

## 植物防疫基礎講座

## 植物ダニ類の標本作成法

## —(1) 標本の固定法, 簡易スライド標本及び走査電子顕微鏡用標本作成法—

北海道大学農学部応用動物学講座 齋 藤 裕  
 農林水産省果樹試験場安芸津支場 おさ かべ まさ ひろ  
 刑 部 正 博

## はじめに

ハダニやカブリダニ類など、一般に植物ダニ類と呼ばれるダニのスライド標本作成のために、従来いくつかの方法が提案されてきたが、標本の保存性の面からみればいずれも不十分といわざるを得ない。現在は、ホイヤー氏液(ガムクロラル液: 蒸留水 25 g + アラビヤゴム 15 g + 抱水クロラル 100 g + グリセリン 10 g を乳鉢でよく混合して、重ねたガーゼでろ過する)を封入液としたスライド標本を十分乾燥したうえで、カバーガラスの周囲をプラスチックで封じるといった方法が一般に採用されている(江原・真梶, 1975)。しかし、この方法で作った標本は、数年で気泡が侵入して検鏡に耐えない状態になってしまうことが多い。ガムクロラル液は、昆虫分類学においては永久標本封入液としては不適当とされ、現在は一時的な標本にのみ使用されている(WILEKEY, 1990)。しかし、ダニ類においては、その虫体の微小さ、外皮の軟弱さのために体液の除去と外皮の乾燥が難しく、カナダバルサムやユパラルなどの安定性の高いマウント液を使用することが困難とされ、やむを得ずこの封入液を使用してきたという経緯があった。

ところで、ホイヤー氏液によってハダニのスライド標本を作る際にも、虫体を70%エタノールで固定し、そのまま一定期間液浸標本として保存する場合が多い。これは、生体を逐一スライド標本にすることが手間や時間の関係で実際には困難なことが多いことによる。しかし、70%エタノール(一般に少量のグリセリンを加えるが、これはアルコールがすべて蒸発してしまったときに標本を乾燥させないための処置である)で固定して保存された液浸標本からは、ホイヤー氏液でも必ずしもよいスライド標本を作ることはできない。特にダニの脚を十分に伸展させるのが難しく、脚毛を分類同定のメルクマルとすることの多いハダニ類では問題が多かった。

さらに、ハダニをはじめとする植物ダニ類の外皮の軟

弱性は、微細形態を走査電子顕微鏡(以後、SEMと略す)で観察するための標本作成過程でも問題となっており、一般に使われている臨界点乾燥法が適用できず、クライオシステムもしくは凍結乾燥法に頼らざるを得ないのが現実である(CROOKERら, 1985)。

こうした諸点が植物ダニ類の研究進展を阻む一因ともなっていた。例えばハダニ類の形態の地域変異を調べるといった大量の標本を供試しなければならない研究の発展を停滞させ、また半永久的に標本を残すことが要求される分類学においては、タイプ標本の維持・管理上の重大な障害になっていた(JEPPSONら, 1975; GUTIERREZ, 1985)。

筆者らは、従来の標本作成手順を再検討することで、新しいダニの固定法の開発を試みた結果、比較的簡便な方法を確立することができたので2回にわたってその方法を紹介する。

## I 標本の固定法

生きたダニを液中で殺して固定する場合、その固定液内において虫体ができるだけ萎縮しないことが望ましい。これは、胴体部ばかりではなく、脚や触肢についても同様である。新たに開発した固定液は、酢酸(99.5%)とメタノール(99.5%)を1:1に混合したものをその原液とする(これをMA液と呼ぶことにする)。この混合原液を蒸留水で80%に希釈した液(MA 80=酢酸:メタノール:蒸留水=2:2:1)が現在のところ最も良く標本を固定することができる。

表-1は、ナミハダニをこれまで使われてきた70%エタノールによって固定した場合と、上記のMA 80液で固定した場合の、液中における虫体の時間的変化を示している。生きたダニを固定液中に投入した直後には、いずれの液においても虫体の萎縮や脚の屈曲は少ないが、24時間以上経過した段階では両者には明らかな違いがあった。すなわち、70%エタノール中では平均で61.5%の脚が内側に強く屈曲した状態となったが(この状態では非常に標本を作りにくい)、MA 80中では脚が屈曲した例は全くなかった。つまり、MA 80がハダニを良好な状態

表-1 ナミハダニ雌成虫を2種類の固定液でそれぞれ処理した場合の脚の屈曲の程度 (SAITO and OSAKABE, 1992より)

固定液	個体数	脚の屈曲した割合 (I~IV脚平均)	
		投入後1時間	投入後24時間
70%エタノール	20	6.7%	61.5%
MA 80液	20	0%	0%

で固定することが明らかになった (SAITO and OSAKABE, 1992)。

ただし、ここで注意が必要なのは、エチルアルコールの場合には虫体が投入後直ちに液中に沈むが、MA 80液中ではむしろ液の表面に浮かぶ傾向が強い点である。この違いは、実際にダニを液浸する過程とそのまま保存する場合の双方で問題になってくる。それは、多くの標本を一度に同じ管ビン中で液浸すると、表面に浮かんだ虫体を次の標本を入れる際に破損する恐れがあること、また長期間液浸状態に保存したときに、液の蒸発とともにガラス壁面に残り残された一部の虫体が乾燥破損することである。これらを防ぐために、液浸固定処理の間によく管ビンを振るなどして虫体を底へ沈める努力をすることや、MA液中で長時間保存しないことを心がけるべきであろう。

## II 液浸標本の保存

既書に書いたように、MA液による長期保存はできれば避けたほうがよい。耐酸性の管ビン及びキャップであれば、液の完全蒸発に注意さえすれば問題は生じないが、一般によく使われている管ビンは、MA液によってキャップのパッキン (例えばWheaton社製の黒キャップのバイアル) やそのパッキンをキャップに付着させている接着剤 (例えばNE社製のシリコンパッキンバイアル) が腐食変質して、固定液中に浸潤し、虫体を覆ってしまうことがある。これを避けるために、固定後数週間以内に、保存液を70%エタノールに置換しておくことをすすめる。なお、はじめにMA液で固定されていれば、この置換によって標本が変化することはない (SAITO and OSAKABE, 1992)。なお、この処理は比較的短期間にスライド標本を作るのであれば特に必要ない。

## III ホイヤー氏液による一時的スライド標本作成法

さて、I及びIIの手続きで固定保存されたダニを、従来使われているホイヤー氏液でスライド標本にする方法について紹介しよう。ただし、既に述べたように、これ

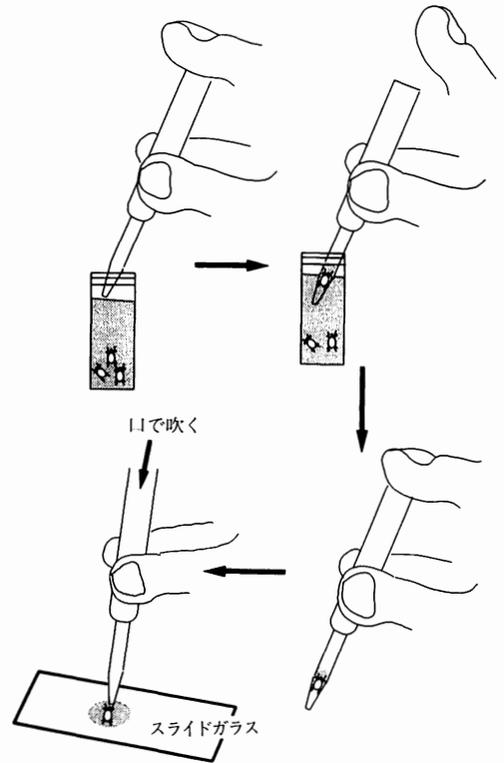


図-1 ダニをピペットを用いて移動する手順

は一時的に大量のスライド標本を作成する場合の簡便法であって、標本を長期間維持する場合には、次回の(2)永久標本作成法を参照されたい。

スライドガラス上の封入液にダニを入れる場合、MA液中で保存されていたものとMA液で固定後70%エタノール中に保存されたものでは、ホイヤー氏液中での虫体の萎縮の程度に多少の違いがある。しかし、後に述べるようにあまり重要ではないので、両者を同等に扱うことにしたい。

図-1のように、虫体は特に微小なものについては実体顕微鏡下で、ピペットによって管ビンの液中から少量の保存液 (MA 80あるいは70%エタノール) とともに吸い上げてスライドガラス上に移す。このとき、ピペットの一方の開口部を指で閉じて、そのまま先端を液中に入れ、取り出したい虫体のところへもって行ってから指を放す。このようにすると、ピペット内がほんの少し減圧されて、虫体がピペット内に吸い込まれる。吸い込まれたのを確認したら、再びピペットの上方開口部を指で押さえて、その状態でスライドガラスまでピペットを移動し、ピペット全体を手で暖めるか、あるいは上部を口で吹くことで虫体をピペットから押し出す。このようなこ

とは専門家には既知のことであろうが、意外に普及していないテクニックなので紹介しておく。

さて、スライドガラス上に保存液と一緒に取り出したダニが乾燥する前に、ホイヤー氏液を2〜3滴ほど標本上に滴下し（あるいは先にホイヤー氏液をスライドガラスに滴下しておいて、そこに標本をおいてもよい）、次に実体顕微鏡下で微針あるいは腰の強い毛（例えば人間のまつ毛やブタのまつ毛など）を使って速やかにダニの姿勢を整える。この時に虫体を完全にホイヤー氏液に沈めることが肝要である（これは生体から標本を作る場合も同様に重要）。ダニの姿勢が整ったら、カバーガラスをかける。なお、虫体をあまり押しつぶしたくない場合には、よりをほどいた絹織維片等をホイヤー氏液中に入れておく。

上記の手続きによって、ダニはそのまま脚の伸びた良好な標本になることもままあるが、多くの場合虫体がホイヤー氏液中で急激に萎縮してしまう。しかし、これは図-2に示すように、スライドガラスの裏面から先端の細いハンダゴテ（30〜40 W）で虫体付近を加熱（実体顕微鏡下で慎重に）することで伸展させることができる。なお、同じように加熱しても、70%エタノールで固定された標本では萎縮した体や脚を伸展させることは困難である。この化学的な理由は明らかではないが、MA液で処理したダニの体がエタノール固定に比べて柔軟性を保っていることと、虫体内に微小な気泡が含まれているためではないかと考えられる。

こうしてできあがった簡易標本は、40〜50°Cぐらいの乾燥器中に3〜4日維持した後に、カバーガラスのまわり

をカナダバルサム（あるいはマニキュア、江原・真梶、1975）で封じることによって標本を数年間維持できる。ただし、より長期保存のためには本講座（2）に紹介する方法によられたい。

#### IV SEM 標本作成法

従来、走査型電子顕微鏡（SEM）観察のための標本作成には、70%エタノールによる固定が行われてきた。しかし、図-3（上）にみるように、この固定法では萎縮のない標本を作成することはかなり難しい。ところが、今回開発したMA液によって固定されたダニは、図-3（下）のように生きた状態とほとんど変わらない良好な標本とすることができる。次にその方法について紹介する。

まず、ダニの固定をMA80によって行い、SEM用標本の場合には固定後速やかに、70%エタノールに置換する。さらに、時間をおかずに、虫体を10分間隔程度で75→80→85→90→95→99.5%エタノールに次々に入れかえて体内の水分を除く。この場合、虫体の入った管ピンからその前の濃度の液をピペットで排出し、次にあらか

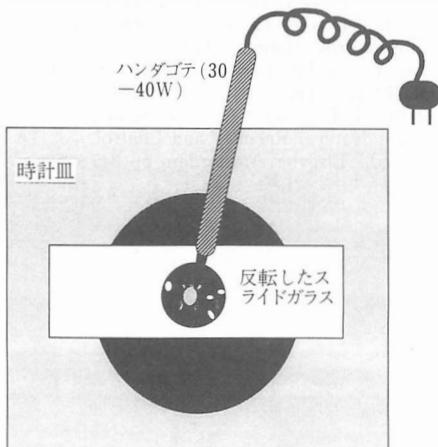


図-2 カバーガラスをかけた後で時計皿の上でスライドガラスを反転させ、ハンダゴテでダニの入っている部分を加熱して脚と体を伸展させる

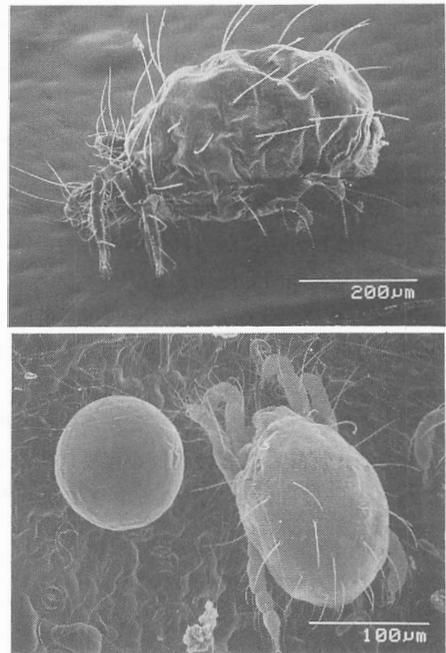


図-3 上段は70%エタノールで固定保存したナミハダニ雌を乾燥、金蒸着した標本の走査型電子顕微鏡（SEM）写真。下段はMA80で固定し、本文に記された手順で作製したナミハダニの卵と幼虫標本のSEM写真。なお、後者は固定→乾燥を寄生菜ごと行った。

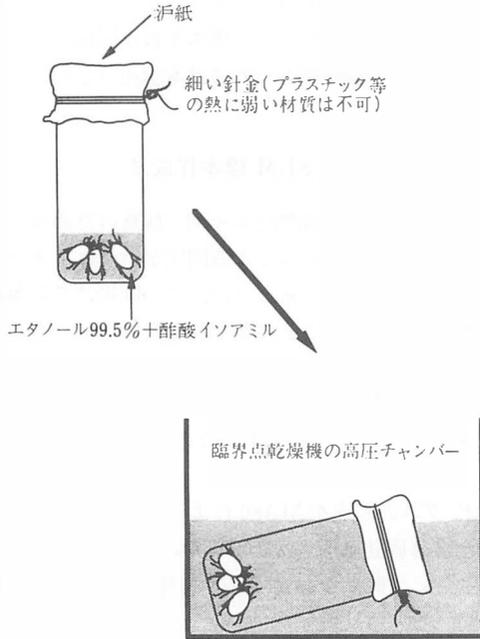


図-4 SEM用標本作成における臨界点乾燥処理の手順

じめ準備した各濃度のエチルアルコールを徐々に注入して、これを一つの濃度につき2回程度繰り返すという手順が簡便かつ有効である。99.5%までエタノールの濃度を上げたところで、必要ならそのまま保存することができる。ただし、虫体がかかなり固くなっているため、管ビンに強い衝撃を与えない注意が必要である。この段階で超音波洗浄をかけると虫体は簡単に破損するので、もしそれを必要とするほど虫体が汚れている場合には、70%エタノールの段階で短時間処理する。

次に、虫体が入った99.5%エタノール中に酢酸イソアミルを少量(エタノールの体積の10%以下)加える。この処理は、臨界点乾燥器にかける際に虫体のアルコールが蒸発しても非揮発性の酢酸イソアミルが急速な乾燥から守り、また液化炭酸ガスとの置換を容易にする効果がある。ただし、一般に行われているように99.5%エタ

ノールを酢酸イソアミルで完全に置換してしまうと虫体がひどく萎縮する。次に、以下の手順で臨界点乾燥器にかけてダニを完全に乾燥させる。既存の乾燥用のカゴは使わず、ダニをピペットで小さな管ビンに移し変えて、エタノール(+酢酸イソアミル)をできるだけ排出し、開口部を沓紙で図-4のように閉じる。この管ビンをも十分に冷却した(-10°C以下)臨界点乾燥器の高圧チャンバーに入れて乾燥器のマニュアルに従ってガス置換・乾燥処理を行えばよい。

最後に、乾燥した虫体を試料台にのせ、通常の手続きにしたがって金を蒸着すればできあがりである。なお、試料台に虫体を接着する際には実体顕微鏡下で注意深く行うこと。接着には両面テープが簡便だが、なかでも市販品ではスコッチ社製の裏紙のないタイプが、接着面の平たんを保ちやすく適している。また、接着後に脚の位置などを観察しやすいように微細な毛や針で変えることもできるが、あまり大きく動かすと脚の折損を起こすことがあるので注意したい。なお、70%エタノール固定標本に比べて、MA液固定標本のほうがこの操作が容易であり、それは乾燥後にも何らかの理由で虫体に多少の柔軟性が残されていることによると思われる。

#### 引用文献

- 1) CROOKER, A. R. et al. (1985): Spider Mites, Their Biology, Natural Enemies and Control. vol. 1A (W. HELLE and M. W. SABELIS, eds). Elsevier, Amsterdam, pp. 359~381.
- 2) 江原昭三・真梶徳純 (1975): 農業ダニ学, 全国農村教育協会, 東京, 328 pp.
- 3) GUTIERREZ, J. (1985): Spider Mites, Their Biology, Natural Enemies and Control. vol. 1A (W. HELLE and M. W. SABELIS, eds). Elsevier, Amsterdam, pp. 351~353.
- 4) JEPSON, L. R., H. H. KEIFER and E. W. BAKER (1975): Mites Injurious to Economic Plants. University of California Press, Berkeley. 614 pp.
- 5) SAITO, Y. and M. OSAKABE (1992): Appl. Entomol. Zool. 27: 427~436.
- 6) WILKEY, R. F. (1990): Armored Scale Insects, Their Biology, Natural Enemies and Control. vol. 1A (D. ROSEN, ed.). Elsevier, Amsterdam, pp. 345~352.