

平成 26 年度

佐渡市 生物多様性学術研究等奨励金事業

研究報告書

5

佐渡島における放鳥トキの食性解析と  
餌生物の環境選択性

10

15

新潟大学大学院 自然科学研究科

環境科学専攻 流域環境学コース

20

博士前期課程 2 年 田野井翔子

25

## はじめに

種もしくは地域個体群が絶滅した場合に、それらが本来生息していた地域に野生個体群を再び確立させる試みは「再導入」とよばれ、生物多様性を保全する 1 つの有効な手法として、昨今世界的にその実施事例が増えている(Seddon *et al.* 2007)。従来行われてきた再導入事業の多くは、森林、砂漠、山岳地帯などの原生自然環境に生息する哺乳類や鳥類を対象としており (Spalton *et al.* 1999; Armstrong *et al.* 2002; Bar-David *et al.* 2008; Reading *et al.* 2013;)、結果として、人間活動の介在が少ない環境で行われてきたという特徴があげられる。

我が国では戦後石炭から原油へのエネルギー革命が起き、その後長年にわたる高度成長期に入る中で自然と人々との関わりが大きく変わり、薪炭林としての利用がなされていた広葉樹林は放棄、河川湖沼は洪水調節がしやすい護岸整備がなされ、それらの環境変化にともない生物多様性の著しい低下が生じた。さらに昨今では、先進国に共通してみられる急速な人口減少に直面し (総務省統計局 2014)、それにより放棄された農地が里山と呼ばれる中山間地を中心に広がりつつあることで生物多様性の低下が引き起こされている。そのような現状を受け、2002 年に策定された新生物多様性国家戦略では、生物多様性低下を引き起こす新たな危機として、人間活動により創出や維持管理がなされてきた農地や二次林などといった二次的な自然環境における生物多様性の低下が取り上げられた (環境省 2002)。わが国では、2005 年にコウノトリが、2008 年にトキが再導入されたが、これらの取り組みは先行して行われてきた原生環境における再導入とは異なり、上述した二次的な自然環境から成り立つ、人々が暮らす生活圏の中で行われた世界に類を見ない取り組みと位置づけることができる。

二次的な自然環境における再導入事業が世界的に希有な理由として、再導入を行うことに伴う人間活動への明らかな負のインパクトがその推進を阻んでいるといえる。例えば、ヨーロッパバイソン *Bison bonasus* では、人に対する直接的な危害のほか、農作物への被害が懸念され、この懸念を取り払うことが再導入事業の実施に向けて必須とされて

いる(Decker et al. 2008)。また、農地を利用する生物では、生息環境整備において、農法の変更や管理する上でのコスト増大が懸念されている。エジプトハゲワシ *Neophron percnopterus* は地中海植生や果樹園を重要な生息地としているが、集約的農業等の土地利用の変化による好適な生息地の減少が懸念されており、再導入を行っていく上ではその影響評価に加え、農地を対象にした適切な生息地管理が必要とされている(Sara and Vittorio 2003)。このように、二次的な自然環境下で再導入を実施するには、その生息環境をめぐって地域住民と軋轢が必ず生じ、合意形成を図ることが強く求められる。トキやコウノトリの再導入事業では、改めて人と自然の共生関係の構築を改めて問い直すことが求められているのであり、それは二次的自然環境における生物多様性の保全・向上を図る上で必ず直面する課題といえよう。

トキ *Nipponia nippon* は、かつてアジアに広く分布したが、狩猟圧の増大によって急激に個体数を減らし、更に営巣可能な大径木の減少や、農薬等の使用による餌生物の減少等が拍車をかけ、1981年に日本産のトキは野生絶滅に至った(BiedLife-International 2001; Li et al. 2009)。その後日本では、1999年に中国から贈られたペアをもとに飼育下での個体数を増加させ、現在は新潟県佐渡島において再導入が試みられている(環境省 2003)。日本での野生絶滅以前に行われた調査によれば、トキは採餌場所として主に水田や沢を利用し、そこに生息するドジョウ、カエル、および水棲昆虫類等を捕食していると報告されていた(佐藤 1978)。そのため、上記にあげた国内産トキに関する数少ない生態情報を参考にし、トキの野生復帰に向けた再導入事業では、生息環境整備として主要な餌の1つとして報告されていたドジョウを代表する餌生物種として位置づけ、ドジョウの増産を目指した自然再生事業や環境保全型農法が取り組まれてきた。しかし、放鳥個体に対する採餌行動のモニタリングから、夏期の刈り取り前水田での採餌頻度は非常に低く、畦や調整水田などの陸域での採餌行動が増加することが報告されている(中津ほか 2011)。また、飲み込んだ餌項目を体サイズごとに評価すると、1年を通じて約80%以上がは直接観察では判別不能であることも明らかになり(Endo and Nagata 2013)、

放鳥したトキの食性に関する生態情報や、餌となる生物の生態情報をもとに、自然再生の取り組みにフィードバックさせることが、順応的管理として重要である。そのため、1年を通じた放鳥個体の食性を、詳細に明らかにするとともに、実際に利用されている餌生物の生息環境の情報を集積することが求められている。

5 食性解析を行う際に、従来は、採餌行動の直接観察や、糞、胃内容物の形態学的な分析が行われてきた。しかし、採餌行動の直接観察が困難な場合や、餌生物の小さな断片しか残っておらず形態学的な識別が難しい場合、正確な食性解析が行われないという問題があった。そこで、それらの問題を解決するための強力なツールとして、モノクローナル抗体や DNA 情報に基づいた分子的な手法が、幅広い分類群の生物種に対して用いら

10 れてきた(Symondson 2002)。

なかでも、DNA バーコーディング法と呼ばれる、サンプルから得られた特定の短い遺伝子領域 (DNA バーコード) と塩基配列情報データベースを照合することで生物種を特定する方法が、近年急速に発展している。その理由としては、比較的詳細な分類群レベルまでの分類が可能であり (Hebert *et al.* 2003)、グローバルなデータベースの整備も盛ん

15 に進められていることが挙げられる (Ratnasingham and Hebert 2007)。また、従来の DNA バーコーディング法では、糞や胃内容物の残渣から抽出した餌生物の DNA 断片を、PCR 法によって増幅した後にプラスミドベクターに挿入し、大腸菌に加えて形質転換させるクローニングを行い、クローンごとにキャピラリー電気泳動を使用したサンガー法

20 によって塩基配列を解析することで餌種を明らかにしてきた。しかしながら、この方法では、1つのサンプルから数十、場合によっては数百のクローンの解析が必要となり、信頼性の高いデータを得るために多量のサンプルを解析する場合には、多くの時間と費用が必要とされるというデメリットがあり、大きな障壁となっていた (Pegard *et al.* 2009)。

2009 年頃から導入され始めた次世代シーケンサーを用いた DNA バーコーディング法は、食性解析に革命をもたらしたといえる (Valentini *et al.* 2009)。次世代シーケンサー

25 を用いることで、クローニングの必要がなくなり、多くのサンプルから多量の塩基配列

情報が短時間で得られることが可能となったため、多くの時間と費用をかけずに食性解析を効率的に行うことができるようになった。最近では、オットセイやペンギンといった海洋性生物、魚類、コウモリ類、爬虫類、鳥類など様々な生物に対して、次世代シーケンサーを用いた DNA バーコーディング法による食性解析が行われてきており、有効な手段として急速に普及している (Deagle *et al.* 2009; Soininen *et al.* 2009; Deagle *et al.* 2010; Murray *et al.* 2011; Bohmann *et al.* 2011; Brown 2011; Jo *et al.* 2013)。

本研究では、はじめに、佐渡島におけるトキの餌候補生物の塩基配列情報データベースの作成を行う。次に、DNA バーコーディング法に次世代シーケンサーを導入することで、多量の糞サンプルを解析し、得られた膨大な塩基配列情報をもとに、信頼性の高い放鳥トキの食性情報を明らかにする。更に、明らかになった餌種が生息する環境を明らかにする。そして、トキの詳細な食性情報を反映させた餌場環境整備に向けた改善策を提案することを目的とする。

## 方法

### 15 調査地と調査期間

トキの餌候補生物の塩基配列情報データベース作成に用いる生物を採集するため、2014年現在、放鳥後最も多くのトキが定着している新潟県佐渡市国仲平野北東部地域の 6 ヲ所の水田を調査地として設定した (図 1)。調査期間は、1 年の中で多くの生物の発生が見込まれる 6~7 月を含め、トキの繁殖期から非繁殖期にわたる 2012 年 5 月~12 月とした。食性解析に用いたトキの糞サンプルの採集は、2014 年現在、トキの定着が確認されている新潟県佐渡市の国仲平野北東部、国仲平野南西部、および羽茂地域の 3 地域において (図 1)、2012 年 2 月~12 月に月に 1 回の頻度で、1 回あたり約 1 週間にわたり行われた。トキが利用する餌種の生息環境に関する調査は、トキの利用も確認されている新潟県佐渡市国仲平野北東部の水田 1 ヲ所において行った。本来は 1 年間を通じた調査が望まれたが、農繁期には水田内での調査が制限されることや、調査体系の確立という意味合いも強かったこと

から、本研究においては、農閑期にあたる稲刈り後にあたる 11 月と積雪期にあたる 2 月に調査を行った。

#### 塩基配列情報データベース作成のための餌候補生物の採集

- 5 水田内および畦において、見つけどり法、スィーピング法、ベイトトラップ法、土壌ソーティング法、およびカラシ追い出し法を用い、発見した生物を全て採集した。スィーピング法は、口径 60cm の捕虫網を用いて行った。ベイトトラップ法では、粉末すし酢とサビキ釣り用配合エサを同量混ぜたものを誘引剤としてトラップを仕掛け、翌日に回収した。土壌ソーティング法では、トキが嘴を差し込むことができる深さと考えられる 10~15cm 程
- 10 度の深さの土壌を掘り起こした後、ピンセットで土壌をソーティングし、出現した生物を全て採取した。カラシ追い出し法では、カラシを水に溶かした 2%カラシ水を地表にまき、地中から出てきた生物を全て採取した。採取した生物は、冷凍して実験室に持ち帰った。ただし、小型のヤゴやクモ類などの体が柔らかい生物については、冷凍では欠損し同定が困難になることが想定されたため、70%アルコールで固定した後に、実験室に持ち帰った。

15

#### 餌候補生物の塩基配列情報データベースの作成

実験室に持ち帰った生物は、図鑑を使用して、種の同定を行った。同定が困難な種について一部は専門家に同定を依頼し、その他については属もしくは科までの同定にとどめた。

- 種の同定が完了したサンプルについて、体の一部もしくは全体を使用して DNA の抽出を
- 20 行った。組織の破碎にはビーズ法を用いた。2mL チューブに組織サンプルとジルコニアビーズ(φ 5.0)を入れ、ビーズ式細胞破碎装置である TissueLyser(QIAGEN, Venlo, The Netherlands)に設置し、振動回数 900 rpm、時間 20 sec のビーズ破碎処理を行った。破碎された組織は、DNeasy Blood&TissueKit (QIAGEN)を用い、プロトコルに従って DNA を抽出した。

- 本研究では、動物に普遍的に存在し、分類群ごとに多様性が高いといわれている、ミト
- 25 コンドリア Cytochrome c Oxidase subunit I (CO I) 遺伝子を使用した(Hebart *et al.*

2003a;Hebart *et al.*2003b)。標準的なバーコード領域といわれる CO I 遺伝子の 5'末端約 650 塩基対を増幅するためのプライマーセットは、Folmer *et al.* (1994)の LCO1490 (5'-GGTCA ACAAA TCATA AAGAT ATTGG-3') と HCO2198(5'-TAAAC TTCAG GGTGA CCAAA AAATCA-3')を用いた。PCR 反応液の組成は、3.0  $\mu$  L の 10 $\times$ ExTaq バッファー (TaKaRa Bio,shiga,Japan)、2.4  $\mu$  L の 25 mM MgCl<sub>2</sub>、2.5 mM dNTPs、10mM に調整したプライマーペアをそれぞれ 1.5  $\mu$  L、0.3  $\mu$  L の Ex Taq DNA polymerase、10 ng の鋳型 DNA とし、全体量が 30  $\mu$  L となるように滅菌水を加えた。PCR 反応は、初めに 94 $^{\circ}$ C で 2 分間の熱変性を行った後、94 $^{\circ}$ C  $\cdot$  30 秒の熱変性、50 $^{\circ}$ C  $\cdot$  30 秒のアニーリング、72 $^{\circ}$ C  $\cdot$  1 分の伸長反応を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。その後、72 $^{\circ}$ C で 10 分間伸長反応を行った。PCR 反応物は 1.2%アガロースゲルをもちいて電気泳動し、EtBr 染色によって、CO I 遺伝子が増幅されたことを確認し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて増幅された DNA の精製を行った。

精製された DNA 断片の塩基配列は、BigDye Terminator Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems,Los Angeles,USA)を用いた、3'末端蛍光標識ジデオキシヌクレオチド・ターミネーター法により決定した。PCR 反応液の組成は、3.5  $\mu$  l の BigDye Terminator buffer、1.0  $\mu$  l の Ready Reaction Mix、10ng の CO I 断片、3.2mM のプライマーLCO1490 または HCO2198 を 1  $\mu$  L とし、全体量が 20  $\mu$  L となるよう滅菌水によって調節した。PCR 反応は、96 $^{\circ}$ C で 1 分間熱変性させたのち、96 $^{\circ}$ C  $\cdot$  10 秒の熱変性、50 $^{\circ}$ C  $\cdot$  5 秒のアニーリング、60 $^{\circ}$ C  $\cdot$  2 分の伸長反応を 1 サイクルとし、それを 25 サイクル行った。PCR 反応後、サンプルはエタノール沈殿法による精製を行い、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて、塩基配列の決定を行った。得られた CO I 遺伝子の塩基配列は、Chromas Lite ソフトウェア (Technelysium,South Brisbane,Australia)を用いて、目視により細部の編集を行った。

### 糞サンプルの採集

調査地域内におけるラインセンサスに加え、環境省トキ・モニタリングチームによるトキの位置情報をもとに、トキの探索を行った。トキを発見した後、探餌、採餌、および休

息行動を攪乱しないよう観察し、排泄と排泄場所を確認した。トキが飛去したことを確認した後、排泄場所で糞の採集を行った。採集した糞サンプルは、冷蔵して実験室に持ち帰り、-30℃で冷凍保存した。なお、以降の解析は、採餌環境の季節的変化と農事暦に合わせて、1年間を下記に示す5期に分けて行うこととし、I期：19サンプル、II期：20サンプル、III期：19サンプル、IV期：19サンプル、V期：19サンプル、合計96サンプルを無作為に選択して実験に供試した。

I期：5月～7月(農繁期；稲株の成長)

II期：8月～9月(農繁期；稲株の成長・開花・結実；トキが水田に入れない時期)

10 III期：10月～11月(農閑期；稲刈り後～水田への水入れ；非積雪期)

IV期：12月～2月(農閑期；稲刈り後～水田への水入れ；積雪期)

V期：3月～4月(農繁期；水田への水入れ・代掻き～田植え)

#### 糞サンプルからのDNA抽出

15 糞サンプルを解凍後、糞中のDNA残渣に偏りがないように、氷上で良く混合した。混合したサンプルから180~220mgを量り取り、実験に供試した。DNAの抽出はQIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)を用いて行った。

#### DNA増幅とシーケンシング

20 トキは、魚類や両生類などの脊椎動物だけでなく、昆虫類やクモ類などの無脊椎動物も広く捕食していると考えられている。しかし、分類群普遍的に脊椎動物と無脊椎動物両方のDNA断片を増幅可能なプライマーは存在しない。そのため、脊椎動物と無脊椎動物それぞれに対応した2つのプライマーセットを使用した。脊椎動物のDNA増幅はShehzad *et al.* (2012)に従い、ミトコンドリアDNAの12S領域中の約100bpを増幅するプライマーセット

25 12SV5F(5'-TAGAACAGGCTCCTCTAG-3')と12SV5R(5'-TTAGATACCCCACTATGC-3')を用



いた。加えて、予備実験の結果から、脊椎動物の DNA 増幅を行うプライマーセットを用いた場合、トキ由来の DNA が多量に増幅されてしまうことが明らかになったため、Vestheim & Jarman (2008)に従ってトキ由来の DNA 断片の増幅をブロックするプライマー（以下ブロッキングプライマー）12SV5R-blkN.nippon-3'c3(5'-CTATGCCTAGCCCTAAATCTTGATAX-3')を

5 設計し、併せて利用した。無脊椎動物の DNA 増幅は Zeale *et al.*(2011)に従い、ミトコンドリア DNA の CO I 領域中の 150bp を増幅するプライマーセット ZBJ-ArtF1c (5'-AGATA TTGGA ACWTT ATATT TTATT TTTGG-3')と ZBJ-ArtR2c(5'-WACTA ATCAA TTWCC AAATC CTCC-3')を用いた。なお、フォワードプライマーに Hamady *et al.*(2008)から任意で

10 選出した MID タグ 96 個をそれぞれ付加することで、各サンプルのシーケンス結果の識別を可能にした。PCR 反応液の組成は、Multiplex PCR Master Mix を 6.0  $\mu$ l、2mM に調整した

フォワードプライマーを 1.2  $\mu$  L、20mM に調整したリバースプライマーを 0.12  $\mu$  l、50ng/ $\mu$  l 以下に調整したサンプル DNA を 1.0  $\mu$  l とし、プライマーセット 12SV5F と 12SV5R を利用する場合のみ 10mM に調整したブロッキングプライマー0.24  $\mu$  l を加え、全体量が 10  $\mu$  l となるよう滅菌水によって調整した。PCR 反応は、プライマーセット 12SV5F と 12SV5R を

15 使用する場合、95°C・15 分間の熱変性の後、94°C・30 秒の熱変性、57°C・1 分 30 秒のアニーリング、72°C・1 分の伸長反応を 1 サイクルとし、それを 35 サイクル行い、最後に 72°C で 10 分間の伸長反応を行った。プライマーセット ZBJ-ArtF1c と ZBJ-ArtR2c を使用する場合には、95°C・15 分間の熱変性の後、94°C・30 秒の熱変性、57°C・1 分 30 秒のアニーリング、72°C・1 分の伸長反応を 1 サイクルとし、それを 45 サイクル行い、最後に 72°C で 10

20 分間の伸長反応を行った。96 サンプルの PCR 産物をプライマーセットごとに 1 つのチューブにまとめ、ExoSAP を加えた後、37°C で 15 分間インキュベートすることで未反応のプライマーや dNTPs などの短断片を除去し、80°C で 15 分間インキュベートすることで酵素の不活性化を行った。その後、Roche High pure PCR Products Purification Kit(Roche Diagnostic, Basel, Switzerland)と Agencourt AMPure XP Kit(Beckman Coulter, Brea, CA)を用いて、サンプルの精

25 製を行った。さらに、High Sensitivity DNA KitSanta (Agilent Technologies,Clara, CA)を用いて、

精製された PCR 産物の定量を行うとともに、標的外領域の DNA 断片が多量に増幅されていないことを確認した。シーケンシングは Ion PGM Sequencing 200 Kit v2 と Ion 318 Chip(Life Technologies)を用いて、プロトコルに従い Ion PGM Sequencer(Life Technologies)によって行った。

5

## DNA バーコーディング

Clident ソフトウェア(Tanabe & Toju 2013)を用いて、得られた塩基配列を MID タグによってサンプル毎に分け、プライマー配列を除去するとともに、以下の条件：(1)配列の長さが 100bp 未満である(2)平均の信頼度が 20 である(3)MID タグの信頼度が 20 以下である、  
10 に従ってフィルタリングを行い、条件に 1 つでも当てはまる塩基配列は、解析から除外した。更に、信頼度 20 以上が 3 つ以上連続して出現するまで 3'末端のトリミングも行った。その後、assams-assembler を用いてサンプル内及びサンプル間でのアセンブルを行った。アセンブルが終了したコンセンサス配列について、e-value < 1.0E-25 に設定し、Blast2Go による NCBI nucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を用いた BLAST 検索を行い、  
15 同性の高い分類群を明らかにした。なお、佐渡での生息が確認されていない種が示された場合には、分類レベルを属もしくは科まで上げて記載することとした。本研究では、佐渡島における餌候補生物の塩基配列情報データベースの作成が現時点で完成していないため、NCBI nucleotide database を用いた相同性検索のみを行った。

## 20 食性解析

サンプリングや実験操作中のコンタミネーション及び、シーケンスエラーが生じる確率を低下させるために、以降の解析は塩基配列が 10 リード以上得られた餌種について行うこととした。DNA バーコーディングを行った後に、各期で得られた総配列数に対する各餌種由来の配列数の割合、及び、各期で解析した全糞サンプル数に対する各餌種が出現した糞  
25 サンプル数の割合の二つを算出し、トキ利用する餌種の評価を行った。

次世代シーケンサーを用いて得られた DNA 配列数の構成割合は、餌のバイオマスの構成割合を反映しているといわれている(Pompanon et al. 2012)ことから、各期で得られた総配列数のうち、各餌種由来の塩基配列の割合を示すことで餌構成の量的な推定を目指した。しかしながら PCR 効率及びシーケンサーによって得られる配列数は、消化状態や組織における DNA のコピー数の種ごと違いのような生物学的条件、更にはプライマー結合部位における種による相同性の違いのような技術的条件によって影響を受ける懸念がある(Pompanon et al. 2012)。そこで、次世代シーケンサーを用いた食性解析を行う場合には、上記のような原因によるバイアスを減少させ、餌種の構成や多様性をより正確に表現するために、各期で解析した全糞サンプル数に対する各餌種が出現した糞サンプル数の割合を併せて示す傾向がある(Soininen et al. 2009; Raye' et al. 2011; Shehzad et al. 2012)。したがって、本研究においても、より実際に近いトキの食性を表すために、各餌種由来の配列数の割合と共に、各餌種が出現した糞サンプルの数の割合も示すこととした。

### 餌生物の環境選択性

約 1272 m<sup>2</sup>の秋耕起を行っていない水田において、30 のプロットを設定し、生物の採集と物理環境の調査を行った。生物は、地表の生物の見つけ取りを 2 分間行った後に、10cm × 10cm × 10cm の土壌を掘りとりソーティングを行うことで採集した。物理環境調査の項目としては、湛水率、植被率、草丈、稲株数、平坦部被度、凸凹部被度、土壌硬度を設定し、それぞれ測定した。土壌硬度については、プロット内でランダムに設定した 3 ヲ所において測定し、その平均値を算出することで決定した。

得られたデータについては正準対応分析(Canonical Correspondence Analysis: CCA)を用いて各種環境条件との関係を解析し、餌生物の環境選択性を明らかにした。

## 結果

25 餌候補生物の塩基配列情報データベース作成

出来る限り種が重複しないように餌候補生物の採取を行った結果、採取された餌候補生物は、5月14個体、6月85個体、7月39個体、8月73個体、9月13個体、10月15個体、11月10個体、12月12個体となった。採取された生物を同定した結果、26目66科104属の114種が示された（表1）。加えて、1個体は目レベル、4個体は科レベル、19個体は属レベルの同定にとどめた。また、表1には、同定したサンプルに関し、図鑑に記載されている標準的な体サイズも併せて示した。餌候補生物の体サイズについては、既往の研究において（寺島 2010）、目視観察では判別できない大きさの基準とされている30mm以下の生物が107種で、同定された生物全体の94%を占めた。

COI 遺伝子領域の塩基配列決定によるデータベースの作成は、上記の67科全てを網羅するように選択して行われたが、一部PCR増幅の失敗などにより、最終的にシーケンスまで成功したのは、5綱10目23科24種に属する24種のみとなった。

#### DNA バーコーディング法による食性解析

供試した96の糞サンプルのうち、最終的に餌種の塩基配列情報が得られた糞サンプル数は、I期13サンプル、II期12サンプル、III期16サンプル、IV期12サンプル、V期14サンプル、合計67サンプルであった。塩基配列情報が得られなかった理由としては、糞の劣化により十分なPCR増幅が行われなかったこと、シーケンシングチップへのローディング効率の低さ等、技術的な問題に起因して塩基配列の読み取りに失敗したサンプルがあったためである。餌生物の塩基配列が得られた67サンプルについて、1年間に検出された種をまとめると、種数の合計は、脊椎動物で8種と、無脊椎動物で76種となった。そのうち、生活史の中で寄生を行う時期がある小型のハエやハチ目の昆虫、動物プランクトンの一種といった明らかにトキの直接的な餌ではない5種を除外すると、無脊椎動物は71種となった（表2）。検出された生物種を分類群ごとにまとめると、脊椎動物はコイ目に属するドジョウ、タモロコ、無尾目に属するアマガエル、アカガエル属 sp.、ツチガエル、ウシガエル、モリアオガエル、有尾目に属するイモリ科 sp. が検出された。無尾目においては、佐渡に生

息するといわれる種（アマガエル、ヤマアカガエル、ツチガエル、ウシガエル、モリアオガエル）のほとんどすべてが検出された。無脊椎動物においては、エビ目に属するアメリカザリガニ、ワラジムシ目に属するミズムシ、オオムカデ目に属する *Scolopocryptops* 属 *sp.*、コウチュウ目ではオサムシ科やガムシ科、コメツキムシ科に属する 14 種、トンボ目に属するイトトンボ科 *sp.*、バッタ目に属するオナガササキリ、ミツカドコオロギ、フキバッタ亜科 *sp.*、ナナフシ目に属するニホントビナナフシ、カメムシ目に属するマツモムシ属 *sp.* 2 種、ハエ目ではカ科やヌカカ科、ユスリカ科、ガガンボ科、ヤチバエ科、ヤドリバエ科、アブ科、ハナアブ科、ミバエ科、キモグリバエ科、ハモグリバエ科、ミギワバエ科、ショウジョウバエ科、イエバエ科、フンコバエ科に属する 34 種、チョウ目ではコウモリガ科やハマキガ科、ツツミノガ科、ヤマユガ科、コブガ科、ヤガ科に属する 12 種が検出された（表 2）。各期で出現した種数は I 期 27 種、II 期 29 種、III 期 49 種、IV 期 26 種、V 期 32 種となった。検出された無脊椎動物の中で、これまで目視観察で識別不能とされてきた体サイズ 3mm 以下の種は 57 種であり、約 80% を占めた。

#### 食性解析

15 各期で得られた総配列数に対する各餌種由来の配列数の割合を 10% ごとに区切り、出現した種を各期割合の低い順で以下に示す。10% 以下の種は、I 期にハエ目に属する 16 種、コウチュウ目に属する 2 種、チョウ目に属する、バッタ目に属するオナガササキリ、コイ目タモロコ、ワラジムシ目ミズムシ、エビ目アメリカザリガニ、無尾目ウシガエル、II 期にハエ目に属する 10 種、無尾目 4 種、コウチュウ目に属する 3、有尾目イモリ科 *sp.*、コイ目

20 タモロコ、エビ目アメリカザリガニ、チョウ目コブガ科 *sp.*、ナナフシ目ニホントビナナフシ、III 期にハエ目に属する 23 種、コウチュウ目に属する 12 種、チョウ目に属する 4 種、コイ目タモロコ、エビ目アメリカザリガニ、無脊椎動物 *sp.*、無尾目 3 種、IV 期にカメムシ目 2 種、コウチュウ目に属する 6 種、ムカデ目ナメシムカデ科 *Scolopocryptops* 属 *sp.*、ハエ目に属する 7 種、バッタ目に属する 2 種、トンボ目イトトンボ科 *sp.*、エビ目アメリカザリ

25 ガニ、無尾目に属する 2 種、V 期にチョウ目に属する 6 種、ハエ目に属する 15 種、コウチ

ユウ目に属する4種、コイ目タモロコ、無脊椎動物 sp.1、無脊椎動物 sp.2、エビ目アメリカザリガニ、無尾目ウシガエルが検出された。11%-20%の種は、I期ではアカガエル属 sp.、ハマダラカ、II期ではハマダラカが検出され、III期からV期にかけては検出されなかった。21%-30%の種はI期からIV期にかけては検出されず、V期にハマダラカが検出された。

- 5 31%-40%の種は、I期からIV期にかけては出現せず、V期にドジョウが検出されたのみだった。41%-50%の種は、II期に検出されたドジョウのみだった。51%-60%の種は、I期とIII期に検出され、どちらもドジョウだった。61%-70%、71%-80%の種は1年を通じて検出されなかった。81%-90%の種は、IV期に検出されたドジョウのみだった。91%-100%の種は1年を通じて検出されなかった(図2)。次に、各期で解析した全糞サンプル数に対する
- 10 各餌種が出現した糞サンプル数の割合を10%ごとに区切り、出現した種を各期割合の低い順で以下に示す。10%以下の種は、I期でワラジムシ目ミズムシ、コウチュウ目ヒメゲンゴロウ、バッタ目オナガササキリ、ハエ目に属する7種、チョウ目 sp.、II期で無尾目4種、コウチュウ目に属する2種、ハエ目に属する4種、コイ目タモロコ、ナナフシ目ニホントビナナフシ、III期でモリアオガエル、タモロコ、チョウ目に属する2種、ハエ目に属する
- 15 15種、コウチュウ目に属する6種、エビ目アメリカザリガニ、IV期でオナガササキリ、ハエ目に属する4種、トンボ目イトトンボ科 sp.、バッタ目フキバッタ亜科 sp.、カメムシ目マツモムシ属 sp.2、コウチュウ目に属する3種、ムカデ目メナシムカデ科 Scolopocryptops 属 sp.、V期でチョウ目に属する7種、コウチュウ目に属する2種、ハエ目に属する2種、無脊椎動物 sp.1、無脊椎動物 sp.2 が検出された。11%-20%の種は、I期でコイ目タモロコ、ハ
- 20 エ目に属する4種、ガムシ属 sp.、アカガエル属、II期でアメリカザリガニ、イモリ科、ガムシ属 sp.、キボシアブ属 sp.、III期でチョウ目に属する2種、ハエ目に属する4種、ナガゴミムシ亜科 sp.4、アトキリゴミムシ亜科 sp.、ガムシ属 sp.、ツチガエル、アマガエル、ゴモクムシ亜科 sp.1、無脊椎動物 sp.、IV期でハエ目に属する2種、アカガエル属、オサムシ科 sp.、ガムシ属 sp.、ミツカドコオロギ、マツモムシ属 sp.1、ナガゴミムシ亜科 sp.1、アメリ
- 25 カザリガニ、V期でハエ目に属する5種、タモロコ、ミヤコモンユスリカ、アメリカザリ

ガニ、が検出された。21%-30%の種は、I期でミバエ科 sp.、ガガンボ属 sp. 1、ウシガエル、II期でガガンボ科 sp.、IV期でハマダラカ、ウシガエル、V期でシマクロハナアブ、オサムシ科 sp.、ナガゴミムシ亜科 sp.1 が検出され、III期には検出されなかった。31%-40%の種は、I期でアメリカザリガニ、II期でガガンボ属 sp.4、コブガ科 sp.、III期でコメツキムシ科 sp.、

5 双翅目 sp.1、V期でウシガエルが検出され、IV期には検出されなかった。41%-50%の種は、II期でシマクロハナアブ、III期でユスリカ科 sp.2、コウモリガ科 sp.、V期でガガンボ属 sp.4、ガガンボ科 sp.が検出され、I期とIV期には検出されなかった。51%-60%の種はIII期にユスリカ科 sp.3、アブ科 sp.2 が検出されたのみだった。61%-70%の種は、I期にガガンボ属 sp.3、ガガンボ属 sp.2、III期にゴモクムシ亜科 sp.2 が検出され、II期とIV期、V期には検出され

10 なかった。71%-80%の種は、II期でガガンボ属 sp.2、双翅目 sp.1、V期で双翅目 sp.1、ガガンボ属 sp.3 が検出され、I期とIII期、IV期には検出されなかった。81%-90%の種は、I期でハマダラカ、II期でガガンボ属 sp.3、双翅目 sp.2、V期でガガンボ属 sp.2 が検出され、III期とIV期では検出されなかった。91%-100%の種は、I期で双翅目 sp.、ドジョウ、II期でドジョウ、ハマダラカ、III期でドジョウ、IV期でドジョウ、V期でハマダラカ、双翅目 sp.2、

15 ドジョウが検出された (図 3)。

各期で得られた総配列数に対する各餌種由来の配列数の割合、及び各期で解析した全糞サンプル数に対する各餌種が出現した糞サンプル数の割合で共通して見られる傾向としては、10%以下の種が最も多く、配列の割合や糞に対する出現頻度が増加するにつれて種数は減少するということが、更に、各期における配列の割合や糞に対する出現頻度が最も高い種

20 群には、ドジョウが必ず含まれるということが挙げられる。一方で、各期で得られた総配列数に対する各餌種由来の配列数の割合が 30%以上を示す種は 1 年を通じて全てドジョウであったのに対し、各期で解析した全糞サンプル数に対する各餌種が出現した糞サンプル数の割合では、出現頻度が 30%以上を示す種は脊椎動物、無脊椎動物を含む 17 種にのぼった。

## 25 餌生物の環境選択性

今回の調査では採集された生物の個体数が少なく、種ごとに分類した場合には解析を行うことが出来なかったため、目もしくは科レベルの大まかな分類で解析を行った。11月に採集された生物は、ワラジムシ目、ヤスデ類、ミミズ類、貝類、クモ目、陸棲のコウチュウ目、水棲のコウチュウ目、バッタ目、ガガンボ科、チョウ目の116個体、2月に採集された生物は、ヤスデ類、貝類、クモ目、陸棲のコウチュウ目、バッタ目、ガガンボ科、ミズアブ科の58個体であった。稲刈り後の11月と積雪期の2月の出現種群数や出現個体数を比較すると、どちらも2月において減少することが明らかになった。

Permutation testの結果、11月では全ての軸で有意な差がみられたが、2月では有意な差はみられなかった(11月:Pseudo-F=1.247, P値=0.024; 2月:Pseudo-F=1.128, P値=0.397)。

- 10 11月の結果について出現した生物の分類群と環境変数の関係をプロットすると、畦と推定される環境で出現する分類群と、水田面と推定される環境で出現する分類群が明瞭に区別された。畦と推定される環境では、ワラジムシ目、ヤスデ類、ミミズ類、陸棲のコウチュウ目、バッタ目、チョウ目がプロットされた。水田面と推定される環境では、湛水率と稲株数が少ない場合にはガガンボ科、湛水率と稲株数が多い場合には水棲のコウチュウ目、
- 15 クモ目、貝類がプロットされた。

## 考察

### DNA バーコーディング法の有効性

- これまでに得られているトキの糞あるいは胃内容物中から出現した餌生物の形態学的な
- 20 解析および目視観察の結果に基づき、従来、トキの餌生物種はトキの餌種はドジョウなどの魚類、カエル、イモリなどの両生類、タニシなどの貝類、サワガニやアメリカザリガニなどの甲殻類、ミミズなどの貧毛類、ガムシなどの水棲甲虫類、ケラなどなどのバッタ類とされてきた。(佐藤 1978; 環境省 私信)。今回のDNA バーコーディング法を用いた食性
- 25 解析は、これらの生物が属する分類群をほとんどカバーできた上に、オサムシ科やチョウ目、ハエ目などの、これまで餌生物としての利用が明らかになっていなかった小型の餌生



物種も明らかにすることができた (表 3)。特に、昆虫類の幼体は外骨格を持たないため消化の影響を受けやすく、これまでの形態学的な解析では識別が困難であったが、本研究ではこれらの種が数多く検出された。また、これまでの直接観察では体サイズが 3cm 以下の餌種のほとんどが識別不能であったが、今回検出された無脊椎動物のほとんどは体サイズ

5 3cm 以下であった。これらのことから、DNA バーコーディング法はトキの食性解析においても非常に有効な方法であり、これまでに得られていた食性情報のうち、不明だった部分を明らかにすることができたといえる。一方で、本研究の結果から、DNA バーコーディング法による食性解析におけるいくつかの問題点も示された。一点目に、プライマー結合部位の種による相同性の違いに起因して、貝類やミミズ類が検出されず、これらの種群が餌

10 種として過小評価されている可能性がある。二点目としては、多くの糞から検出されたユスリカやハマダラカなどの体サイズの非常に小さなハエ目の種については、トキの餌となる生物が捕食した生物 (二次的な捕食) の可能性も否めない。しかし、トキの餌となる生物による組織の破碎・消化も加わることで、DNA がより一層劣化していることや、トキの餌と比較すると組織の残存量が非常に少ないことから、シーケンスによって得られるリー

15 ド数は少ないと想定され、解析から除外されている可能性が高いことから、今回は考慮しなかった。ただし、本研究のような DNA 情報をベースにした食性解析では、二次的な捕食とみられる生物もしばしば検出されており (O'Rorke et al. 2012; Jo et al. 2013)、潜在的なエラーとして認識しておく必要もあるだろう。三点目としては、餌候補生物の塩基配列情報データベースの不足による、同定精度の低さが挙げられる。グローバルな塩基配列情報

20 データベースの構築は盛んに行われており、GenBank に登録されている後生生物の塩基配列情報データは 152798 種にわたる (NCBI HP) が、特に昆虫類など多様な種を有する分類群では、種等の詳細な分類群レベルでの識別が難しい。生物は種によって選好する環境が異なるため、トキの餌場環境を評価・管理する際にも、種レベルでの餌種の情報は必要不可欠である。本研究でも、佐渡に生息する餌候補生物の塩基配列情報データベースの作成を試

25 みたが、未だ完成には至っておらず、今後データベースの作成を急ぎ、同定精度を向上さ

せなければならない。

### DNA バーコーディング法により明らかになったトキの食性

- 以後は、各期で得られた総配列数に対する各餌種由来の配列数の割合を餌利用の頻度、
- 5 各期で解析した全糞サンプル数に対する各餌種が出現した糞サンプル数の割合を餌のバイオマス量として扱うこととする。餌利用の頻度、餌のバイオマス量ともに、出現頻度 10% 以下の種が最も多かったのは、トキの採餌行動の特徴に起因するものと考えられる。Rojas *et al.* (1997)によると、トキ類は嘴の触覚に頼った採餌行動をとっているとされている。このことから、トキは餌を選択的に捕食しているのではなく、嘴で偶然に感知した様々な餌種を
- 10 少量ずつ捕食している可能性が高い。さらに、餌利用の頻度、餌のバイオマス量ともに、割合が最も高かった種には必ずドジョウが含まれており、主要な餌であることが推察された。他方で、餌利用の頻度として高い出現頻度を示す種は、無尾目やハエ目に属する多様な種が検出されたが、バイオマス量において高い出現頻度を示したのはドジョウのみであった。このことから、餌のバイオマス量としては大部分をドジョウに依存している一方で、
- 15 バイオマス量は少ないながらも無尾目やハエ目に属する多様な生物種を高頻度で利用していることが推察される。飼育下では、ドジョウに偏った餌の摂取が原因とみられるビタミン B1 欠乏症が発生しており（環境省）、トキにとってこれら多様な脊椎動物や無脊椎動物の利用は、栄養素を補給するという側面から非常に重要であると考えられる。

### 餌生物の環境選択性

- 20 DNA バーコーディング法によって検出された種に焦点をあてると、畦環境では選択される環境にばらつきは少なかった。一方で、水田面では稲株数や湛水率で選択される環境にばらつきが生じ、水田面の環境の均質化は一部の分類群の生物には負の影響を与えることが示唆された。また、トキの餌となる生物は畦環境と水田面環境どちらにも生息していることが明らかになり、これまでの自然再生で対象となってきた水田面以外にも視点を向け
- 25 て事業を行っていく必要性が明らかになってきただろう。今回明らかになった問題点とし

ては、冬期という生物の活動性が低下する時期に調査を行ったため、十分なサンプル数が採集できなかったことが挙げられる。よって、今後は調査水田やプロット数の増加が望まれる。また、農繁期にも同様の調査を行うことができれば、一年を通じて餌生物の環境選択性を明らかにすることができ、季節に応じたより具体的な餌場管理方法の提案につなげることができるだろう。

#### 今後の餌場管理に向けて

本研究で明らかになったトキの食性情報を踏まえて、今後のトキの餌場管理方法を検討していくためには二つの柱が考えられるだろう。一つ目は、トキが生存するだけのエネルギー量を満たすために、今回検出された主要餌種であるドジョウを中心として、トキが利用できる生物量の増加を図ることだ。特に、夏期においては、餌の飲み込み回数は他の時期と比較しても大きな差はないが、採餌エネルギー効率のみが下がり、厳しい餌条件であることが明らかになっている（遠藤 未発表）。加えて、夏期は、水田のイネが繁茂しており、トキが水田に入って採餌を行うことが困難になり、調整水田や畦での採餌が増加することが報告されている（中津ほか 2012）。このことから、夏期にはトキが利用できる水域が縮小し、ドジョウなどの魚類の利用が減少することで、採餌エネルギー効率が低下していると考えられる。そこで、この時期にドジョウの利用を増加させることができれば、エネルギー効率の上昇に直接的に貢献できると考えられる。そのためには、餌種のバイオマス量の増加を目指す事業と平行して、トキが利用しやすい開放的な水辺環境を整備していく必要もあるだろう。二つ目は水田帯に生息する生物種全体の種数の増加を図ることだ。

前述のように、栄養学的な側面から、多様な餌種は重要であるが、近年では水田の基盤整備による環境の均質化から、生物多様性の減少が懸念されている(Fujioka and Lane 1997)。加えて、今回の研究から、水田面の均質化は特定の分類群に負の影響を与えることも示唆された。そこで、ビオトープの整備や江の設置のような自然再生事業の取り組みや、秋耕起や冬期湛水といった水田面の均質化を招く恐れのある事業の見直しを行うことで、生物多様性の向上に留まらず、トキの餌場として好適な環境を創出することも可能といえる。

生物多様性の保全・向上は、佐渡市が2012年から「トキと暮らす島 生物多様性佐渡戦略」  
として90年間の目標期間で打ち出している基本方針の1つでもある（佐渡市2012）。今回  
の結果により、生物多様性保全がトキの採餌環境整備と結びついたことは、本研究の最大  
の成果といえよう。

5

10

15

20

25

## 謝辞

新潟大学大学院自然科学研究科の関島恒夫准教授には、本研究を進めるにあたり始終ご指導をいただきました。また、新潟大学農学部の箕口秀夫教授、本間航介准教授には本論文をまとめる上でのご指導、ご協力をいただきました。

環境省、および佐渡トキモニタリングチームの皆様方には調査地点の情報を提供していただき、現地調査時にもご協力をいただきました。また、佐渡市役所農林水産課生物多様性推進室の皆様方には、農地情報の提供ならびに調査水田の許可申請にあたりご協力をいただきました。さらに、佐渡市の農家の方々には調査水田を提供していただきました。

京都大学農学部の井鷲裕司教授、安藤温子氏には実験器具の提供、実験の協力、ならびに本論文をまとめる上で多くの助言をいただきました。

新潟大学自然科学研究科の石庭寛子氏、(社)佐渡生き物語り研究所職員の大石麻美氏、には、調査の協力、ならびに本論文をまとめる上で多くの助言をいただきました。新潟大学大学院自然科学研究科動物学研究室の在学生、卒業生には調査の協力、ならびに助言をいただきました。

以上の方々に、心より御礼申し上げます。

なお本研究は、佐渡市による平成 26 年度生物多様性学術研究等奨励金の助成を受けて行われました。

## 引用文献

- 5    Armstrong DP, Davidson RS, Dimond WJ, Perrott JK, Castro I, Ewen JG, Griffiths R,  
Taylor J (2002) Population dynamics of reintroduced forest birds on New Zealand  
islands. *Journal of Biogeography*, 29(5-6), 609–621
- Bar-David S, Saltz D, Dayan T, Shkedy Y(2008) Using spatially expanding populations  
as a tool for evaluating landscape planning : The reintroduced Persian fallow deer  
10    as a case study. *Journal for Nature Conservation*, 16, 164–174.
- BirdLife International (2001) Threatened birds of Asia: the BirdLife International Red  
Data Book. BirdLife International, Cambridge, U.K.
- Bohmann, K., Monadjem, A., Noer, C. L., Rasmussen, M., Zeale, M. R., Clare, E., ... &  
Gilbert, M. T. P. (2011). Molecular diet analysis of two African free-tailed bats  
15    (Molossidae) using high throughput sequencing. *PLoS One*, 6(6), e21441.
- Brown DS  
(2011) Molecular analysis of the trophic interactions of British reptiles. PhD Thesis,  
Cardiff University.
- Deagle DE, Kirkwood R, Jarman SN (2009) Analysis of Australian fur seal diet by  
pyrosequencing prey DNA in faeces. *Molecular Ecology* 18, 2022–2038.
- 20    Deagle DE, Chiaradia A, McInnes J, Jarman SN (2010) Pyrosequencing faecal DNA to  
determine diet of little penguins: is what goes in what comes out? *Conservation  
Genetics*. 11(5), 2039-2048.
- Decker ED, Bath AJ, Simms A, Lindner U, Reisinger E (2008) The Return of the King or  
Bringing Snails to the Garden? The Human Dimensions of a Proposed Restoration  
25    of European Bison (*Bison bonasus*) in Germany. *Restoration Ecology*, 18(1), 41–51.

- Endo C and Nagata H (2013) Seasonal changes of foraging habitats and prey species in the Japanese Crested Ibis *Nipponia nippon* reintroduced on Sado Island, Japan. *Bird Conservation International*, 23, 445-453
- 5 Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vriegenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- Fujioka M, Lane SJ (1997) The impact of changing irrigation practices in rice field on frog populations of the Kanto Plain, central Japan. *Ecological Research*, 12(1), 101-108.
- 10 Hebert D. N. Paul, Cywinska Alina, Ball L. Shelly, deWaard R. Jermy (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *The Royal Society*. 270, 313-321.
- Jo H, Gim J, Jeong K, Kim H, Joo G (2013) Application of DNA barcoding for identification of freshwater carnivorous fish diets: Is number of prey items dependent on size class for *Micropterus salmoides*? *Ecology and Evolution*. 4(2),
- 15 219-229.
- 環境省(2002) 新・生物多様性国家戦略(案) 2002年3月22日公表  
(<http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=3231>) 2015年1月25日アクセス.
- 環境省関東地方環境事務室佐渡自然保護官事務所(2014) トキのすがた-野生復帰の現在- 2014年3月発行.
- 20 Li X, Tian H, Li D (2009) Why the crested ibis declined in the middle twentieth century. *Biodiversity and Conservation*, 18(8), 2165-2172
- Murray C. D, Bunce M, Cannell L. B, Oliver R, Houston J, White E. N, Barrero A. R, Bellgard I. M, Haile J (2011) DNA-Based Faecal Analysis: A Comparison of qPCR and High Throughput Sequencing Approaches. *PLoS One*. 6(10), e25776.
- 25 中津弘, 上野裕介, 永田尚志, 山岸哲 (2011) 新潟県佐渡島における放鳥トキ *Nipponia*

*nippon* 単独個体の環境利用. 野生復帰, 1, 63-70.

中津弘, 永田尚志, 山岸哲 (2012) 新潟県佐渡島中部で非繁殖期に群れ生活を営む放鳥ト

キ *Nippon nippon* の環境利用と日周行動. 野生復帰, 2, 63-73

NCBI The NCBI Taxonomy Homepage

5 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html>) 2015年1月25日アクセス

Pegerd A, Miquel C, Valentini A, Coissac E, Bouvier F, Francois D, Taberlet P, Engel E, Pompanon F (2009) Universal DNA-Based Methods for Assessing the Diet of Grazing Livestock and Wildlife from Feces. *Agricultural and Food Chemistry*. 57, 10 5700-5706.

Pompanon, F., B. E. Deagle, W. O. C. Symondson, D. S. Brown, S. N. Jarman, and P. Taberlet. 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology* 21, 1931–1950.

Ratnasingham S, Herbert D. N. Paul (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System 15 ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes*. 7, 355–364.

Raye', G., C. Miquel, E. Coissac, C. Redjadj, A. Loison, P. Taberlet. 2011. New insights on diet variability revealed by DNA barcoding and high-throughput pyrosequencing: chamois diet in autumn as a case study. *Ecological Research* 26, 265–276.

20 Reading RP, Miller B, Shepherdson D (2013) The Value of Enrichment to Reintroduction Success. *Zoo Biology*, 32(3) 332–341.

Rojas L.M., Mcneil R., Camana T. (1997) DIURNAL AND NOCTURNAL VISUAL FUNCTION IN TWO TACTILE FORAGING WATERBIRDS: THE AMERICAN WHITE IBIS AND THE BLACK SKIMMER. *The Cooper Ornithological society*, 99, 25 191-200



- Sara M and Vittorio MD (2003) Factors influencing the distribution, abundance and nest-site selection of an endangered Egyptian vulture (*Neophron percnopterus*) population in Sicily. *Animal Conservation*, 6(4) 317-328
- 佐藤春雄 (1978) はばたけ朱鷺: トキ保護の記録. 研成社.
- 5 Seddon PJ, Armstrong DP, Maloney RF (2007) Developing the Science of Reintroduction Biology. *Conservation Biology*, 21(2), 303-312.
- Shehzad W, Riaz T, Nawaz MA, Miquel C, Poillot A, Shah SA, Pompanon F, Colssac E, Taberlet P (2012) Carnivore diet analysis based on next-generation sequencing: application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan. *Molecular Ecology*, 21(8) 1951-1965.
- 10 Soininen, E. M., Valentini, A., Coissac, E., Miquel, C., Gielly, L., Brochmann, C., ... & Taberlet, P. (2009). Analysing diet of small herbivores: the efficiency of DNA barcoding coupled with high-throughput pyrosequencing for deciphering the composition of complex plant mixtures. *Frontiers in Zoology*, 6(1), 16.
- 15 総務省統計局 (2014) 人口推計 2014年4月15日公表 (<http://www.stat.go.jp/data/index.htm>) 2015年1月25日アクセス.
- Spalton JA, Lawrence MW, Brend SA (1999) Arabian oryx reintroduction in Oman: successes and setbacks. *Oryx*, 33(2), 168-175.
- Symondson WOC (2002) Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology*, 11(4), 627-641
- 20 Tanabe and Toju H (2013) Two new computational methods for universal DNA barcoding: A benchmark using barcode sequences of bacteria, archaea, animals, fungi, and land plants. *PloS One* 8, e76910.
- 寺島 (2010) トキの採餌効率に影響を及ぼす環境要因の抽出. 新潟大学大学院自然科学研究科修士論文 (未刊行)
- 25

Valentini A, Miquel C, Nawaz MA, Bellemain E, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Cruaud C, Nascetti G, Wincker P, Swenson JE, Taberlet P. (2009) New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. *Molecular Ecology Resources*. 9(1), 51-60.

- 5 Vestheim H and Jarman SN (2008) Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples – a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Frontiers in Zoology*, 5(12).

Zeale MK, Butlin RK, Barker GLA, Less DC, Jones D (2011) Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. *Molecular Ecology*, 11(2), 236-244