヨシノボリ *Rhinogobius* sp. OM はヨシノボリ属 *Rhinogobius* sp.に統合した。

以下の種は同一クラスター内に複数の学名が存在していたため、樹形図から妥当性を判断した。

モツゴ *Pseudorasbora parva* およびモツゴ属の一種 *Pseudorasbora interrupta* は同一クラスター内に確認された。モツゴ属の一種である *Pseudorasbora interrupta* は中国原産であり、日本における定着記録はない。そのため、両種はモツゴ *Pseudorasbora parva* として統合し

た。カマツカ属の一種 *Pseudogobio guilinensis* はスゴモロコ種群 *Squalidus* spp. と同一クラスターから確認されたことから、誤同定であるとしてスゴモロコ属の一種 *Squalidus* sp. として扱った。タイワンマス *Oncorhynchus masou formosanus* はタイヘイヨウサケ属種群 *Oncorhynchus* spp. と同一クラスターに確認された。タイワンマスが確認された地点では同所的にアマゴ *Oncorhynchus masou ishikawae* が採捕されていることから、この配列はアマゴとして扱った。オオクチバス *Micropterus salmoides* およびフロリダバス *Micropterus floridanus* は、琵琶湖水系において両種は交雑していることが知られており (Yokogawa et al. 2005)、ミトコンドリア領域において両種の区別は困難であることからオオクチバス類 *Micropterus* sp. として扱った。

また、そのほかコウライカワムツ *Nipponocypris koreanus* およびハス *Opsariichthys uncirostris* はリード数が 100 未満であったため、内藤ほか (2020) を参考に解析から除外した。

3. 結果

3. 1. 標本採集の結果

野外調査による採集の結果、62 地点において 33 種の魚類が採集され、それぞれの地点において採集された魚種は 1 から 13 種であった。

3. 2. 環境 DNA 分析の結果

環境 DNA 分析の結果、72 サンプル、8 採水 NC、4PCR-NC を含む計 84 ライブラリのシーケンスより、合計 3026764 のリード数が得られた。計 72 地点において、同定結果を精査した結果、31 分類群が検出され、それぞれの地点で検出された分類群は 3 から 17 分類群であった。

3. 2. 両手法による結果

野外調査および環境 DNA 分析の結果を集計すると、計 98 地点において 38 分類群が確認された。それぞれの地点において確認された魚種は 2 から 20 種であった。確認された種の中には環境省レッドデータブック (環境省 2014) における絶滅危惧 I A 類 (CR) 1 種 (ホンモロコ)、絶滅危惧 I B 類 (EN) 1 種 (オオガタスジシマドジョウ)、絶滅危惧 II 類 (VU) 3 種 (ミナミメダカ、アカザ、スナヤツメ)、準絶滅危惧 (NT) 4 種 (ヤリタナゴ、アブラボテ、シマヒレヨシノボリ、アマゴ)、滋賀県レッドデータブック (滋賀県生き物総合調査委員会 2021) における絶滅危惧種 2 種 (ギギ、オオガタスジシマドジョウ)、絶滅危惧増大種 6 種 (ホンモロコ、ナガレカマツカ、アブラボテ、ヤリタナゴ、ミナミメダカ、スナヤツメ属)、希少種 3 種 (モツゴ、ムギツク、アカザ)、要注目種 7 種 (タカハヤ、ドジョウ、オオシマドジョウ、ニシシマドジョウ、カワヨシノボリ、マナマズ、アマゴ)、分布上重要種 2 種 (ヌマムツ、アユ)、その他重要種 1 種 (ドンコ) が含まれていた。また、国外外来種は 4 種 (オオクチバス類、ブルーギル、カムルチー、ニジマス) が確認された。なお、ヤリタナゴ、アブラボテ、ニシシマドジョウを除くシマドジョウ種群およびシマヒレヨシノボリについては保全上の観点から確認地点の公表はしない (Table.1)。

4. 考察

4. 1. 大戸川水系における保全に留意すべき種および保全策の提言

本調査で確認された 38 分類群のうち、環境省レッドデータブック（環境省 2014）における絶滅危惧ⅠA類(CR) 1 種、絶滅危惧ⅠB類(EN)1 種、絶滅危惧Ⅱ類(VU)3 種、準絶滅危惧(NT)4 種、滋賀県レッドデータブック（滋賀県生き物総合調査委員会 2021）における絶滅危惧種 2 種、絶滅危惧増大種 6 種、希少種 3 種、要注目種 7 種、分布上重要種 2 種、その他重要種 1 種が含まれていた。その中でも、保全に留意すべき種として、シマドジョウ種群、ヤリタナゴ、アブラボテ、シマヒレヨシノボリ、ミナミメダカ、ギギ、スナヤツメが挙げられる。

シマドジョウ種群は本調査においてオオシマドジョウ、ニシシマドジョウ、オオガタスジシマドジョウの 3 種が確認された。シマドジョウ種群は生活史において、産卵時に河川や水路からの恒久的水域から氾濫後に形成される一時的水域の泥底で産卵する氾濫原依存の生活史を持つことが知られている。そのため、産卵においては、一時的水域の形成および恒久的水域と一時的水域の連続性が重要な要素となってくる。そのため、ダムによる高度な水位管理や河道の直線化により、水位の変動が小さくなることで一時的水域の形成が妨げられた場合、産卵環境が消失することが指摘されている（中島 2017）。一方で、農業用水路や水田は一時的水域の代償的な湿地として機能していることが知られており（守山 1997, 遊磨 2013, 金尾 2020）、河川本流と農業用水路、水田との連続性を維持することによって本種群をはじめとした氾濫原依存性の魚類の保全につながる可能性が大きく期待される。

ヤリタナゴは大戸川流域の農業用水路、アブラボテは大戸川流域の農業用水路および河川本流において確認された。両種はイシガイ類に卵を産み付ける習性があり、その生活史においてイシガイ類の生息が必須である（中村 1969）。大戸川流域におけるイシガイ類の分布は局限しており、両種の稚魚の個体数が多く見られた 2 地点のうち、イシガイ類の一種であるササノハガイの生貝が確認された地点は 1 地点のみであり、そのほかの地点においてはイシガイ類の生貝は確認されなかった。また、ササノハガイの生貝が見られた地点においても、死貝の割合が多く、生貝は数個体のみの確認にとどまった。また、同地点においては過去にカネヒラが採取されたという聞き取りがあったものの、今回の調査においては野外調査および環境 DNA 分析のいずれの手法においても確認することはできなかった。また、大戸川流域の過去の調査においては、生活史において同様にイシガイ類を利用するビワヒガイが確認されている（大津市市民部住みよい環境課 1994）ものの、今回の調査においてはカネヒラと同様に確認されなかった。これらの種の生活史に関わるイシガイ類の生息環境の保全は急務であるといえる。

シマヒレヨシノボリは大戸川流域の農業用水路から採取された。本種は滋賀県内の分布は局地的とされているものの、大戸川周辺地域のため池で採集された記録があり、琵琶湖・淀川水系における他のヨシノボリ属魚類との種間関係を明らかにする上でも興味深い

集団であるとされている。そのため、保全に向けた本種の分布の実態把握が望まれている（尾崎ほか 2021）。本調査において、ため池以外の農業用水路においても新たに生息が確認され、本種の生息場所として農業用水路が利用されている可能性が示唆された。

ミナミメダカは農業用水路および河川本流に一時的に形成されたたまりにおいて、下流から中流の広い範囲に比較的個体数が多く確認された。生息個体数は危機的である水準ではないといえる。一方で、近年本種は野外に放流された人工改良品種との交雑による遺伝的多様性の低下が懸念されている（北川 2018）。筆者は本調査中、大戸川本流において人工改良品種と思われる個体を目視で確認しており、大戸川においても人工改良品種との交雑が起こっている可能性が考えられる。交雑による遺伝子浸透は不可逆的であり、その対策は急務であるといえる。人工改良品種の野外への意図的、非意図的放流を防止するための普及啓発が必要である。

スナヤツメは下流域の河川本流 1 地点のみで採集された。本種は湧水のある河川の砂泥中に潜って生息することが知られている。大戸川下流域周辺には天井川が多く存在し、湧水が豊富に存在する。大戸川本流における湧水の分布は不明であるが、本種の保全を考えると湧水の存在に留意する必要がある。

また、大戸川流域の検出種数を可視化すると、下流域の田上地域から瀬田川流入部における河川本流および農業用水路は特に種数が多く、多様な魚類相が形成されているといえる（Fig.2）。その魚類相の形成要因として、周辺水路には素掘りの形状を持った水路が多く現存しており、一部は霞提などを通じて河川本流との連続性も保たれていることが考えられる。素掘りの水路は底質や流速、水深の多様度が高く、両際には抽水植物が形成される。このような変化に富んだ水路では魚類の生息種数が多いことが知られている（e.g. Ohira et al. 2015 ; Katano et al.2003）。また、上述のとおり、大戸川には生活史段階によって、河川本流のような恒久的水域と水路・水田のような一時的水域の両方を利用する魚類が生息しており、水路ネットワークと本流の連続性は個々の魚類が生活史を全うするうえで重要である（中野 2017）。これらのことから大戸川下流域における農業用水路は魚類にとって好適な生息場所として機能しているといえる。一方で、一部の水路では冬季に通水が無くなる一時的水路となっていることや、3 面コンクリートに改修される水路が確認された。一時的水路においては、水路中に一部存在した深みにおいて魚類の越冬を確認しており、置き石などを使って鳥類の捕食の効果を低減できる 30cm 以上の深み（皆川ほか 2010）を形成することで干出による生息地の消失リスクを低減できることが期待できる。3 面コンクリート工法の場合、水路構造の単調化が問題点としてあげられる。生物多様性を保つための水路改修工法として、鬼倉ほか（2020）は木柵や空石積を用いた多孔質構造の護岸を提案している。また、3 面コンクリートの水路においては、木板やコンクリート縁石を水路内に設置することにより下流からの土砂を捕捉し、堆積させることにより、イシガイなどの底生生物や水生植物の生息を可能にする小さな自然再生を提案している。いずれにおいても、地域住民の理解を得たうえで、上記のような手法を提案することが必要

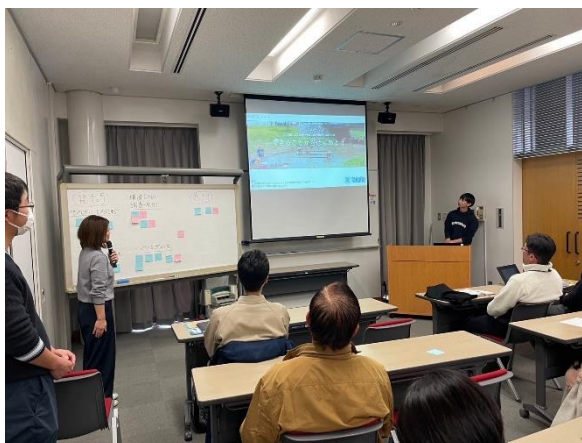
である。

5. 今後の展望

本調査において、形態が非常に酷似している、または未成魚であるなどの理由により形態による同定が困難である種が複数存在している。本調査においては、それらの種はDNAサンプルとして右腹鰭を保管しているため、今後はこれらの種の分子学的同定を実施し、より正確な魚類の分布を把握する。また、本調査で得られた魚類相の分布情報は地元環境団体や流域の大学に提供し、今後の環境教育教材として活用していく予定である。また、今後本流域において大きな環境変化が起こりうる場合は、本調査で得られた魚類相の分布状況をもとに保全策の提言を行っていく予定である。

6. 活動報告

今回の研究成果をもとに以下の活動を実施したのでここに報告する。



2024年3月11日

近畿地方整備局琵琶湖河川事務所主催の琵琶湖河川ゼミナールにて大戸川の生物多様性について講演を行った。琵琶湖河川事務所・大戸川ダム工事事務所の職員及び関係者および地元ボランティア団体、市民を対象に行われた講演で、大戸川の魚類相の紹介と保全の在り方について意見交換を行った。

7. 謝辞

本研究にご協力いただいた皆様に深く感謝申し上げます。龍谷大学の太下蓮氏、田邑龍氏、出口太一氏、森陽太郎氏、安田朝香氏、田中香帆氏、宮脇盛氏、江尻龍星氏、鈴木遼氏、慈眼氏、山崎大颯氏、伊藤玄氏、滋賀県立大学の泉野珠穂氏、井上祐貴氏には調査にご同行いただきました。龍谷大学生物多様性科学研究センターの山中裕樹氏、朝見麻希氏、後藤祐子氏には環境DNA分析について貴重なアドバイスをいただきました。滋賀県立琵琶湖博物館の川瀬成吾氏には報告書の執筆に際し貴重なアドバイスをいただきました。守山市環境政策課の武田みゆき氏には講演に際し、適切な助言をいただきました。この場を借りてお礼を申し上げます。

8. 図表

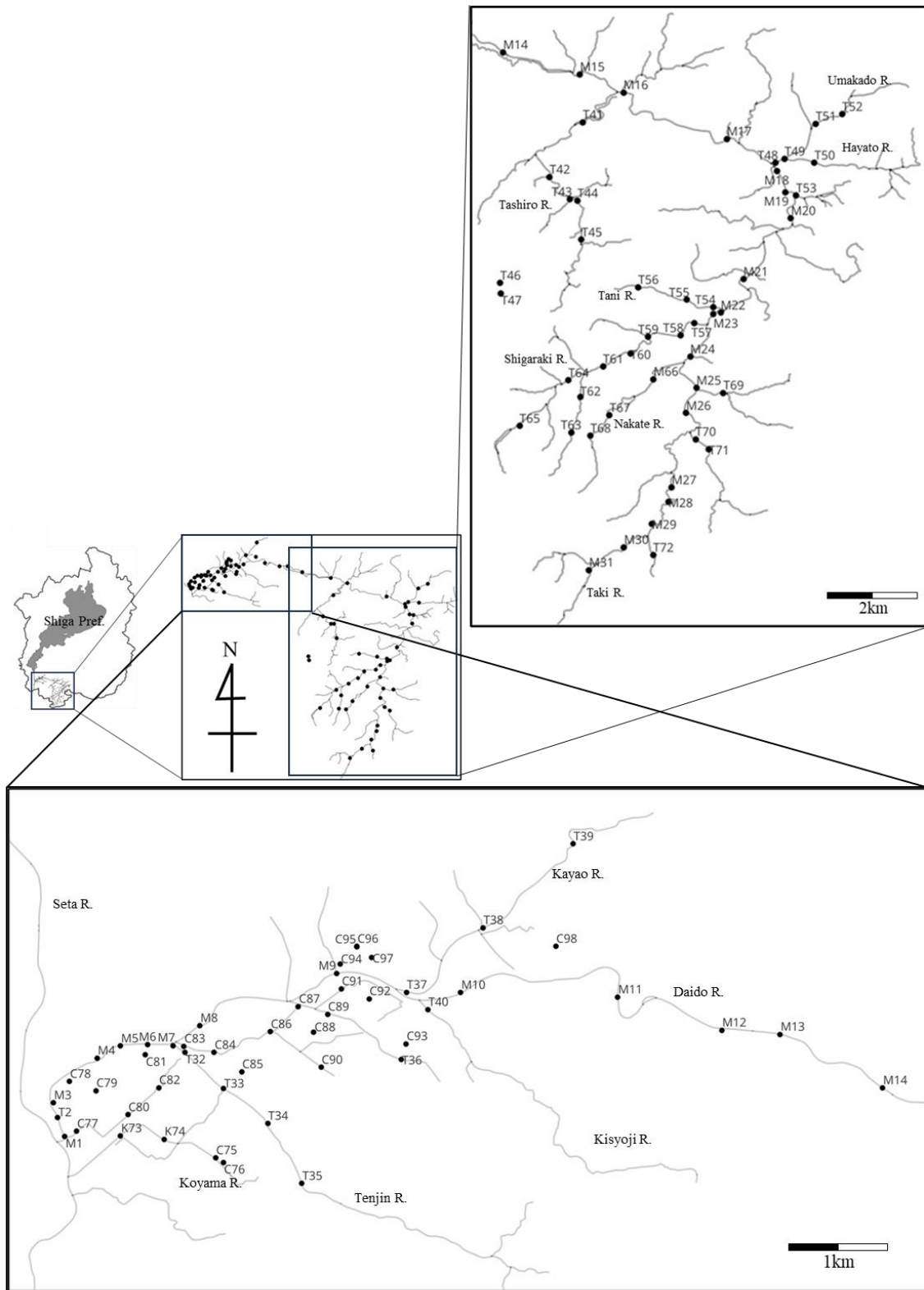


図. 1. A-B 大戸川水系の位置および調査地点 地点名の頭文字は M は大戸川本流 (Main stream)、T は支流 (Tributary)、C は農業用水路 (Canal) を表す。

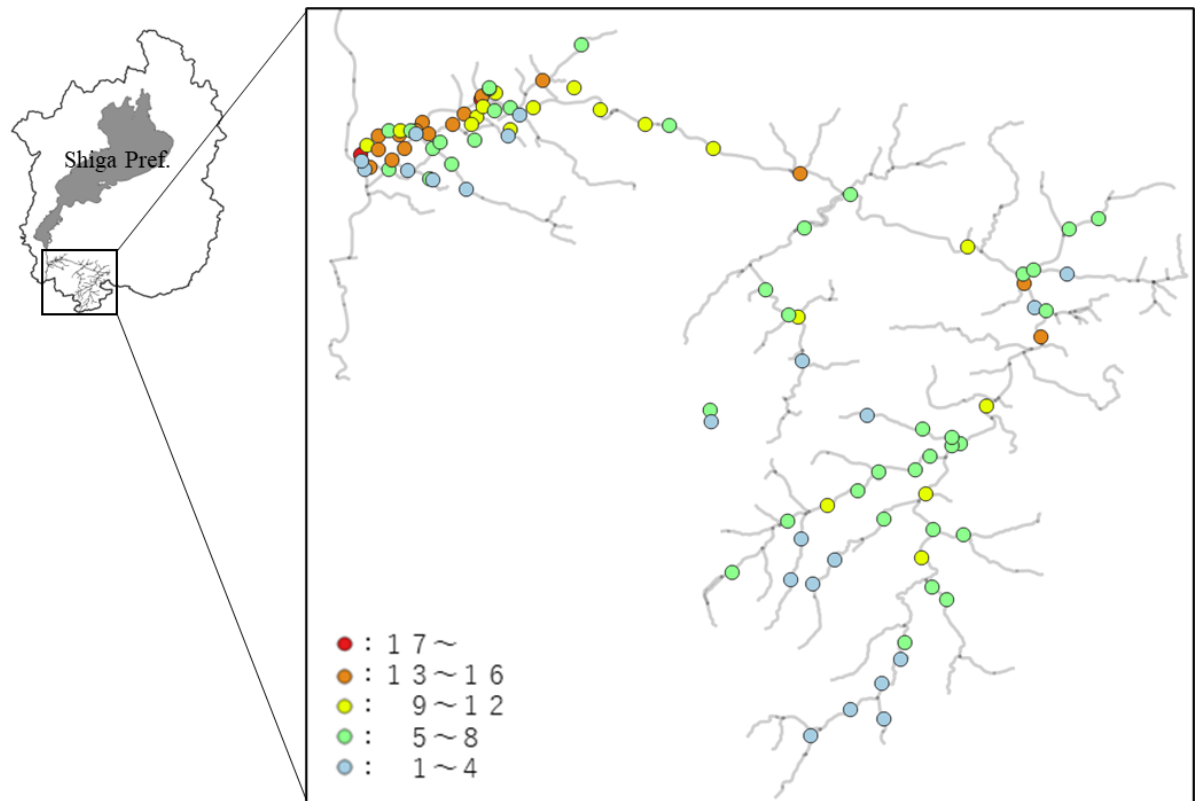


図.2. 各調査地点において環境 DNA および野外調査において確認された魚類の種数
 円の色は各地点の種数を示す(水色：1 から 4 種、黄緑：5 ～8 種、黄色：9 から 12 種、
 オレンジ：13 から 16 種、赤：17 種以上)

表. 1 大戸川において確認された魚類

各記号は環境DNA(eDNA；○)、野外調査(Traditional Field Survey；TFS；●)、目視 (△) およびそのいずれか複数の手法 (環境DNAおよび目視；○△、野外調査および環境DNA；○●) で確認されたことを示す。

Japanese name	Scientific name	環境省RDB	遼賀県RDB	Site method	Number of Species	SLM1 TFS	SLM1 TFS	SLM2 TFS	SLM2 eDNA	SLM11 eDNA	SLM12 eDNA	SLM13 TFS	SLM14 eDNA	SLM15 eDNA	SLM16 eDNA	SLM17 eDNA	SLM18 Both	SLM18 TFS	SLM19 TFS	SLM20 Both	SLM21 eDNA	SLM22 Both	SLM23 eDNA	SLM24 eDNA	SLM25 eDNA
フナ属	<i>Carassius</i> sp.				○																				
コイ属	<i>Cyprinus</i> sp.				○					○							○				○				
ニゴイ属	<i>Hemibarbus</i> sp.				○					○							○				○				
オイカワ	<i>Opsariichthys platypus</i>				○	●				○		●					△		●		○				
カワムツ属稚魚	<i>Candidia</i> sp.				○					○							○				○				
スサムツ	<i>Candidia sieboldii</i>				○	●				○							○				○				
カワムツ	<i>Candidia temminckii</i>				○					○							○				○				
ホンモロコ	<i>Gnathopogon caeruleus</i>				○					○							○				○				
タモロコ	<i>Gnathopogon elongatus</i>				○					○							○				○				
タモロコ属	<i>Gnathopogon</i> sp.				○					○							○				○				
カマツカ属	<i>Pseudogobio</i> sp.				○					○							○				○				
カマツカ	<i>Pseudogobio esochinus</i>				○	●				○		●					○		●		○				
ナガラレカマツカ	<i>Pseudogobio agathonectris</i>				○					○		○					○		○		○				
モツゴ	<i>Pseudorasbora parva</i>				○					○		○					○		○		○				
タカハヤ	<i>Phoxinus oxycephalus</i>				○					○							○				○				
ムギツク	<i>Pungtungia herzi</i>				○					○		●					○				○				
ヤリタナゴ	<i>Tanakia lanceolata</i>				○					○							○				○				
アブラボテ	<i>Tanakia limbata</i>				○					○		○					○				○				
オオシマドジョウ	<i>Cobitis</i> sp. BIWAE type A				○					○							○				○				
オオガタスシマドジョウ	<i>Cobitis magnostriata</i>				○					○							○				○				
シマドジョウ属	<i>Cobitis</i> sp.				○					○							○				○				
ニシシマドジョウ	<i>Cobitis</i> sp. BIWAE type B				○					○							○				○				
マドジョウ	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>				○					○							○				○				
ウキゴリ	<i>Gymnogobius urotaenia</i>				○					○							○				○				
トンコ	<i>Odontobutis obscura</i>				○					○							○				○				
カワヨシノボリ	<i>Rhinegobius flumineus</i>				○					○		●					○				○				
トウヨシノボリ	<i>Rhinegobius</i> sp. OR				○					○							○				○				
シマヒレヨシノボリ	<i>Rhinegobius tyoni</i>				○					○							○				○				
オウミヨシノボリ	<i>Rhinegobius</i> sp. OM				○					○							○				○				
ヨシノボリ属	<i>Rhinegobius</i> sp.				○					○							○				○				
ミナミメダカ	<i>Oryzias latipes</i>				○					○							○				○				
マナマス	<i>Silurus asotus</i>				○					○							○				○				
キギ	<i>Tachysurus nudiceps</i>				○					○							○				○				
アカザ	<i>Liobagrus reinii</i>				○					○							○				○				
アユ	<i>Plecoglossus altivelis</i>				○					○							○				○				
アマゴ	<i>Oncorhynchus masou ishikawae</i>				○					○		●					○				○				
スナヤツメ	<i>Lethenteron reissneri</i>				○					○							○				○				
オオクチバス類	<i>Micropterus</i> sp.				○					○							○				○				
ブルーギル	<i>Lepomis macrochirus</i>				○					○							○				○				
カムルチー	<i>Channa argus kimurai</i>				○					○							○				○				
ニジマス	<i>Oncorhynchus mykiss</i>				○					○							○				○				

表. 1 続ぎ

Japanese name	Scientific name	環境省 RDB	滋賀県 RDB	Site method	Number of Species																St.C7								
					St.T51	St.T52	St.T53	St.T54	St.T55	St.T56	St.T57	St.T58	St.T59	St.T60	St.T61	St.T62	St.T63	St.T64	St.T65	St.T66	St.T67	St.T68	St.T69	St.T70	St.T71	St.T72	St.K73	St.K74	St.C7
					Both	TFS	TFS	TFS	eDNA	eDNA	eDNA	eDNA	TFS	eDNA	Both	eDNA	Both	eDNA	Both	TFS	eDNA	Both	TFS	eDNA	Both	TFS	eDNA	Both	TFS
フナ属	<i>Carassius</i> sp.								○							○													
コイ属	<i>Cyprinus</i> sp.					●			○						○														
ニゴイ属	<i>Hemibarbus</i> sp.																												
オイカワ	<i>Opsarichthys platypus</i>							●		○																			
カワムツ属鯉魚	<i>Candidia</i> sp.																												
ヌマムツ	<i>Candidia sieboldii</i>														○													●	
カワムツ	<i>Candidia temminckii</i>														○													●	
ハンモロコ	<i>Gnathopogon caeruleus</i>								○						○												○		
タモロコ	<i>Gnathopogon elongatus</i>														○												○		
タモロコ属	<i>Gnathopogon</i> sp.																												
カマツカ属	<i>Pseudogobio</i> sp.																												
カマツカ	<i>Pseudogobio esochus</i>																												
ナガレカマツカ	<i>Pseudogobio agathonecris</i>																											○	
モロゴ	<i>Pseudorasbora parva</i>					●																							
タカハヤ	<i>Phoxinus oxycephalus</i>					○			○																				
ムギツク	<i>Pungtungia herzi</i>																												
ヤリタナゴ	<i>Tanakia lanceolata</i>	NT																											
アブラボテ	<i>Tanakia limbata</i>	NT																											
オオシマドジョウ	<i>Cobitis</i> sp. BINA type A	EN																											
オオガタスジシマドジョウ	<i>Cobitis magnostriata</i>																												
シマドジョウ属	<i>Cobitis</i> sp.																												
ニシシマドジョウ	<i>Cobitis</i> sp.BINA type B																												
マドジョウ	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>																											○	
ウキゴリ	<i>Gymnogobius uroaenia</i>																												
ドンコ	<i>Odontobutis obscura</i>																											●	
カワヨシノボリ	<i>Rhinogobius flumineus</i>																											○	
トウヨシノボリ	<i>Rhinogobius</i> sp. OR																											○	
シマヒレヨシノボリ	<i>Rhinogobius tyoni</i>																												
オウミヨシノボリ	<i>Rhinogobius</i> sp. OM																												
ヨシノボリ属	<i>Rhinogobius</i> sp.																												
ミナミメダカ	<i>Oryzias latipes</i>																												
マナマス	<i>Silurus asotus</i>																											○	
ギギ	<i>Tachysurus nudiceps</i>																												
アカザ	<i>Liobagrus reinii</i>																												
アユ	<i>Plecoglossus altivelis</i>																											○	
アマゴ	<i>Oncorhynchus masou ishikawae</i>																											○	
スナヤツメ	<i>Lethenteron reissneri</i>																												
オオクチハス類	<i>Micropterus</i> sp.																												
ブルーギル	<i>Lepomis macrochirus</i>																												
カムルチー	<i>Channa argus kimurai</i>																											●	
シマス	<i>Oncorhynchus mykiss</i>																												

9. 参考文献

- Shifu Chen, Yanqing Zhou, Yaru Chen, Jia Gu, (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor, *Bioinformatics*, Volume 34, Issue 17, Pages i884–i890, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Robert C. Edgar, (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST, *Bioinformatics*, Volume 26, Issue 19, Pages 2460–2461, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Hamady, M., Walker, J., Harris, J., Nicholas J Gold & Rob Knight . (2008). Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nat Methods* 5, 235–237 <https://doi.org/10.1038/nmeth.1184>
- Iwasaki W, Fukunaga T, Isagozawa R, Yamada K, Maeda Y, Satoh TP, Sado T, Mabuchi K, Takeshima H, Miya M, et al. (2013) . MitoFish and MitoAnnotator: a mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. *Mol Biol Evol* 30:2531-2540.
- 環境省 (編), 2014. レッドデータブック 2014 -日本の絶滅のおそれのある野生生物
- 金尾 滋史 (2020) 魚たちの様々な水田利用法.大塚 泰介・嶺田 拓也編.なぜ田んぼには多様な生き物がすむのか,104-126.京都大学学術出版会,京都.
- Katano O, Hosoya K, Iguchi K, Yamaguchi M, Aonuma Y, Kitano S (2003) Species diversity and abundance of freshwater fishes in irrigation ditches around rice fields. *Environmental Biology of Fishes*, 66:107-121
- 北川忠生. (2018). 第3の外来魚. 日本魚類学会 (編). 魚類額の百科事典, p.526–527. 丸善出版, 東京.
- Tanja Magoč, Steven L. Salzberg, (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies, *Bioinformatics*, Volume 27, Issue 21,Pages 2957–2963, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- MARTIN, Marcel. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, [S.l.], v. 17, n. 1, p. pp. 10-12, [doi:https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200](https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200).
- 皆川 明子, 高木 強治, 樽屋 啓之, 後藤 眞広 (2010) 非灌漑期の農業水路における魚類の移動と越冬. 農業農村工学会論文集, 78:369-376
- Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, et al. (2015) . MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R Soc Open Sci* 2:150088.
- 守山 弘 (1997) 水田を守るとはどういうことか. 農山漁村文化協会, 東京

- 中島淳. (2017). 日本産スジシマドジョウ類の現状とその保全の展望, 魚類学雑誌, 64(1) ; 69-76
- 中村 守純 (1969) 日本のコイ科魚類. 資源科学研究所, 東京
- 中野 光議 (2017) 農業用水路における魚類の保全生態学的研究 : 現状と課題. 保全生態学研究. 22:135-149
- Ohira M, Tsunoda H, Nishida K, Mitsuo Y, Senga Y (2015) Niche processes and conservation implications of fish community assembly in a rice irrigation system. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 25:322-335
- 鬼倉徳雄、中島淳、林博徳、西山穂. (2020). 『水田・水路でつなぐ生物多様性ポイントブック』. 公益財団法人世界自然保護基金ジャパン (編). 公益財団法人世界自然保護基金ジャパン, 東京.
- 大津市市民部住みよい環境課. (1994). 大津市『さかな』生息地図. URL : <https://www5.city.otsu.shiga.jp/kankyoku/files/FILE/0120030100/0/%E3%81%95%E3%81%8B%E3%81%AA%E7%94%9F%E6%81%AF%E5%9C%B0%E5%9B%B3.pdf> (オンライン, 参照 : 2024 年 6 月 29 日)
- 尾崎 友輔, 川瀬 成吾, 中山 耕至, (2021). 滋賀県琵琶湖水系から初記録のシマヒレヨシノボリ, *Ichthy, Natural History of Fishes of Japan*, 15 巻, p. 5-9
- Sato Y, Miya M, Fukunaga T, Sado T, Iwasaki W. (2018) . MitoFish and MiFish Pipeline: A Mitochondrial Genome Database of Fish with an Analysis Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding. *Mol Biol Evol* 35:1553-1555.
- 滋賀県生きもの総合調査委員会 (2021) 滋賀県で大切にすべき野生生物-滋賀県レッドデータブック 2020 年版-. 滋賀県自然環境保全課, 大津
- 横川 浩治、中井 克樹、藤田 建太郎. (2005). 近年の劇的遺伝子変動から推定される, 琵琶湖におけるフロリダバスの大規模な侵入. *水産増殖*, 53(2) ; pp.145-155.
- 遊磨正秀 (2013) 農業地帯の水系ネットワーク. (中村 太士 編) *河川生態学*, 206-215. 講談社, 東京
- Zhu T, Sato Y, Sado T, Miya M, and Iwasaki W. (2023) . MitoFish, MitoAnnotator, and MiFish Pipeline: Updates in ten years. *Mol Biol Evol*, 40:msad035. <https://doi.org/10.1093/molbev/msad035>