

環境 DNA 分析による宜野湾市大山のタイモ水田用水路の 魚類および十脚甲殻類相調査

An environmental DNA survey for fish and decapod crustacean fauna in the irrigation waterway of taro fields in Oyama, Ginowan, Okinawa, Japan

永井大翔¹・佐藤行人²・今井秀行^{3*}・梶田 忠⁴
Hiroto Nagai¹, Yukuto Sato², Hideyuki Imai^{3*}, Tadashi Kajita⁴

¹ 国立大学法人琉球大学大学院理工学研究科海洋環境学専攻

² 国立大学法人琉球大学医学部附属実験実習機器センター

³ 国立大学法人琉球大学理学部海洋自然科学科生物系

⁴ 国立大学法人琉球大学熱帯生物圏研究センター西表研究施設

¹Graduate School of Engineering and Science, University of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa 903-0213, Japan. ²Experimental Center, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa 903-0215, Japan. ³Laboratory of Marine Biology and Coral Reef Studies, Faculty of Science, University of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa 903-0213, Japan. ⁴Iriomote Station, Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus, Taketomi, Okinawa 907-1541, Japan.

*Corresponding author; e-mail: imai@sci.u-ryukyu.ac.jp, Tel: +81-98-895-8554; Fax: +81-98-895-8576.

Abstract

Environmental DNA (eDNA) analysis represents a sophisticated and non-invasive method for evaluating biodiversity. This study employed eDNA metabarcoding to investigate the diversity of fish and decapod crustaceans in the irrigation waterway of taro fields located in Oyama, Ginowan City, Okinawa, Japan. On November 6th, 2019, water samples were collected and filtered using 0.22 μm and 0.45 μm Sterivex filters. The eDNA was extracted and amplified using MiFish-U-F/R primers for fish and MiDeca-F/R primers for decapod crustaceans, followed by sequencing with an Illumina MiSeq platform. The analysis revealed no statistically significant differences in DNA detection efficiency between the two filter pore sizes. The fish community analysis identified 10 haplotypes across six families, including three species not previously recorded in the study area. For decapod crustaceans, 19 haplotypes were identified, with *Caridina typus* and *Macrobrachium lar* being the most prevalent. Notably, the detection of the invasive Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) was determined to be a false positive due to the MiDeca-F/R primers lacking the resolution to distinguish accurately between closely related *Eriocheir* species. These findings underscore the utility of eDNA metabarcoding in biodiversity monitoring, while also highlighting the necessity of iterative sampling and primer refinement to enhance the accuracy of species identification.

Key words: environmental DNA; MiFish-U-F/R; MiDeca-F/R; *Eriocheir*

緒言

環境 DNA (environmental DNA: eDNA) とは、生物が環境中に放出した DNA 断片のことを指す。これら DNA は、水、土壌、空気などの自然環境中に存在し、生物の細胞、糞便、体液などに由来することが知られており、eDNA サンプルを分析することで、特定の生物がその環境に存在するかどうかを検出することが可能である (Ficetola et al.

2008; Taberlet et al. 2012a)。従来の直接的な生物調査方法と比較して、eDNA 分析は非侵襲的であり、効率的かつ迅速に環境中の生物多様性を評価する手段として注目されている。しかし、eDNA 分析は従来の方法を必ずしも置き換えるのではなく、既存の方法と統合することでより大きな成果を上げることが期待されている (Bohmann et al. 2014; Thomsen and Willerslev 2015)。

eDNA 分析は比較的新しい技術であるが、急速に発展している。特に、次世代シーケンシング (NGS) 技術の導入により、大量の塩基配列データを迅速に取得し、解析することが可能となり、eDNA 分析の精度と信頼性が飛躍的に向上した (Shokralla et al. 2012; Taberlet et al. 2012b)。生物多様性の評価は、生態系の健康状態を理解し、保全計画を練る上で不可欠となる。eDNA 分析は、多種多様な生物の存在を迅速に検出する能力を持っており、環境から得られる DNA データを解析することで、特定の地域や生態系における生物多様性の現状を明らかにし、絶滅危惧種の存在確認や外来種の早期発見に有用とされている (Jerde et al. 2011; Thomsen et al. 2012)。

eDNA 分析は多くの利点を持つ一方で、いくつかの課題が存在し、これらの課題を克服することが eDNA 技術の信頼性と適用範囲の拡大に繋がると期待されている (Rees et al. 2014)。例えば、サンプル採集や増幅の過程でも、特定の DNA 断片を効率よく回収するための最適化が求められる (Goldberg et al. 2015; Roussel et al. 2015)。また、得られた塩基配列データを解析し、特定の生物種に対応付けるためには、大規模なデータベースが必要となる。しかし、現行のデータベースは完全ではなく、特定の生物種や地域の塩基配列データが不足していることがあり、誤った種の同定や不完全な結果が生じるリスクがある (Kvist 2013)。

沖縄県の中南部は、近年の都市計画により急速に市街地化が進み、特に計画の中心である西海岸地域 (宜野湾市・浦添市・那覇市) では行政区域の大部分が市街地化している。沖縄県宜野湾市大山は、戦前から水稻やタイモ (サトイモ科 Araceae) の生産地として知られており、戦後には海岸低地に広がる水田地帯でタイモが生産されている (小川 2000)。宜野湾市に広がる島尻層群は泥岩を多く含む保水性が高く、低地において、100 以上の湧水 (枯渇したものを含む) が水田地帯の形成と淡水生態系の維持に貢献してきた (上原 2000)。しかし近年では、宜野湾市の大規模な市街地化に伴う埋め立て計画により大山を残して水田地帯は消失し、また、現在唯一の水田地帯である大山

においても農業者の高齢化や後継者不足により放棄田が散在している (外間 2007)。このように、宜野湾市大山は、沖縄県西海岸地域に残された数少ない二次的自然環境といえる。

本研究では、沖縄県宜野湾市大山のタイモ水田用水路から得られた水サンプルをもとに、水圏生態系における重要な大型動物である魚類と十脚甲殻類を対象として、MiFish-U-F/R (Miya et al. 2015) および MiDeca-F/R (Komai et al. 2019) による NGS を用いた eDNA メタバーコーディング分析を応用し、魚類相と十脚甲殻類相について調査した。宜野湾市の淡水域からは、従来の直接的なモニタリング手法により、周縁性魚類を含む 3 目 11 科 25 種の魚類および 4 科 9 種の十脚甲殻類が報告されている (立原 2000; 諸喜田ら 2000)。調査地から得られた水サンプルを分析した結果、特定外来生物に指定されているチュウゴクモクズガニ *Eriocheir sinensis* と一致する塩基配列が検出された。しかし、沖縄県においてチュウゴクモクズガニを含む外国産モクズガニ類 *Eriocheir* spp. の定着は報告されていない (沖縄県 2024)。本研究では、チュウゴクモクズガニの DNA が検出された結果の妥当性を検証するために、モクズガニ類に対する MiDeca-F/R を用いた解析手法の有効性についても調査を行った。この調査は、解析手法の限界を明らかにし、eDNA 技術の信頼性と精度向上を目指すものである。本研究は、eDNA 分析と従来の調査報告を総合して、沖縄県宜野湾市大山のタイモ水田における生物多様性の現状を明らかにし、調査地の生態系保全に貢献することを目的とした。

材料および方法

eDNA 分析

2019 年 11 月 6 日に、沖縄県宜野湾市大山のタイモ水田用水路 (26.284813 N, 127.747795 E 付近) において水サンプルの採集を行った (Fig. 1)。ポアサイズ 0.22 μm および 0.45 μm の 2 種類の Strivex Filter (Millipore) をタイモ水田用水路の水を濾過するフィルターとして用いた。あらかじめ消毒したバケツを用いて、用水路から採水しバケ

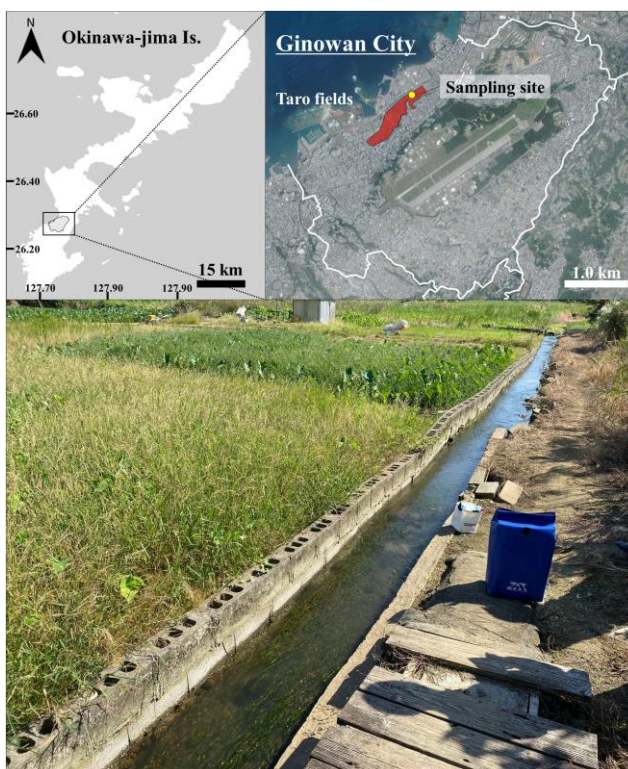


Fig. 1. Maps (top two) showing the sampling site (26.284813 N, 127.747795 E) in Oyama, Ginowan, Okinawa, Japan. Reddish areas indicate taro fields. Irrigation waterway (bottom) where water samples were collected.

ツ 1 杯あたり 60 ml の水をテルモシリンジ (TERMO, 50 ml) によって加圧濾過した。濾過はフィルターが詰まるまで繰り返し、最終的な濾過量は、ポアサイズ 0.22 μm のフィルターでは 720 ml、ポアサイズ 0.45 μm のフィルターでは 840 ml となった。採水および濾過は、手をアルコール消毒し、使い捨てゴム手袋を着用して行った。フィルターを交換する際には、使い捨てゴム手袋とシリンジを新たなものに交換した。濾過後、シリンジを用いてフィルター内の水分を排出し、フィルターを保冷した状態で琉球大学亜熱帯島嶼科学拠点研究棟の実験室へ持ち帰った。実験室では、フィルターから、Sato et al. (2022) と同様に DNeasy Power Water Sterivex kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。未使用フィルターおよび精製水を濾過したフィルターから同様に DNA の抽出を試み、ネガティブコントロールとした。抽出した eDNA サンプルをもとに、魚類を対象とし

て、ミトコンドリア 12S rRNA (12S) 遺伝子の一部を増幅する MiFish-U-F/R (Miya et al. 2015) を、十脚甲殻類を対象として、ミトコンドリア 16S rRNA (16S) 遺伝子の一部を増幅する MiDeca-F/R (Komai et al. 2019) をプライマーとして用いた Two-step tailed PCR を実施した。PCR 条件は Miya et al. (2015) と Komai et al. (2019) に従った。さらに MiDeca-F/R については、Komai et al. (2019) に従った手法 (standard method) と PCR 試薬を TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (Takara Bio) に変更した手法 (modified method) についても実施した。反応液組成は、10 × Ex Taq Buffer 1.0 μl 、dNTP Mixture 0.8 μl 、5 μM の MiDeca-F/R それぞれ 0.20 μl 、滅菌蒸留水 3.75 μl 、TaKaRa Ex Taq HS 0.05 μl 、鋳型 2.0 μl の全量 8.0 μl とした。増幅反応は、94 °C で 1 分間の初期変性後、94 °C で 1 分間の変性、51 °C で 1.5 分間のアニーリング、72 °C で 1.5 分間の伸長反応を 5 サイクル行い、さらにアニーリング温度を 55 °C に変更した 35 サイクル行った後、72 °C で 5 分間の最終伸長反応とした。全ての PCR 反応は、Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) により行い、2nd-round PCR の増幅産物の塩基配列は、MiSeq (Illumina) により決定した。得られた塩基配列は、Sato et al. (2022) と同様にハプロタイプごとに集計し、6 リード以上のハプロタイプについて国際塩基配列データベース (INSD : International Nucleotide Sequence Database) 上で照合し、相同性が 98 %以上を示す種を選択した (Tables 1, 2)。ツノナガヌマエビ *Caridina grandirostris* と *C. brevidactyla* (DQ478528) は、MiDeca-F/R の増幅領域において同一の塩基配列となるが、de Manzancourt et al. (2018) により *C. brevidactyla* (DQ478528) はツノナガヌマエビの誤同定であることが指摘されているため、ここではツノナガヌマエビとして扱った。ポアサイズや PCR 試薬の違いによる検出結果の差異を検証するため t 検定を実施した。統計解析は、R ver. 4.2.1 (R Core Team 2022)、RStudio 2023.12.1+402 (RStudio Team 2023)、R の stats パッケージ内の t.test 関数を使用して実行した。

Table 1. Read counts of 10 haplotypes (#01 to #10) detected using MiFish-U-F/R primers from water samples collected in the irrigation waterway of taro fields in Oyama, Ginowan, Okinawa, Japan, and their assigned fish species. NCS (negative control samples).

Haplotype	Species	Accession No.	0.22 μ m	0.45 μ m	Sum of reads	NCS
#01	<i>Anguilla marmorata</i>	LC458016	2334	1607	3941	0
#02	<i>Eleotris fusca</i>	LC496201	1003	446	1449	0
#03	<i>Giuris tolsoni</i>	LC458312	18	0	18	0
#04	<i>Kuhlia marginata</i>	LC552469	195	321	516	0
#05	<i>K. rupestris</i>	LC552468	34310	29146	63456	2
#06	<i>Poecilia reticulata</i>	AB898687	6	0	6	0
#07	<i>Rhinogobius similis</i>	LC733837	136	150	286	0
#08	<i>Rhinogobius</i> sp. 1	-	148	148	296	0
#09	<i>Rhinogobius</i> sp. 2	-	380	42	422	0
#10	<i>Tridentiger</i> sp.	-	0	20	20	0
Sum of reads			38530	31880	70410	2
Number of species			9	8	10	1

モクズガニ属 *genus Eriocheir* De Haan, 1835 の DNA バーコーディング解析

2022年4月に、沖縄県南城市玉城百名において、1個体のモクズガニ *E. japonica* (標本番号: NSMT-Cr-30828) を採集し、70%エタノールで固定した。得られた標本の第2歩脚の長節から筋肉片を切除し、Imai et al. (2004) に従って粗全DNAを抽出した。粗全DNAを鋳型として、1471 (5'-CCTGTTTANCAAAAACAT-3') と 1472 (5'-AGATAGAAACCAACCTGG-3') (Crandall and Fitzpatrick 1996) をプライマーとして用いたPCR反応により16S遺伝子の一部を増幅した。反応液は、Emerald Amp® PCR Master Mix (Takara) 12.5 μ l、25 pmol/ μ lの各プライマー1.0 μ l、鋳型DNA 3.0 μ l、滅菌蒸留水 7.5 μ lの全量 25.0 μ lとした。反応条件は、95°Cで3分間の変性後、95°Cで30秒間の変性、50°Cで30秒間のアニーリング、72°Cで1.5分間の伸長反応を30サイクル行い、最後に72°Cで7分間の伸長反応を加えた。PCR反応は、Simpli Amp Thermal Cycler (Applied Biosystems) により行った。得られた増幅産物はマクロジェン・ジャパン (東京) の塩基配列解析サービスを利用し、3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。また、1997年9月12日に静岡県静岡市清水区波多打川で採集されたモクズガニ1個体についても同様

に塩基配列を決定した。2023年10月20日時点でINSIDデータベース上に公開されていた3種のモクズガニ類 (モクズガニ、チュウゴクモクズガニ、*E. hepuensis*) の16S遺伝子42配列をダウンロードし、本研究で得られた沖縄県と静岡県のもクズガニの塩基配列とともに、合計44配列をNGPhylogeny.fr (<https://ngphylogeny.fr/>) のMAFFT (Kato and Standley 2013) によりアライメントし、MiDeca-F/Rによる増幅領域に対応する部分を切り出した。切り出した塩基配列からハプロタイプを決定し、ハプロタイプ間の塩基置換数を観察した。

結果

魚類を対象とするMiFish-U-F/Rを用いた分析では、ポアサイズ0.22 μ mのフィルターで濾過したサンプルから38,530リード9ハプロタイプ、ポアサイズ0.45 μ mのサンプルから31,880リード8ハプロタイプが検出された (Table 1)。また、十脚甲殻類を対象とするMiDeca-F/Rを用いた分析では、Komai et al. (2019) に従った standard method では、ポアサイズ0.22 μ mと0.45 μ mのサンプルからそれぞれ19,001リード14ハプロタイプ、18,066リード13ハプロタイプ、PCR試薬を変更した modified method では、8,399リード10ハプロタイプ、8,327リード15ハプロタイプが検

出された (Table 2)。2 種類のフィルター (ポアサイズ : 0.22 μm 、0.45 μm) に由来する魚類と十脚甲殻類の検出結果を比較するため、対応のある t 検定を実施した。その結果、リード数に統計的な有意差は認められなかった ($t(2)=1.237, p>0.05$)。リード数の平均値の差は 2548.333 であり、95 % 信頼区間は-6314.93 から 11411.60 であった。ハプロタイプ数についても、同様に統計的な有意差は認められなかった ($t(2)=-0.945, p>0.05$)。ハプロタイプ数の平均値の差は-1.667 であり、95 % 信頼区間は-9.256 から 5.922 であった。つまり、フィルターのポアサイズの違いは、タイモ水田用水路に生息する魚類と十脚甲殻類に由来する DNA の検出に影響を与えなかったことが示された。

MiDeca-F/R を用いた 2 通りの PCR 条件 (standard and modified methods) による十脚甲殻類の検出結果を比較するため、対応のある t 検定を実施した。その結果、リード数に統計的な有意差が認められた ($t(1)=23.57, p=0.027$)。リード数の平均値の差は 10170.5 であり、95 % 信頼区間は 4687.773 から 15653.227 であった。一方で、ハ

プロタイプ数については、統計的な有意差は認められなかった ($t(1)=0.333, P>0.05$)。ハプロタイプ数の平均値の差は 1 であり、95 % 信頼区間は -37.119 から 39.119 であった。つまり、standard method の PCR 条件において、より多くの十脚甲殻類の塩基配列が検出され、PCR 条件の設定がリード数の検出結果に重要な影響を与えることを示した。しかし、一部のハプロタイプ (#21、#23、#27) は、standard method の PCR 条件においては検出されていなかった。

MiFish-U-F/R と MiDeca-F/R を用いたネガティブコントロールで検出されたそれぞれ 2 種の塩基配列は、ともに 2 リードと極めて少なかった。

魚類相

合計 10 種類のハプロタイプ (#01-#10) が検出され、6 科 7 属 10 種に分類された (Table 1)。ただし、クロヨシノボリ *Rhinogobius brunneus*、ヤイマヒラヨシノボリ *R. yaima*、ケンムンヒラヨシノボリ *R. yonezawain* の 3 種、および、アヤヨシノボリ *Rhinogobius* sp. MO、アオバラヨシノボリ

Table 2. Read counts of 19 haplotypes (#11 to #29) detected using MiDeca-F/R primers from water samples collected from the irrigation waterway of taro fields in Oyama, Ginowan, Okinawa, Japan, and their assigned decapod crustacean species. NCS (negative control samples).

Haplotype	Species	Accession No.	Standard method		Modified method		Sum of reads	NCS
			0.22 μm	0.45 μm	0.22 μm	0.45 μm		
#11	<i>Caridina grandirostris</i>	MH497551	122	79	0	0	201	0
#12	<i>C. laoagensis</i>	LC719927	283	145	0	54	482	0
#13	<i>C. leucosticta</i>	MH497554	1067	255	677	35	2034	0
#14	<i>C. typus</i>	MN399191	229	0	0	69	298	0
#15		MN399192	572	380	253	183	1388	0
#16		MT303908	12369	13740	5681	5526	37316	0
#17		MT303909	221	28	0	21	270	0
#18	<i>Macrobrachium australe</i>	MT117770	378	528	252	134	1292	0
#19	<i>M. formosense</i>	ON754347	0	91	276	270	637	0
#20	<i>M. japonicum</i>	DQ194935	631	0	0	172	803	0
#21	<i>M. lar</i>	KC506885	0	0	181	134	315	0
#22		KC506901	49	525	0	0	574	0
#23		KC506906	0	0	0	272	272	0
#24		KC506942	0	829	267	412	1508	0
#25		KX444198	278	0	0	247	525	0
#26		LC316208	1947	936	457	600	3940	2
#27	<i>M. ustulatum</i>	LC316199	0	0	23	0	23	0
#28	<i>Eriocheir sinensis</i>	KY041629	826	482	332	198	1838	0
#29	<i>Orisarma dehaani</i>	LC500752	29	48	0	0	77	0
Sum of reads			19001	18066	8399	8327	53793	2
Number of haplotypes			14	13	10	15	19	1

Rhinogobius sp. BB の 2 種は、それぞれ MiFish-U-F/R の増幅領域では識別できないため、前者をヨシノボリ類 1 *Rhinogobius* sp. 1 (296 リード) (#08)、後者をヨシノボリ類 2 *Rhinogobius* sp. 2 (422 リード) (#09) とした。また、ヌマチチブ *Tridentiger brevispinis*、ナガノゴリ *T. kuroiwa*e、チチブ *T. obscurus* の 3 種についても相同性が 99 % 以上であるため、チチブ類 *Tridentiger* sp. (20 リード) (#10) とした。総数 70,410 リードの約 90 % がオオクチュゴイ *Kuhlia rupestris* (63,456 リード) (#05) であると判定され、同属であるユゴイ *K. marginata* (516 リード) (#04) の 123 倍の検出量であった。その他、オオウナギ (3941 リード) (#01)、テンジクカワアナゴ *Eleotris fusca* (1449 リード) (#02)、タメトモハゼ *Giuris tolsoni* (18 リード) (#03)、グッピー *Poecilia reticulata* (6 リード) (#06) が検出された。魚類以外では、スッポン *Pelodiscus sinensis* が検出された。

十脚甲殻類相

合計 19 種類のハプロタイプ (#11–#29) が検出され 4 科 4 属 11 種に分類された (Table 2)。17 種のハプロタイプ (51,878 リード) (#11–#27) はコエビ下目 *Caridea* であり、9 種が検出された。コエビ下目の内、81 % (41,989 リード) がヒメヌマエビ属 *Caridina*、19 % (9,889 リード) がテナガエビ属 *Macrobrachium* であった。ヒメヌマエビ属のうち 39,272 リードがトゲナシヌマエビ *C. typus* と判定され 4 ハプロタイプ (#14–#17) が検出された。検出されたその他のヒメヌマエビ属はミヅレヌマエビ *C. leucosticta* (2034 リード) (#13)、リュウグウヒメエビ *C. laoagensis* (482 リード) (#12)、ツノナガヌマエビ (201 リード) (#11) の 3 種であった。テナガエビ属のうち 7,134 リードがコンジテンテナガエビ *M. lar* と判定され 6 ハプロタイプ (#21–#26) が検出された。検出されたその他のテナガエビ属はザラテナガエビ *M. australe* (1292 リード) (#18)、ヒラテナガエビ *M. japonicum* (803 リード) (#20)、ミナミテナガエビ *M. formosense* (637 リード) (#19)、ナンヨウテナガエビ *M. ustulatum* (23 リード) (#27) の

4 種であった。

2 種のハプロタイプ (#28, #29) (1,915 リード) はカニ下目 *Brachyura* であり 2 種が検出され、1,838 リード (#28) は特定外来生物であるチュウゴクモクズガニと判定され、77 リード (#29) はクロベンケイガニ *Orisarma dehaani* と判定された。

モクズガニ属

沖縄県南城市玉城百名と静岡県静岡市清水区波多打川で採集したモクズガニ各 1 個体で決定した 16S 遺伝子配列 (LC829462, LC829463) 及びデータベースから入手したモクズガニ類の 16S 遺伝子 42 配列、計 44 配列から、171 bp の MiDeca 領域を切り出しアライメントを行ったところ、5 種のハプロタイプが得られた (Hap1–Hap5)。Hap1 には沖縄県産モクズガニとチュウゴクモクズガニの 2 種、Hap2 にはモクズガニ、チュウゴクモクズガニ、*E. hepuensis* の 3 種、Hap3 と Hap5 にはモクズガニ 1 種が含まれていた (Table 3)。ハプロタイプ間の塩基置換数は 1 から 4 であり、Hap2 と Hap3、Hap2 と Hap5 の組み合わせが最大値であった。従って、MiDeca-F/R の増幅領域 171 bp においては、モクズガニ類の種を正確に識別する変異は含まれていない。

考察

ポアサイズの違いによる eDNA の捕集効率の違いは先行研究により報告されている。例えば Turner et al. (2014) は、池と湖において、ポアサイズが小さいほど (<0.2 μm) 多くの eDNA が捕集されるが、コイ *Cyprinus carpio* の DNA に限ると 1.0–10.0 μm が最も効率が良いことを報告している。本研究では、用水路において、ポアサイズ 0.22 μm と 0.45 μm を比較したが、DNA 全体の検出量には統計学的な有意差は確認されず、0.22 μm と 0.45 μm 程度のサイズ差では結果に影響しないと考えられた。ただし、今回の結果は用水路から得られたサンプルのみであるため、他の生態系においても同様であるか、今後の検証が必要である。MiDeca-F/R の PCR 条件の違いでは、Komai

Table 3. Mitten crab species of the genus *Eriocheir* assigned to five haplotypes (Hap1 to Hap5) detected using MiDeca-F/R primers.

Haplotype	Species	Accession No.
Hap1	<i>E. japonica</i>	LC829463
	<i>E. sinensis</i>	AF105243 AF312718 AF411299 AF411300 AF411301
		AF411302 AF411303 AF411304 AF411305 AF411306
		AF411307 AF411308 AF411309 AF411310 AJ250642
		AY290747 AY290748 AY290749 AY290750 AY290751
		FJ455507 KM516908 KP064329 KP126617 KY041629
		MZ400417
		Hap2
<i>E. hepuensis</i>	AF411312 AF411313 AF411314 AF411315 AF411316	
	AF516706 FJ455506 MK159104	
	<i>E. japonica</i>	AF105242 AF516707
	<i>E. sinensis</i>	AF411311 AF516709
Hap3		
<i>E. japonica</i>	LC829462 FJ455505 MT898430	
Hap4		
<i>E. japonica</i>	AY274302	
Hap5		
<i>E. japonica</i>	AY290746	

Table 4. Comparison of fish species detected by present eDNA metabarcoding analysis with those from previous observations (Tachihara 2000; personal communication) in the study area. Plus signs indicate the positivity, whereas minus signs denote the negativity. Asterisks represent their DNA may have been detected (see Discussion).

Order	Family	Species	Previous observation	This study
Anguilliformes	Anguillidae	<i>Anguilla japonica</i>	+	-
		<i>A. marmorata</i>	+	+
Cyprinodontiformes	Poeciliidae	<i>Gambusia affinis</i>	+	-
		<i>Poecilia reticulata</i>	+	+
Perciformes	Kuhliidae	<i>Kuhlia marginata</i>	+	+
		<i>K. rupestris</i>	-	+
	Cichlidae	<i>Oreochromis mossambicus</i>	+	-
	Gobiidae	<i>Luciogobius guttatus</i>	+	-
		<i>Eleotris acanthopoma</i>	+	-
		<i>E. fusca</i>	+	+
		<i>Giuris tolsoni</i>	-	+
		<i>Rhinogobius similis</i>	-	+
		<i>R. brunneus</i>	+	*
		<i>Rhinogobius</i> sp. MO	+	*
<i>Tridentiger kuroiwa</i>	+	+		

et al. (2019) の方法によって、有意に多くの塩基配列が検出されたが、ナンヨウテナガエビ（ハプロタイプ#27）やコンジテンテナガエビの一部のハプロタイプ（#21, #23）は検出されなかった。このことは、本研究で新たに設定した PCR 条件が単に劣っていたことを示すものではなく、PCR 条件の多様性が eDNA 分析によって検出される種多様性に影響を与える可能性を示すものである。本研究では、追加の条件設定によりナンヨウテナガエビの偽陰性が回避された。これらの知見は、今後の実験設計や手法の最適化に役立てられる

ことが期待される。

魚類相

沖縄県宜野湾市大山から周縁性魚類を含む 11 科 25 種の魚類が記録されており（立原 2000）、このうちタイモ水田周辺には、5 科 9 属 12 種の魚類が生息している（立原私信; Table 4）。本研究の eDNA 分析によって、用水路から検出された魚類は 6 科 7 属 10 種であった。eDNA 分析により新たに分布が推定される種は、オオクチュゴイ、タメトモハゼ *Giuris tolsoni*、ゴクラクハゼ

Rhinogobius similis の計 3 種であった。一方で、ニホンウナギ *Anguilla japonica*、カダヤシ *Gambusia affinis*、カワズメ *Oreochromis mossambicus*、ミミズハゼ *Luciogobius guttatus*、チチブモドキ *Eleotris acanthopoma* の計 5 種の DNA は検出されなかった。検出されなかった 5 種と MiFish-U-F/R の塩基配列を比較したところ、MiFish-U-F と 1-3 塩基のミスマッチが確認され、MiFish-U-R とは完全に一致していた (Table 5)。しかし、ニホンウナギとチチブモドキで見られたプライマーと

のミスマッチは、それぞれ DNA が検出されたオオウナギ *Anguilla marmorata* (計 3,941 リード) とテンジクカワアナゴ *Eleotris fusca* (計 1,449 リード) と同じ個所であり、プライマーとのミスマッチによる偽陰性ではないと考えられる。eDNA が検出された 7 種のうち、ユゴイとオオクチュゴイを除く 5 種は、同様に MiFish-U-F と 1-3 塩基のミスマッチが確認された (Table 5)。ユゴイとオオクチュゴイについては、INSD に登録されている ミトコンドリア 12S 遺伝子の 塩基配列が、

Table 5. Comparison of MiFish-U-F/R primer sequences with the corresponding nucleotide sequences of fish species postulated to inhabit the taro fields at Oyama, Ginowan, Okinawa, Japan. Identical nucleotides with primers are indicated by hyphens.

MiFish-U-F		5'-	G	T	C	G	G	T	A	A	A	A	C	T	C	G	T	G	C	C	A	G	C	-3'												
Undetected	<i>Anguilla japonica</i> (AB021888, AF266483)	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-												
	<i>Eleotris acanthopoma</i> (MH479400)	-	C	-	A	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-												
	<i>Gambusia affinis</i> (LC669499, LC722527)	-	C	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
	<i>Luciogobius guttatus</i> (LC719269, LC771083)	-	C	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
	<i>Monopterus</i> sp. (LC533127, LC533128)	-	C	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
	<i>Oreochromis mossambicus</i> (AY597335)	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
Detected	<i>Anguilla marmorata</i> (AF417308, AP007242)	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-												
	<i>Eleotris fusca</i> (LC681781, MH479400)	-	C	-	A	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-												
	<i>Giuris tolsoni</i> (AB974563, LC720138)	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
	<i>Poecilia reticulata</i> (AB898687, KJ460033)	-	C	-	-	-	-	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
	<i>Rhinogobius similis</i> (LC717519, LC719267)	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
	MiFish-U-R		5'-	C	A	T	A	G	T	G	G	G	G	T	A	T	C	T	A	A	T	C	C	C	A	G	T	T	T	G	-3'					
Undetected	<i>Anguilla japonica</i> (AB021888, AF266483)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
	<i>Eleotris acanthopoma</i> (MH479400)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	<i>Gambusia affinis</i> (LC669499, LC722527)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	<i>Luciogobius guttatus</i> (LC719269, LC771083)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	<i>Monopterus</i> sp. (LC533127, LC533128)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-			
	<i>Oreochromis mossambicus</i> (AY597335)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Detected	<i>Anguilla marmorata</i> (AF417308, AP007242)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	<i>Eleotris fusca</i> (LC681781, MH479400)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Giuris tolsoni</i> (AB974563, LC720138)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Poecilia reticulata</i> (AB898687, KJ460033)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Rhinogobius similis</i> (LC717519, LC719267)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MiFish-U-F/R の増幅領域 167 bp のみ (ユゴイ : LC037040, LC519415, LC552469; オオクチュゴイ : AB972190, LC458256, LC496194, LC552468) または MiFish-U-F/R のアニーリング部位と増幅領域を含まない (オオクチュゴイ : KJ774840) ため、プライマーとのミスマッチを確認できなかった。検出されたリードの約 90 %を、以前記録されていなかったオオクチュゴイが占めていたことについては、今後、タイモ水田用水路における優先種としての位置付けや実際の個体群密度に関する直接観察が必要であると考えられる。

ヨシノボリ類の一部は MiFish-U-F/R の増幅領域では識別できないため、それぞれヨシノボリ類の一種としたが、ヨシノボリ類 1 と配列が一致する種をみると、ヤイマヒラヨシノボリとケンムンヒラヨシノボリの記載以前の総称であったヒラヨシノボリ *Rhinogobius* sp. DL が宜野湾市から記録されておらず (立原 2000)、加えて、沖縄島に分布するケンムンヒラヨシノボリは河川上流部に生息することから (Suzuki et al. 2020)、クロヨシノボリのみが当地域で検出されうる種と考えられる。同様に、ヨシノボリ類 2 については、立原 (2000) が宜野湾市からアヤヨシノボリを記録していること、また、アオバラヨシノボリは沖縄島北部の河川にのみ分布が知られることから (岩田 2003)、本検出はアヤヨシノボリに由来すると推定される。チブ類の一種については、該当 3 種の国内での分布から (明仁 1987; 立原 2000)、ナガノゴリに該当する。調査地であるタイモ水田には、昔からタウナギ類 *Monopterus* sp. が生息しているとされ、著者らは標本を得て保管しているが、一方で、用水路から DNA は検出されなかった。タウナギ類の塩基配列は、MiFish-U-F/R とそれぞれ 2 塩基のミスマッチが存在する (Table 5)。つまり、タウナギ類が検出されなかったことは、プライマーとのミスマッチが要因の一つの可能性はある。他には、タウナギ類は用水路ではなく、タイモ水田の泥地に潜って生息していることや、タイモ水田と用水路の接続が時期によってタイモ収穫後に耕す場合や水位維持の注水だけの一方の流に限定されていること等が要因となっ

て検出されなかった可能性も考えられるため、さらなる検証が必要である。

わずか 1 回の eDNA サンプルの採集により、沖縄県宜野湾市大山に生息が確認されていた魚類の約 40 %にのぼる種の DNA が、1 つの用水路から得られ、さらに未報告の 3 種の存在が新たに示唆された。これは、MiFish-U-F/R を用いた eDNA 分析が、直接採集や目視観察といった従来の調査と比較して、低コストで生物多様性を検証することが可能であることを示している。地点数、季節、年月、種ごとの生態を考慮したサンプリングによって、より詳細な魚類相が解明されていくことが期待される。しかし、eDNA 分析は従来の調査にとって代わるものでなく、生息の実態や個体群密度などは、従来通りの直接採集や目視観察が必要となる。

十脚甲殻類相

諸喜田ら (2000) は、宜野湾市の地表河川 (中流から上流) と湧水から 4 科 9 種の十脚甲殻類を報告している (Table 6)。本研究で用水路から検出された十脚甲殻類は 4 科 11 種であり、諸喜田ら (2000) が外来種として記録したスジエビ *Palaemon paucidens* とアメリカザリガニ *Procambarus clarkii* は検出されなかった。スジエビは北海道から奄美大島に分布し、沖縄島から採集されたスジエビがミトコンドリア 16S 遺伝子配列解析の結果、琵琶湖由来と同じハプロタイプ (A1 ハプロタイプ) を有したことから (張ら 2018)、外来種とした諸喜田ら (2000) を裏付けた。アメリカザリガニについても 1980 年代から沖縄県の外来種として定着している (諸喜田ら 2000)。両種と MiDeca-F/R の塩基配列を比較したところ完全に一致したため、検出されなかった要因として、プライマーのミスマッチは除外される。外来種であるスジエビ A タイプとアメリカザリガニは、純淡水性生物であることから、沖縄県への侵入は人為的なものである。尚、タイモ水田への定着は不明であるため、継続なモニタリングが必要である。諸喜田ら (2000) の淡水域の採集記録がなく、本研究によって eDNA が検出された

Table 6. Comparison of decapod crustacean species detected by present eDNA metabarcoding analysis with those from previous observations (Shokita et al., 2000; Nagai et al., 2022) in the study area. Plus signs indicate the positivity, whereas minus signs denote the negativity. An asterisk represents that the DNA may have been detected (see Discussion).

Infraorder	Family	Species	Previous observation	This study
Astacidea	Cambaridae	<i>Procambarus clarkii</i>	+	-
Caridea	Atyidae	<i>Caridina grandirostris</i>	-	+
		<i>C. typus</i>	+	+
		<i>C. laoagensis</i>	+	+
		<i>C. leucosticta</i>	+	+
	Palaemonidae	<i>Macrobrachium australe</i>	+	+
		<i>M. formosense</i>	+	+
		<i>M. japonicum</i>	+	+
		<i>M. lar</i>	+	+
		<i>M. ustulatum</i>	-	+
		<i>Palaemon paucidens</i> (type A)	+	-
		<i>Palaemon paucidens</i> (type B)	+	-
Brachyura	Varunidae	<i>Eriocheir japonica</i>	+	*
	Sesarmidae	<i>Orisarma dehaani</i>	+	+

種は、ツノナガヌマエビ *Caridina grandirostris*、リュウグウヒメエビ *C. laoagensis*、ナンヨウテナガエビ、クロベンケイガニ *Orisarma dehaani* であった。リュウグウヒメエビについては、Nagai et al. (2022) が調査地点から、クロベンケイガニについては、諸喜田ら (2000) の宜野湾市の汽水域からの記録があることから、両種の DNA が検出されたことに矛盾はない。ナンヨウテナガエビは、2017年にザラテテナガエビ *M. australe* の下位シノニムから隠蔽種として再記載され (Castelin et al. 2017)、日本における本種の記録は沖縄県名護市と静岡県賀茂郡河津町の2例に限られる (Fuke and Imai 2018; 皆川・福家 2024)。ナンヨウテナガエビとザラテテナガエビの形態学的種同定は困難であるが、本研究による eDNA 分析では、明確に両種を識別できることが明らかとなった。今後、日本南部の淡水域の eDNA を分析することで、稀種であるナンヨウテナガエビの生息地の説明が期待される。

1箇所の水路から得た4つの eDNA サンプルの採集により、沖縄県宜野湾市大山の広範囲で確認されていた約 80% の十脚甲殻類が検出されたことは、MiDeca-F/R を用いた eDNA メタバーコーディングが十脚甲殻類相を把握するための手法として、非侵襲的かつ効率的であることが示され

た。さらに調査地周辺で未報告の稀種ナンヨウテナガエビが検出されたことは、eDNA 分析が直接採集や目視観察では確認の難しい種を検出する場合があります、生物相の詳細な把握にも貢献できることを示している。

モクズガニ属

MiDeca-F/Rの増幅領域171 bpにおいては、沖縄産モクズガニとチュウゴクモクズガニのみならず、モクズガニ類全体を識別できないことが示された。検出されたヒメヌマエビ属は種間変異として14–44塩基 (種内変異: 1–2塩基)、テナガエビ属は種間変異として16–39塩基 (種内変異: 1–18塩基) が確認された (Table S1参照)。淡水性エビ類と比較して、モクズガニ類のMiDeca-F/Rの増幅領域における変異は非常に小さいことが明らかとなった。モクズガニ属は、「特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律 (外来生物法)」によって、モクズガニとオガサワラモクズガニを除く全種が特定外来生物に指定されている。山崎 (2011) は、沖縄産モクズガニは小規模集団である上に、他のモクズガニ属と近縁であり交雑する可能性があることから、沖縄への外来産モクズガニ属の導入に警鐘を鳴らしている。eDNA分析による外来甲殻類の検出例として、

Hiraoka et al. (2021) によるチュウゴクスジエビ *Palaemon sinensis*などが挙げられ、外来種の侵入状況のモニタリングにeDNA分析が有効であることが示されている。しかしながらMiDeca-F/Rを用いたeDNA分析ではモクズガニ類を明確に識別できないことから、今後、外来モクズガニ属の侵入をeDNA分析によりモニタリングする場合は、新規のプライマーを設計する必要があると考える。

謝辞

宜野湾市大山地区の文献や情報を提供していただいた元琉球大学理学部教授の立原一憲博士、大山地区のタウナギの生息情報と標本を提供いただいた JA 宜野湾ファーマーズマーケットはごも市場生産者会の石川達義会長、モクズガニ採集に貢献していただいた吉田公平氏に厚く御礼申し上げます。また、標本の登録に際して、国立科学博物館動物研究部研究主幹の小松浩典博士、並びに、塩基配列データの登録に際して、日本 DNA データバンクの登録係に、この場を借りてお礼申し上げます。有益なコメントをいただいた編集委員のアクオス研究所の張 成年博士および 2 名の査読者に厚く感謝いたします。本研究は、琉球大学熱帯生物圏研究センタープロジェクト型共同利用・共同研究、国立研究開発法人科学技術振興機構の e-ASIA 共同研究プログラム (JST SICORP, JPMJSC21E5)、並びに文部科学省・科学研究費補助金 (20K12258, 21KK0115) の助成を受けたものである。

引用文献

明仁 (1987). チチブ類日本の淡水魚類—その分布、変異、種分化をめぐって (水野信彦・後藤晃編), 東海大学出版会, 東京, pp. 167–178.

Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T. P., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., Yu, D. W., de Bruyn, M. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends Ecol. Evol.* 29: 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.003>.

Crandall, K. A., Fitzpatrick, J. F. (1996). Crayfish molecular systematics: using a combination of procedures to estimate phylogeny. *Syst. Biol.* 45:

1–26. <https://doi.org/10.1093/sysbio/45.1.1>.

Castelin, M., de Mazancourt, V., Marquet, G., Zimmerman, G., Keith, P. (2017). Genetic and morphological evidence for cryptic species in *Macrobrachium australe* and resurrection of *M. ustulatum* (Crustacea, Palaemonidae). *Eur. J. Taxon.* 289: 1–27. <https://doi.org/10.5852/ejt.2017.289>.

張 成年・柳本 卓・丸山智朗・池田 実・松谷 紀明・大貫貴清・今井 正 (2018). スジエビ *Palaemon paucidens* の遺伝的分化. 日本生物地理学会会報 73: 1–16.

de Manancourt, V., Klotz, W., Marquet, G., Keith, P. (2018). Integrative taxonomy helps separate four species of freshwater shrimps commonly overlooked as *Caridina longirostris* (Crustacea: Decapoda: Atyidae) on Indo-West Pacific islands. *Invertebr. Syst.* 32: 1422–1447. <https://doi.org/10.1071/IS18034>.

Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4: 423–425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>.

Fuke, Y., Imai, H. (2019). First Japanese record of *Macrobrachium ustulatum* (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) from Okinawa-jima Island, Japan. *Fauna Ryukyuan* 44: 7–15. <http://hdl.handle.net/20.500.12000/42406>.

Goldberg, C. S., Strickler, K. M., Pilliod, D. S. (2015). Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biol. Conserv.* 183: 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.040>.

Hiraoka, R., Teishima, H., Takabe, T., Suzuki, T., Tanaka, Y. (2021). Detection of invasive shrimp *Palaemon sinensis* (Sollaud, 1911) using environmental DNA. *Crust. Res.* 50: 9–15. https://doi.org/10.18353/crustacea.50.0_9.

外間数男 (2007). 田芋栽培の地域的展開 4. 宜野湾市の田芋栽培. 沖縄農業 40: 27–39. <http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002015671>.

Imai, H., Cheng, J. H., Hamasaki, K., Numachi, K. (2004). Identification of four mud crab species (genus *Scylla*) using ITS-1 and 16S rDNA markers. *Aquat. Living Resour.* 17: 31–34. <https://doi.org/10.1051/alr:2004007>.

岩田明久 (2003). アオバラヨシノボリ. 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック—4 汽水・淡水魚類 (環境省自然環境局野生生物課編), 自然環境研究センター, 東京, pp. 132–133.

Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L., Lodge, D. M. (2011). "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conserv. Lett.* 4: 150–157. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2010.00158.x>.

- Katoh, K., Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30: 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
- Komai, T., Gotoh, O., Sado, T., Miya, M. (2019). Development of a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding decapod crustaceans. *Metabarcoding Metagenom.* 3: 1–19. <https://doi.org/10.3897/mbmg.3.33835>.
- Kvist, S. (2013). Barcoding in the dark?: a critical view of the sufficiency of zoological DNA barcoding databases and a plea for broader integration of taxonomic knowledge. *Mol. Phylogenet. Evol.* 69: 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.05.012>.
- 皆川優作・福家悠介 (2024). 本州初記録のナンヨウテナガエビ (甲殻亜門: 十脚目: テナガエビ科) の報告. *Aquat. Anim.* 2024: AA2024-7. https://doi.org/10.34394/aquaticanimals.2024_0_AA2024-7.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M., Iwasaki, W. (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. <https://doi.org/10.1098/rsos.150088>.
- Nagai, H., Kitano, T., Imai, H. (2022). Molecular phylogenetic analysis of *Caridina weberi* species group around Japan, with the first record of *Caridina tupaia* de Mazancourt, Marquet & Keith, 2019. (Crustacea: Decapoda: Atyidae) from Japan. *Eur. J. Aquat. Sci.* 1: 1–8. <https://doi.org/10.24018/ejaqua.2022.1.1.3>.
- 小川護 (2000). 宜野湾市における土地利用の変化. 宜野湾市史第9巻資料編8自然 (沖縄県宜野湾市教育委員会文化課編), 沖産業, 沖縄, pp. 3–36.
- 沖縄県 (2024). 沖縄県対策外来種リスト. <https://www.pref.okinawa.jp/kurashikankyo/kanryo/1004621/1004634.html>.
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., Gough, K. C. (2014). The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *J. Appl. Ecol.* 51: 1450–1459. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12306>.
- Roussel, J. M., Paillisson, J. M., Tréguier, A., Petit, E. (2015). The downside of eDNA as a survey tool in water bodies. *J. Appl. Ecol.* 52: 823–826. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12428>.
- RStudio Team (2023). RStudio: integrated development for R. RStudio, PBC, Boston, MA. <http://www.rstudio.com/>.
- Sato, Y., Hermawan, I., Kakita, T., Okano, S., Imai, H., Nagai, H., Kimura, R., Yamashiro, T., Kajita, T., Toma, C. (2022). Analysis of human clinical and environmental *Leptospira* to elucidate the eco-epidemiology of leptospirosis in Yaeyama, subtropical Japan. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 16: e0010234. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010234>.
- 諸喜田茂充・藤田喜久・長井隆・川上新 (2000). 宜野湾市の甲殻類. 宜野湾市史第9巻資料編8自然 (沖縄県宜野湾市教育委員会文化課編), 沖産業, 沖縄, pp. 629–658.
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol. Ecol.* 21: 1794–1805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x>.
- Suzuki, T., Oseko, N., Kimura, S., Shibukawa, K. (2020). Two new species of torrential gobies of the genus *Rhinogobius* from the Ryukyu Islands, Japan. *Bull. Kanagawa Pref. Mus. (Nat. Sci)* 49: 7–28. https://doi.org/10.32225/bkpmnh.2020.49_7.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., Rieseberg, L. H. (2012a). Environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21: 1789–1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., Willerslev, E. (2012b). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.* 21: 2045–2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>.
- 立原一憲 (2000). 宜野湾市の魚類. 宜野湾市史第9巻資料編8自然 (沖縄県宜野湾市教育委員会文化課編), 沖産業, 沖縄, pp. 595–628.
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., Orlando, L., Willerslev, E. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21: 2565–2573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x>.
- Thomsen, P. F., Willerslev, E. (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.* 183: 4–18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>.
- Turner, C. R., Barnes, M. A., Xu, C. C. Y., Jones, S. E., Jerde, C. L., Lodge, D. M. (2014). Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods Ecol. Evol.* 5: 676–684. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12206>.
- 上原富二男 (2000). 宜野湾市の地形・地質・水. 宜野湾市史第9巻資料編8自然 (沖縄県宜

野湾市教育委員会文化課編), 沖産業, 沖縄, pp. 55–124.
山崎いづみ (2011). モクズガニ類の遺伝と種分化. エビ・カニ・ザリガニ—淡水甲殻類の保全と生物学 (川井唯史・中田和義編), 生物研究社, 東京, pp. 290–300.

Received: 14 May 2024 | Accepted: 30 July 2024 | Published: 6 August 2024