

イネシストセンチュウ第 2 期幼虫の分類形質に与える 熱殺及び固定処理の影響

平田 賢司・角屋 竜雄

横浜植物防疫所調査研究部

Effect of killing and fixing methods on taxonomic characters of *Heterodera elachista* larvae. Kenji HIRATA and Tatsuo SUMIYA (Research Division, Yokohama Plant Protection Station, 1-16-10 Shinyamashita, Naka-ku, Yokohama 231-0801, Japan). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 35: 125-129 (1999).

Abstract: A comparative study of several commonly used killing, fixing techniques was made to identify the optimum procedure for preparation of rice cyst nematode larvae for taxonomic examination. Nematodes were killed in hot water at 55, 60, 65, 70, 75°C for 2 minutes. Nematodes were either i) killed in hot water at 60°C and fixed in cold three fixatives (TAF, 4% Formaldehyde, FA 4:1) at 22°C or ii) killed and fixed in hot three fixatives by SEINHORST's (1966) technique. Both the qualitative and quantitative effects of three fixatives on each of twenty larvae characteristics were studied in temporary mounts of specimens killed by each method. Although all the fixatives caused shrinkage and/or distortion, killed in hot water at 55, 60°C and fixing in cold TAF (22°C) and killed and fixed in hot 4% Formaldehyde produced the least affected specimens.

Key words: killing, fixing, taxonomic characters, upland rice cyst nematode.

はじめに

植物検疫における植物寄生線虫の分類・同定のための形態計測及び形態観察は、生きた線虫を熱殺または熱殺後固定処理を行って一時プレパラート標本を作成し、観察することが通常行われている。線虫の熱殺及び固定処理では、熱殺の処理温度と処理時間、固定液の種類や固定処理方法によって形態観察や形態計測値に大きな影響を与えることが知られている (GREWAL *et al.*, 1990, HOOPER, 1986, LAMBERTI and SHER, 1969, ZHOU and CHENG, 1993)。

このため、一時プレパラート標本を作成する上で適切な熱殺及び固定方法を検討する目的で、イネシストセンチュウ (*Heterodera elachista*) の幼虫について、熱殺の温度処理及び熱殺・固定方法と固定液の種類を組み合わせた処理を行い、線虫各部の形態観察及び形態計測値に与える影響を調査した。

本調査を行うにあたり、線虫試料を提供いただいた農林水産省農業研究センター線虫害研究室 清水 啓室長に厚くお礼申し上げる。

材料及び方法

供試したイネシストセンチュウは当所ガラス室 (冬季間加温) においてイネに寄生させて増殖した。本調査では、イネの根圏土壌からベルマン法 (室温、分離時間48時間) によって分離した第 2 期幼虫を供試した。

1. 熱殺の処理温度による影響

熱殺処理は、55, 60, 65, 70, 75°Cの温湯に線虫の入った管瓶 (容量15ml, 底の直径25mm) を 2 分間浸漬し、浸漬後直ちに20°Cの水道水で冷却した。処理した線虫は一時プレパラート標本を作成して、各処理毎線虫20頭について形態観察及び形態計測を行った。

2. 熱殺及び固定方法と固定液の種類の違いによる影響

(1) 熱殺後固定処理 (Cold 固定処理)

熱殺後固定処理では、60°Cの温湯に線虫の入った管瓶を 2 分間浸漬して熱殺処理後、TAF (37%ホルムアルデヒド7.5ml, トリエタノールアミン2.0 ml, 蒸留水

90.5 ml の混合液), Form. (ホルムアルデヒドの4%水溶液)及びFA4:1(37%ホルムアルデヒド液 10.8 ml, 無水酢酸 1 ml, 蒸留水88.2 ml の混合液)の3種類の固定液(22℃)で固定処理を行った。処理した線虫は5~8日間固定液に入れて固定を行い, その後一時プレパラート標本を作成して, 各処理毎に線虫20頭について, 各部の形態観察及び形態計測を行った。

(2) 熱殺・固定の同時処理 (Hot 固定処理)

熱殺・固定の同時処理では, 前述と同じ3種類の固定液を線虫の入った管瓶と等量を別の管瓶に入れ, これを沸騰水に3分間浸漬後, 線虫の入った管瓶に注ぎ入れた。その後の処理及び調査は, 前述(1)と同様に行った。

結果及び考察

1. 熱殺の処理温度による影響

熱殺処理した線虫の主な形態計測値及び形態観察の結果は, それぞれFig. 1 及びTable 1 のとおりである。線虫の形態計測値では, 熱殺温度が55℃から70℃までは有意な差が見られなかったが, 75℃の処理温度では, 体長, 頭端から食道腺葉までの長さ, 頭端から中部食道球までの長さ, 食道腺葉及び生殖原基の体幅, c 値がそれぞれ有意に小さくなっていた (Fig. 1)。形態の観察では, 55℃の処理温度で観察した形態がすべて明

瞭に観察できたが, 処理温度が高くなるに従って観察の評価値が低下し, 65℃以上の温度ではその値が大きく低下した (Table 1)。

線虫の熱殺方法は, 「線虫の状態を確かめながら熱を加えて殺し, 死んだらもはや熱を加えない」(西澤, 1960)と説明されているように, 短時間にできるだけ低い温度で死滅することが必要となる。また, 線虫の熱殺温度は, 65℃温湯に2~4分間 (HOOPER, 1986), 温湯60℃5分間 (ZUCKERMANN, 1971), 60~65℃温湯30秒間 (MINAGAWA and MIZUKUBO, 1994) などの処理条件がこれまで報告されている。

今回用いた55℃温湯2分間処理では, 供試した線虫がすべて死滅していた。また, この処理条件は, 植物寄生線虫が死滅する処理温度と処理時間との関係 (GOHOEN and MCGREW, 1954; HOSHINO, *et al.*, 1933) とほぼ一致していた。

以上の結果から, 今回供試した線虫の熱殺の処理条件は, 55℃から60℃の温度による2分間の処理が適していると考えられる。

2. 熱殺及び固定方法と固定液の種類の違いによる影響

(1) 形態計測

熱殺及び固定方法と固定液の種類を組合せて処理した形態計測の結果をTable 2 及びFig. 2 に示した。

Table 1. Evaluation of characters in *H. elachista* larvae processed by different killing temperature.

Characters	Killing temperature and evaluation*				
	55	60	65	70	75℃
Head	4.5 **	4.5	3.6	3.6	3.4
Stylet	4.8	4.8	4.1	4.1	3.3
Dorsal esophageal gland orifice	4.5	4.2	3.4	3.2	3.0
Median esophageal bulb	4.0	3.8	3.1	3.2	3.1
Hemizonid	4.0	4.0	3.0	3.2	3.1
Excretory pore	4.0	4.0	3.0	3.2	3.1
Esophagus	4.0	3.8	3.0	3.0	3.0
Genital primordium	3.9	3.9	3.1	3.1	3.1
Anus	4.2	3.8	3.5	3.0	3.2
Tail	4.0	4.0	3.4	3.4	3.1
Tail tip	4.1	4.0	3.3	3.0	3.1
Total	46.0	44.8	36.5	36.0	34.5
average	4.2	4.1	3.3	3.3	3.1

* 1-Undefined, 2-Poorly defined, 3-Defined, 4-Well defined, 5-Very well defined.

** Average of twenty specimens.

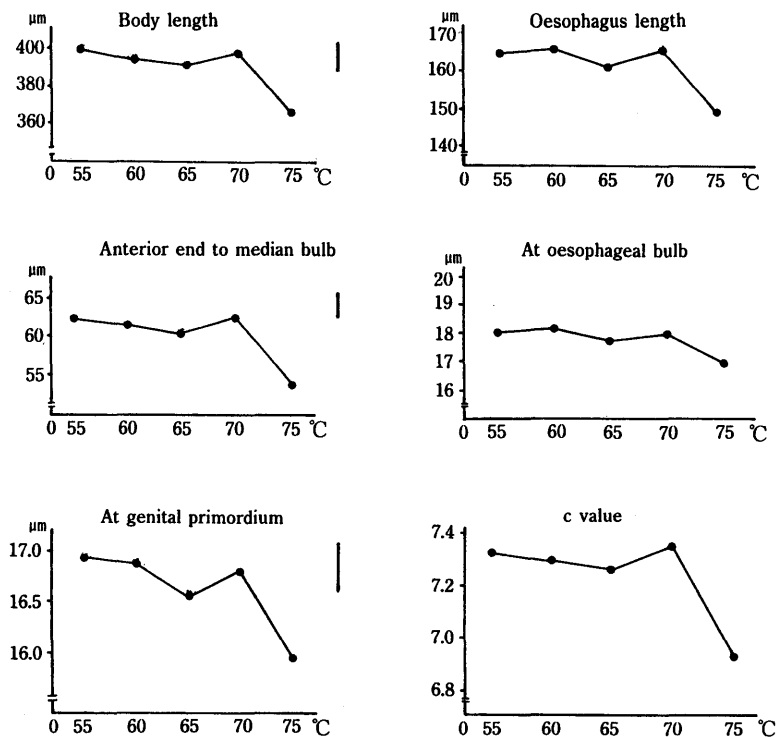


Fig. 1. Effects of killing by heat on body parameters of *H. elachista* larvae. Bars represent least significant difference ($p < 0.05$).

Table 2. Effects of killing and fixing methods on morphometrics of *H. elachista* larvae.

Body parameters	Significance on analysis of variance		
	Cold fixative	Hot fixative	Cold × Hot fixative
A. LINEAR PARAMETERS			
1. Body length	NS	***	***
2. Esophagus length	NS	*	NS
3. Anterior end to median esophageal bulb	NS	*	*
4. Anterior end to excretory pore	NS	***	**
5. Tail length	NS	NS	NS
B. WIDTH PARAMETERS			
1. At oesophageal bulb	NS	***	***
2. At genital primordium	NS	***	***
3. At anus	NS	NS	NS
C. TAXONOMIC RATIOS			
1. a value	NS	NS	NS
2. b' value	NS	***	***
3. c value	NS	NS	NS
4. c' value	NS	NS	NS

Cold fixative: killed in hot water at 60°C and fixed in cold fixative at 22 °C,

Hot fixative: killed and fixed in hot fixative by SEINHORST's (1966) technique.

Cold × Hot fixative=interaction between cold and hot fixatives, NS=not significant,

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Table 2 では、熱殺後固定処理区 (Cold 固定処理) 及び熱殺・固定の同時処理区 (Hot 固定処理) の各形態計測値に対する有意性を比較した。熱殺後固定処理を行った区では計測値に有意な差は認められなかったが、熱殺固定の同時処理区では各固定液の間で体長、頭端から排泄口までの長さなどに明らかな違いが認められた。

また、固定液の種類毎の主な形態計測値をFig. 2 に示した。HotTAF固定液処理では、体長や頭端から中部食道球までの長さなどで、HotFA4:1 固定では食道腺葉及び生殖原基の体幅などでその数値が大きく低下し、形態の大幅な収縮が認められた。

(2) 形態観察

形態観察の評価値をTable 3 に示した。熱殺及び固定方法と固定液の種類を組合せて処理を行った線虫

(Table 3) と55℃及び60℃で2分間の熱殺処理を行った線虫 (Table 1) を比較すると、HotTAF固定、HotForm固定及びColdTAF固定処理が、それぞれ55℃及び60℃で熱殺処理した線虫と同程度に高い値を示していた。

TAF液による固定方法では、「TAF液はほとんど生体同様に観察できる」(西澤, 1960) と記されているように、本調査においてもColdTAF固定液及びHotTAF固定液で処理した標本は、55℃の温湯で2分間処理した線虫とはほぼ同程度の比較的高い観察評価値を示していた (Table 1, Table 3)。

今回調査した形態の計測値と観察評価値を併せて考えると、熱殺後TAF固定液処理及びForm固定液の熱殺固定同時処理がイネシストセンチュウ幼虫の熱殺・固定方法として適していると考えられる。

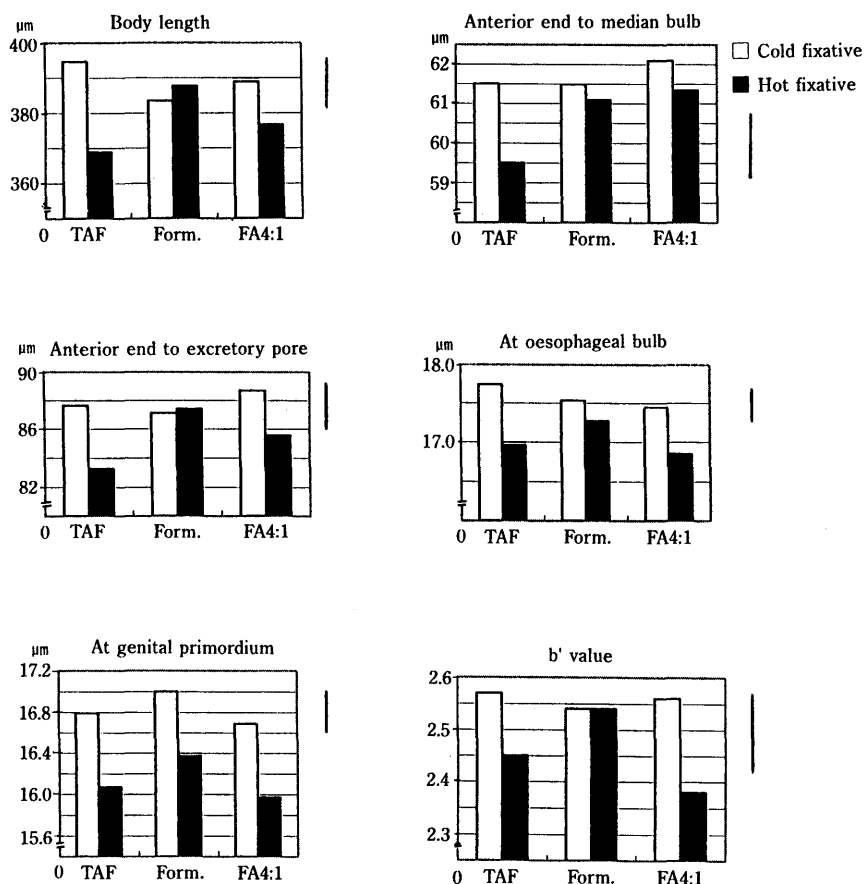


Fig. 2. Effects of killing and fixing methods on body parameters of *H. elachista* larvae. Bars represent least significant difference ($p < 0.05$).

Table 3. Evaluation of characters in *H. elachista* larvae processed by different killing and fixing methods.

Characters	Killing and fixing techniques and their evaluation*					
	Cold fixative			Hot fixative		
	C-TAF**	C-Form	C-FA 4:1	H-TAF	H-Form	H-FA 4:1
Head	4.0 ***	3.9	3.3	4.0	4.1	3.2
Stylet	4.2	4.0	3.9	4.2	4.2	3.2
Dorsal esophageal gland orifice	4.0	3.4	2.9	3.9	3.9	2.5
Median esophageal bulb	3.6	3.3	2.9	3.8	4.0	2.8
Hemizonid	3.6	3.3	2.7	3.9	3.8	3.0
Excretory pore	3.6	3.3	2.7	3.9	3.8	3.0
Esophagus	3.5	3.2	3.0	3.8	3.9	3.1
Genital primordium	3.6	3.2	3.0	3.8	3.8	3.1
Anus	4.0	3.4	2.9	3.8	3.8	2.9
Tail	3.9	3.5	3.1	3.8	3.9	3.1
Tail tip	3.8	3.6	3.1	3.8	3.9	3.0
Total	41.8	38.1	33.5	42.7	43.1	32.9
average	3.8	3.5	3.0	3.9	3.9	3.0

Cold fixative: killed in hot water at 60°C and fixed in cold fixative at 22°C.

Hot fixative: killed and fixed in hot fixatives by SEINHORST's (1966) technique.

* 1-Undefined, 2-Poorly defined, 3-Defined, 4-Well defined, 5-Very well defined.

** For fixatives see "Materials and method".

*** Average of twenty specimens.

引用文献

- GOHOEN, A. C. and MCGREW, J. R. (1954) Control of endoparasitic root nematodes in strawberry propagation stocks by hot-water treatments. *Pl. Dis. Rep.*, **38**(12) 818-826.
- GREWAL, P. S., RICHARDSON, P. N. and WRIGHT, D. J. (1990) Effects of killing, fixing and mounting methods on taxonomic characters of parthenogenetic adult female *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditidae). *Revue Nematol.* **13**(4): 437-444.
- HOSHINO, H. M., and GODFREY, G. H. (1933) Thermal death point of *Heterodera radicicola* in relation to time. *Phytopath.* **23**, 260-270.
- HOOPER, D. J. (1986) Handling, fixing, staining and mounting nematodes. In: *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*, 6th ed. (Southey, J. F., ed.) Her Majesty's Stationery Office, London, 59-80.
- LAMBERTI, F. and SHER, S. A. (1969) A comparison of preparation techniques in taxonomic studies of *Longidorus africanus* Merny. *J. of Nematol.*, **1**(3) 193-200.
- MINAGAWA, N. and MIZUKUBO, T. (1994) A simplified procedure of transferring nematodes to glycerol for permanent mounts. *Jap. J. Nematol.*, **24**(2) 75.
- 西澤 務 (1960) 線虫の顕微技術, 線虫研究指針 (農林省振興局研究部編) pp.59-71.
- SEINHORST, J. W. (1966) Killing nematodes for taxonomic study with hot f.a.4:1. *Nematologica* **12**, 178.
- ZHOU, Z. Q. and CHENG, H. R. (1993) Preliminary study on killing nematodes for making slides by heat. *Plant Quarantine Shanghai* **7**(2): 81-84.
- ZUCKERMAN, B. M. (1971) A method for the concentration of nematodes for mounting from the Baermann apparatus. *Proc. helminth. Soc. Wash.* **27**, 37-39.