

植物防疫基礎講座：農業害虫としてのカイガラムシの見分け方

# カイガラムシの標本作製法

鳥取県立博物館 <sup>た</sup>田 <sup>なか</sup>中 <sup>ひろ</sup>宏 <sup>たか</sup>卓

## はじめに

カイガラムシ類の専門的な分類学の研究や、確実な同定診断を行うためにはプレパラート標本を作製することが必要である。カイガラムシ類の標本作製法については高木（1970）や河合（1980）においてもすでに紹介されているが、より広範にカイガラムシ標本の作製方法を普及するために、筆者の現在用いている河合（1980）を若干簡略化したカイガラムシ作製法を、標本作製時のコツ（Tipsとして紹介）とともに今回改めて紹介する。この報文が害虫防除の現場でカイガラムシの被害に立ち向かわれている方々、またはアマチュア研究者でカイガラムシに興味のある方にとって少しでも役立てば幸いである。

## I 薬品

以下の薬品を用いる。以下基本的に河合（1980）と同じであるが、再掲載する。

### 1 10%水酸化カリ溶液

水は蒸留水を用いる。ごく少量の酸性フクシンを加えておくとうい。

### 2 70%酢酸

蒸留水で希釈する。

### 3 氷酢酸

### 4 染色液

2gの酸性フクシンをごく少量の蒸留水で練って、100ccの氷酢酸に溶かしたものを。

### 5 ラクトフェノール液

乳酸：フェノール：氷酢酸を10：1：2の割合で混合して作成する。フェノールは湯煎して液化したものをを用いる。

### 6 アセトサリシレート液

氷酢酸とサリチル酸メチルを等量混合したもの。

### 7 カルボキシロール液

キシレンとフェノールを4：1の割合で混合したもの。フェノールは湯煎して液化したものをを用いる。

### 8 カナダバルサム

キシレンで適宜薄めて使用する。固めのものと薄いものと2種類用意しておくとうい。

### 9 70～80%エチルアルコール

すぐにプレパラート標本作製が行えないときの液浸標本の標本固定・保存液として用いる。

### 10 100%エチルアルコール

標本からDNAを抽出して実験、解析を行う必要があるときの標本固定・保存液として用いる。100%エチルアルコール液中に保管していた標本でも十分に観察可能なプレパラート標本が作製できるが80%エチルアルコール液中で保管していたときと比較して標本がもろくなる傾向があるように感じられる。長期間の100%エチルアルコール液での保管はプレパラート標本作製するうえでは好ましくないと思う。

## II 器具

### 1 径3cmの蓋付き硬質ガラスシャーレ（図-1）

かなりたくさん用意しておいたほうがよい。

### 2 ピペット（図-2）

筆者は廉価なパストツールピペットの先端部分を適宜折って適当な流さにしたものに小型のシリコンゴム製のスポイトをつけて使っている。使い捨てにする必要はないが使用する薬品ごとに別のピペットを用意する。

### 3 ピンセット（図-3）

先の細いものを用意する。植物体からカイガラムシを取り外すときに柄付き針とともに用いる。

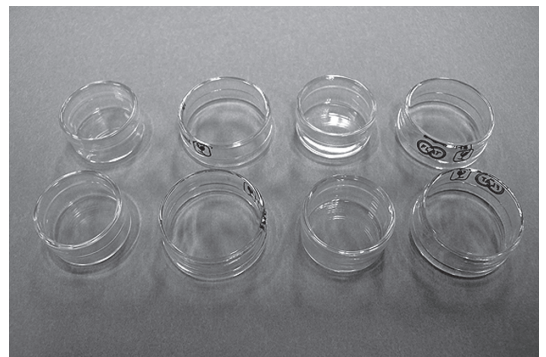


図-1

How to Make Slide-mounted Specimens of Scale Insects, a Method of a Japanese Coccidologist. By Hirotaka TANAKA

(キーワード：カイガラムシ、標本作製法)



図-2

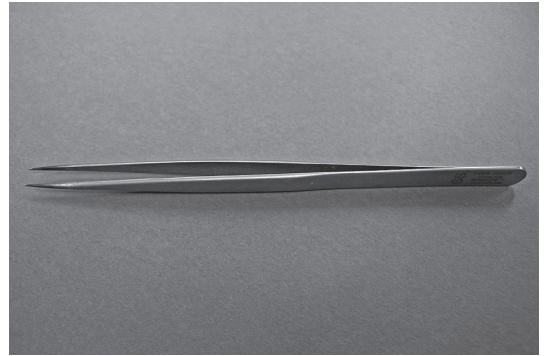


図-3

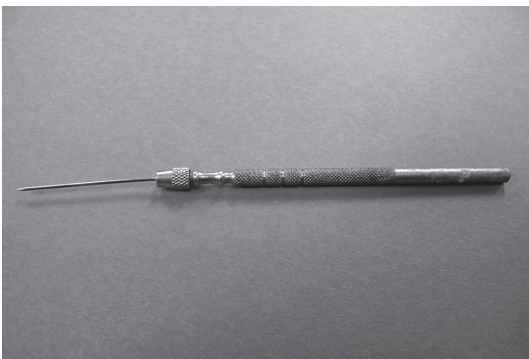


図-4

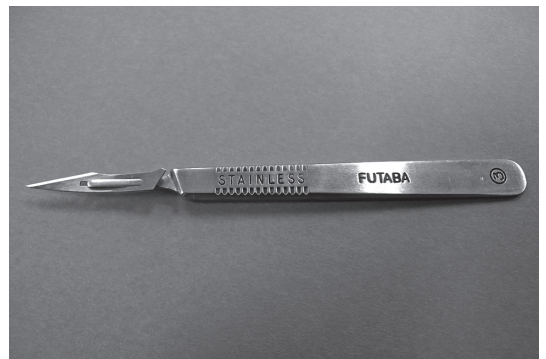


図-5

#### 4 柄付き針 (図-4)

ピンセットと同じく、植物体からカイガラムシを取り外すときに用いる。また大型のコナカイガラムシなどに穴を開けて虫体内部への薬液浸透と、溶けた体内内容物の洗浄を容易にしたりするためにも使う。

#### 5 メス (図-5)

なるべく先端の細いものを用意する。カタカイガラムシなど大型の種類のカイガラムシにおいて虫体内部への薬液浸透を促したり、溶解した体内内容物の洗浄を容易にするために体の一部を切開するために用いる。

#### 6 自作白金耳 (図-6)

カイガラムシの虫体をシャーレやスライド上に移し替えるために用いる。ヘッドレスの細めの昆虫針(志賀昆虫針の0~1号針程度)の先端部をラジオペンチなどでループ状に曲げ、曲げた先端と反対の部分を好みの樹木の小枝あるいは短くした割り箸等の断面に差し込み、差し込んだ部分を接着剤で固めて作成する。ループの大きさを3~4段階程度変えたものを用意するとよい。またループを作らず昆虫針をそのまま差し込んだものも作っておくと重宝する。

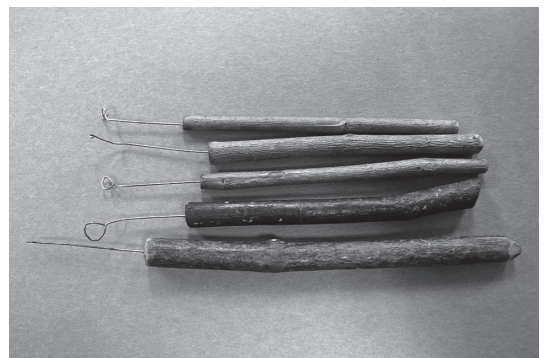


図-6

#### 7 スライドガラス, カバーガラス

薄いほうがよいとされるが、通常の観察ではそれほど質にこだわる必要はない。また薄すぎると破損の恐れが大きくなる。筆者の経験上は現在研究用に市販されている通常のスライドガラス, カバーガラスで大きな問題はなかった。

#### 8 マップ

段ボールなどで自作してもよい。

### 9 バルサム瓶

封入用の薄めたバルサムを入れておくのに用いる。ペット瓶でも代用可。

### 10 スクリュー管ビン

標本を液浸標本で保管するときに用いる。

### 11 油性フェルトペン

### 12 その他

標本ラベル、ラベル用接着剤、ろ紙等適宜用意する。

## III 実験機器

### 1 双眼実体顕微鏡

ズーム式で40倍程度まで拡大できるものが好ましい。

### 2 温度調節のできる実験用ホットプレート (図-7)

90℃程度まで熱することができれば十分である。あらかじめ加熱中のシャーレ内の液温がおおよそ50℃から60℃になるよう温度設定を調整しておくこと。ホットプレートの代わりに定温乾燥機などを用いてもよいが揮発した薬品の蒸気が機器の樹脂部分を冒して劣化させることがあるので注意が必要である。

### 3 ドラフトチャンバー

酢酸のような匂いの強い薬品やキシレン、フェノール等毒性のある薬品を用いるので、作業はできるだけドラフトチャンバー内で行うことが望ましい。利用できない場合は換気に十分気をつけて作業を行うこと。

## IV 実際の作成方法

プレパラート標本作製の流れを図-8に示す。薬品はすべて直径3cm硬質ガラスシャーレに入れ、虫体を順次、異なる薬品を入れたシャーレに移し換えていく方法で処理を進めていく。虫体の移し換えは自作した白金耳を用いて実体顕微鏡下で行い、白金耳のループにためた薬液の中に虫体を入れて移し替えるとよい。大型のカイガラムシならば白金耳をスプーンのように利用してもよい。なお河合(1980)の方法で用いている管ピンは使わない。薬品の量は虫の大きさと量によって適宜変更する必要があるが、筆者はどの薬品もおおむね一回の処理に2~3mlを用いている。

### 1 虫体の取り外し、保管標本の作製

実体顕微鏡下でカイガラムシの付着している植物体をよく観察し、カイガラムシを柄付き針、ピンセット等を用いて取り外す。すぐにプレパラート標本作成に移れるのであれば、そのまま10%水酸化カリ液を入れたシャーレに入れて作成を進めていくが、そうでなければ虫体を80%ないし100%エチルアルコール液浸標本にしてスクリュー管ビンでラベルとともに保管しておく。マルカ

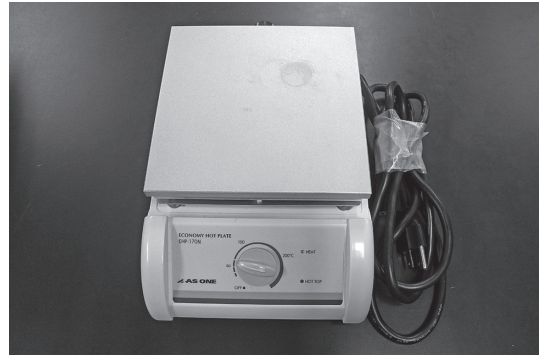


図-7

イガラムシ類の場合は植物体ごとよく干して乾燥標本として保管してもよい。ただしこの方法で標本を管理保管する場合は湿度に気をつけ、カビなどの発生に十分注意する。

#### < Tips 1 >

小型のマルカイガラムシ類などは、介殻ごと10%水酸化カリ液やエチルアルコールに移してもよいが、この方法だと後で虫体を薬液中から拾い上げるのが煩雑になるので、可能であれば虫体を介殻から外して薬液に移したほうがよいように思う。またその際、介殻も別に保管しておくとうい。

### 2 10%カセイカリ液浸漬、加熱

カイガラムシの生体、エチルアルコール液浸標本あるいは乾燥標本を、10%水酸化カリ液を入れたシャーレに移し、そのまま、あるいは1晩放置した後にあらかじめ温度調節をしておいたホットプレートで30分から60分程度虫体がほぼ透明-半透明になるまで加熱処理する。加熱しすぎると重要な構造が壊れてしまうので十分に注意する。この処理で規定の時間を過ぎても虫体がほぼ透明-半透明にならないようであれば、構造を失わないよう加熱処理を停止し常温で上記の状態になるまで静置する。またこれは後の処理でも同じだが採集データなどを忘れないようにシャーレのふたにフェルトペンで記入しておく。

#### < Tips 2 >

コナカイガラムシ科のカイガラムシなどは生体をそのまま10%水酸化カリ液に浸すと虫体表面のワックス質が液をはじいて溶液にうまく浸漬しないことがある。このような場合は虫体を100%エチルアルコールに数秒~数分だけ浸した後に10%水酸化カリ液に浸すとよい。

#### < Tips 3 >

コナカイガラムシ類やカタカイガラムシ類など大型のカイガラムシのカセイカリ液処理はそのままではうまく

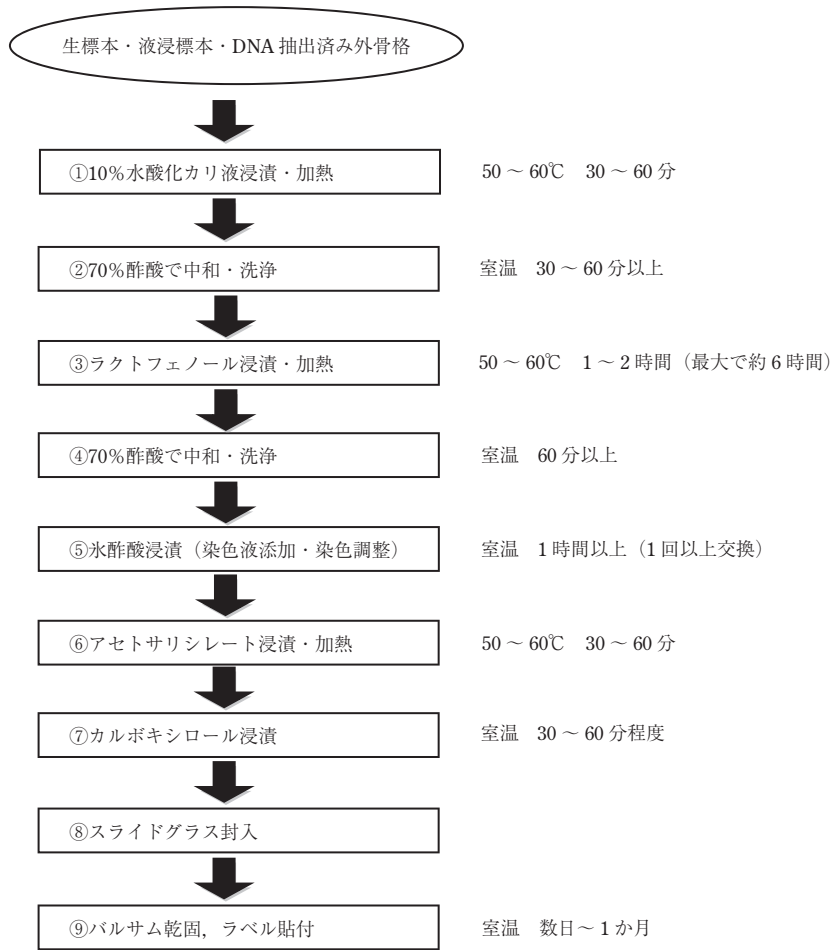


図-8 プレパレート標本作製の流れ  
(河合 (1980) を改変)

進まないことが多いので、薬液が浸透しやすくするために、コナカイガラムシならば背面中央など、分類同定上重要な構造の少ない部分の1～2箇所(細い柄付き針あるいは昆虫針で穴を開ける。カタカイガラムシであれば体の後方の周縁部の一方をメスで切開しておく。マルカイガラムシ類などでも大型の種は体の一部に穴を開けて処理を進めたほうがよいと思われる。

< Tips 4 >

ワラジカイガラムシ類、ワタフキカイガラムシ類等極めて大型のカイガラムシの場合はカセイカリ液処理の前に体の数箇所に穴を開け、カルボキシロールもしくはキシレンに浸漬し体内の脂肪分を除去してから標本作製をはじめるとよい結果が得られることがある。

< Tips 5 >

どの種類のカイガラムシの標本作製を行うときでも、そのまま加熱処理を行うより、1晩10%水酸化カリ液に

漬けて室温で放置した後で加熱したほうがよい結果が得られるように思う。

< Tips 6 >

規定の時間で上記の処理が十分に進まない場合、常温でそのまま処理が緩やかに進むのを待つが、体皮の硬化したカタカイガラムシ類などの場合しばしば長い時間を要するので辛抱強く待つ必要がある。ただあまりに長い時間浸漬しているとやはり重要な構造を失う恐れがあるので、やや不十分でも次の処理に移行し、ラクトフェノール液処理を長めにするとよいかもかもしれない。

3 70%酢酸液中で洗浄, 中和

水酸化カリ液処理が終了した標本は、70%酢酸を入れたシャーレに移して、30～60分程度常温で静置する。このときに水酸化カリ液の中に入れた酸性フクシンが発色して虫体がピンク色になり、後の処理で虫体を見失うことがなくなる。

## &lt; Tips 7 &gt;

10%水酸化カリ液処理の仕方によっては中和洗浄の際に反応が急速に進み、その際に気泡が虫体の中に発生してしまつて標本観察時の障害になることがある。そうしたことが起こる場合、70%よりもさらに低濃度の酢酸あるいは蒸留水等で、数分～数十分間洗浄の処理を一度行つてから70%酢酸に移すとよい。

## &lt; Tips 8 &gt;

もし気泡が虫体内に発生してしまつた場合、氷酢酸浸漬処理、カルボキシロール浸漬処理の時間を長く(1～2日間)してやると、気泡を消すことができることがある。

## 4 ラクトフェノール液浸漬、加熱

70%酢酸液での中和洗浄処理が終了したら、ラクトフェノール液を入れたシャーレに虫体を移し、ホットプレート上で1～2時間程度、カセイカリ液処理がやや不十分な場合はより長時間(～6時間程度)虫体がほぼ透明になるまで加熱処理する。このとき虫体内に白色～淡黄色の油滴が残ることがあるが、これは後の処理で除去されるので心配はない(河合1980)。

## &lt; Tips 9 &gt;

小型のカイガラムシではこの処理中に虫体が浮いてシャーレの壁面上方に溶液を伝つて流れ、そこに張り付いてしまうことがある。もし張り付いてしまつた場合は柄付き針を用いて慎重に薬液中に戻してやる。また処理後は次の処理に移る前にシャーレの壁面を実体顕微鏡でよく観察して、虫体を失わないよう注意する必要がある。

## 5 70%酢酸で洗浄

ラクトフェノール液処理の終わった虫体は、70%酢酸を入れたシャーレに移し、1時間ほど静置して体内内容物およびラクトフェノール液を洗い出す。

## &lt; Tips 10 &gt;

少しでも急ぎたい場合、また虫体が十分きれいになっているのであれば、この処理は省略してすぐに次の処理に移つてもよいかもしれない。

## 6 氷酢酸浸漬(除水、染色調整)

70%酢酸で洗浄して虫体が十分に透明になったら、染色液を1～数滴滴下した100%酢酸を入れたシャーレに虫を移し換え、1時間から数時間静置して染色調整と除水を行う。この処理では薬液を一回以上交換したほうがよい。

## &lt; Tips 11 &gt;

染色が強くなりすぎた場合は70%エチルアルコールに虫体を入れて脱色する(河合1980)。その後、染色剤を入れない酢酸に改めて入れて除水処理を行う。

## &lt; Tips 12 &gt;

体皮の硬化したものでは染色を行わないほうがよい場合がある(河合1980)。

## &lt; Tips 13 &gt;

除水が不十分だと後の処理で虫体が萎縮してしまい、良好な標本にならないことがある。そのためこの処理はできるだけ時間をかけたほうがよいように思う。筆者は通常この処理に一晩かけている。

## 7 アセトサリシレート液浸漬、加熱

染色、除水処理の終わった虫体は、アセトサリシレート液を入れたシャーレに虫体を移し換え、30分～60分程度ホットプレートで加熱する。

## 8 カルボキシロール液浸漬

アセトサリシレート液での加熱処理が終了したものは、虫体が冷めてからカルボキシロール液を入れたシャーレに移し、30～60分程度静置する。

## &lt; Tips 14 &gt;

ワラジカイガラムシ類、ワタフキカイガラムシ類等極めて大型のカイガラムシの場合、カルボキシロール浸漬処理が終了してもなお虫体内部に体内内容物が残ってしまうことがある。その場合、カルボキシロール→アセトサリシレート→100%酢酸→70%酢酸→蒸留水と処理を逆にさかのぼり(常温で虫体内の薬液が入れ替わる程度の時間漬ければよい)、そこから改めて10%水酸化カリ液から標本作成をやり直すといふ標本ができることがある。

## 9 スライドガラス封入

虫体は実体顕微鏡下で自作白金耳を用いてカルボキシロール液の入ったシャーレからすくい上げ、慎重にスライドガラスの上におろす。降ろせたら柄付き針を用いて大まかに標本の状態を整える。整形が終了したら自作白金耳、あるいはピペット等を用いてカルボキシロール液を少量虫体の周囲に垂らし、さらにバルサムを落として気泡の入らないように慎重にカバーガラスをかける。封入後にカバーガラスの周囲に広がったカルボキシロールはろ紙やティッシュ等で軽く拭き取っておく。

## &lt; Tips 15 &gt;

虫体をそのままスライドガラス上におろすよりも、事前に数滴カルボキシロールをスライドガラスに垂らしておくと虫体をおろしやすくなる。

## &lt; Tips 16 &gt;

封入前の虫体の整形は大まかなところでよい。こだわっていじりすぎると多くの場合失敗してしまい、ろくなことになる。

## &lt; Tips 17 &gt;

慣れないうちはこの封入時に虫体がひしゃげてしまっ

たり、あるいは虫体がカバーガラスの外に流れ出してしまったりすることがある。こうしたことを防ぐために筆者はいろいろと“秘術”を用いているが、確実に成功するものではないので今回は紹介しないこととした。いろいろと試行錯誤して自分なりの封入方法を見つけて欲しい。

#### < Tips 18 >

封入に失敗してしまった場合、その封入した標本が貴重なものである場合は、大きめの蓋付きシャーレに入れたキシレンに標本封入に失敗したスライドを入れてドラフトチャンバー内で数日放置し、封入時のバルサムを溶かしてカバーガラスを慎重に外し、キシレン液中から虫体を回収して改めてスライドに封入するとよい。

#### 10 乾燥、ラベル貼り付け

封入が終了したスライドはマップに並べ、採集データをフェルトペンで記入し、数日から1か月水平を維持する。バルサムが固まったらラベルを貼り付ける。この乾燥時にもかなりの量の溶媒が標本から揮発してくるので、少なくとも最初の数日はドラフトチャンバー内で乾燥をしたほうがよい。もしドラフトチャンバーが使えないのであれば、換気には十分気をつける。

### V その他の注意事項など

#### 1 DNAを抽出したサンプルのプレパラート標本の作製について

Qiagen社のDNeasy Tissue Kitなどを用いての、Proteinase Kを用いてDNAを抽出する方法でDNAを抽出した後のカイガラムシの外骨格も上記方法でプレパラート標本にすることができる。ただしProteinase K処理で虫体はほぼ完全に透明になっていることが多いので、経験上水酸化カリ液処理はほんの数分常温で気持ち程度に漬けるだけでよい。また虫体自体も大分もろくなっているように感じられるので、以降の処理も過剰にならないよう十二分に気をつけ、適宜処理時間を短くする。

なおProteinase Kを用いて微少昆虫からDNAを抽出し、その外骨格を残す方法については吉澤(2002)によってCRUICKSHANK et al. (2001)を改変した方法が紹介されている。この吉澤(2002)のプロトコールでは虫体を頭胸部と腹部に分割するとされているが、カイガラムシの場合は虫体をそこまで大きく破壊せずに昆虫針で穴を明ける程度でおそらくよく、またProteinase Kによる培養時間ももっと短くてよいと思う。

#### 2 作成スケジュール

今回紹介した方法は比較的長い時間が必要で、なるべく短時間で処理を行うよう急いでも一日以内に処理が終了させることは難しい。そのため少なくともいくつかの

処理で終夜処理を行う必要が出てくる。筆者の経験からは氷酢酸処理は1~2日の間はそのまま放置しておいても影響がすくないと感じているので、筆者は氷酢酸処理で終夜処理を行うようにしている。また良好な結果を得るために10%水酸化カリ液処理のときに標本を室温で一晩放置しているから、一日目に10%水酸化カリ液で一晩放置→二日目に10%水酸化カリ液処理、酢酸で洗浄、ラクトフェノール液処理、70%酢酸液で洗浄、氷酢酸で除水、染色処理、一晩放置→三日目にアセトサリシレート液処理、カルボキシロール液処理、スライドグラスに封入というスケジュールで3日をかけている(水酸化カリ液処理がうまく進まなかった場合はそこでさらに時間を取るようにしている)。これはあくまで一例だが、参考にして各自なりの作成スケジュールを組み立てられるとよいだろう。また水酸化カリ液以外の処理はいずれの場合でも常温でならば数日間程度は放置しておいても影響は少ないように思う。

#### 3 別の作成方法について

カイガラムシ類のスライド標本作製については、今回紹介した方法以外にも宮崎(1987)が紹介したポリビニルアルコール(PVA)を封入剤として用いる方法なども使われているようである。この方法では脱脂液にキシレンを用いているが、脱脂液もキシレンフリーのものを用いればキシレンを使うことなく標本作製を行うことも可能かもしれない。

さらに今回の方法と同じ薬品を使うが、全く加温しないで常温で長時間をかけて進める方法もある。この方法は時間がより必要だが、より緩やかに処理を進められるので、構造を失う危険性が少ないという意味では加熱する方法よりも安心である。

#### 4 使用した薬品の処理

今回の方法では毒性の高い薬品を使うため、使用した薬品は面倒でもピペットで回収して別に用意したバッファ瓶などで保管し、各種法令や地方自治体の基準に従って廃棄処理を行う必要がある。少量だからといってそのまま下水に流したり、あるいは野外に放棄したりするようなことは厳に慎むべきである。

#### 引用文献

- 1) CRUICKSHANK, R. H. et al. (2001): Molecular Phylogenetics and Evolution 19: 202 ~ 205.
- 2) 河合省三 (1980): 日本原色カイガラムシ図鑑, 全国農村教育協会, 東京, 455 pp.
- 3) 宮崎昌久 (1987): 植物防疫 41: 170 ~ 173.
- 4) 高木貞夫 (1970): 同上 24: 393 ~ 396.
- 5) 吉澤和徳 (2002): <http://www.pscocodea.org/kazu/dna/extract.html> (2014年5月22日アクセス).