

[エダマメにおけるダイズシストセンチュウの総合的管理技術の開発]

## ダイズシストセンチュウ卵の生・死は染色で判別できる

大林隆司・吉村聡志\*・小島 彰\*・野呂孝史\*<sup>2</sup>・竹内浩二  
(生産環境科・\*中央普セ東部分室・\*<sup>2</sup>農業振興事務所)

---

【要 約】 現在入手が容易な4種類の色素（橙色系1種類，青色系3種類）について，薬剤処理あるいは加熱処理したダイズシストセンチュウ卵の生・死を判別できるかどうかを検討した結果，青系色素の Toluidine Blue (0.05 w/v %) で判別できることがわかった。

---

### 【目 的】

ダイズシストセンチュウに対する薬剤効果試験において，薬剤処理後，処理区の卵数と，無処理区との卵数には差が無いが，その後の栽培試験では処理区の生育の方が良好であることから，処理区の卵数には死亡卵も含まれている可能性がある。しかし通常の検鏡による判別は困難である（昨年度発表）。また，エダマメの栽培によるバイオアッセイでは3週間以上を要する。細胞の生・死判別で使われている染色による生・死の判別法が，ダイズシストセンチュウ卵に適用できるか否かを検討する。

### 【方 法】

供試染色液：0.004 w/v % Acridine Orange（橙色系），0.05 w/v % Toluidine Blue，0.4 w/v % Trypan Blue，0.05 w/v % Water Blue 6B（以上青色系）。薬剤（D-D，ダゾメット）処理卵は，薬剤効果試験を実施した露地圃場の土壌から回収した卵を，加熱処理卵は，薬剤未処理土壌から回収した卵を加熱処理（80℃，5分間）したものを供試した。加熱処理卵については，蒸気散水消毒実施施設の実施前・後の土壌からの回収卵も用いた。染色処理には1.5 mlチューブを用い，0.5 ml DW 中でシストを破壊後遠心し，上澄0.3 ml 除去，各染色液を1 ml 加え，3時間以上静置後，遠心しDW で3回洗浄後，検鏡。染まった卵を死卵と見なした。なお，薄く染まった卵は生卵と見なした（過小評価とするため）。

### 【成果の概要】

- 1) 橙系の Acridine Orange では，加熱処理卵の生・死判別は可能であったが，薬剤処理卵はほとんど染まらず，無処理卵との判別は困難であった（表1，図1）。
- 2) 青系の3種類の色素では，加熱処理，薬剤処理のいずれにおいても Toluidine Blue のみで各処理の有・無による判別が可能であった（表2，3，図2：薬剤処理のみ）。また，蒸気散水消毒実施施設の消毒実施前・後の回収卵を Toluidine Blue で染色したところ，消毒実施区は無処理区と比べて消毒実施後に染色卵率が大きく上昇した（表4）。なお，無処理区でも消毒実施後に染色卵率が上昇したのは，消毒時に施設を締め切っていたため，地表部近くの卵が熱の影響を受けたためである可能性がある。
- 3) まとめ：以上の結果から，0.05 w/v % Toluidine Blue 溶液で薬剤処理卵および加熱処理卵の生・死を判別できる可能性が示された。本色素は安価で（約¥4,000/500 ml），薄めずにそのまま使用可能な点も有用である。今後，未染色卵ならびに淡染色卵は生きていのかどうかについて，孵化率との相関を確認する（10mM-ZnSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 水溶液を利用）。

表1 Acridine Orange による各処理の染色卵率

処 理	供試卵数	染色卵数	非染色卵数	染色卵率 (%)
無処理	451	137	314	30.4
加熱処理	250	244	6	97.6
D-D 剤処理	216	14	202	6.5
ダゾメット剤処理	328	26	302	7.9

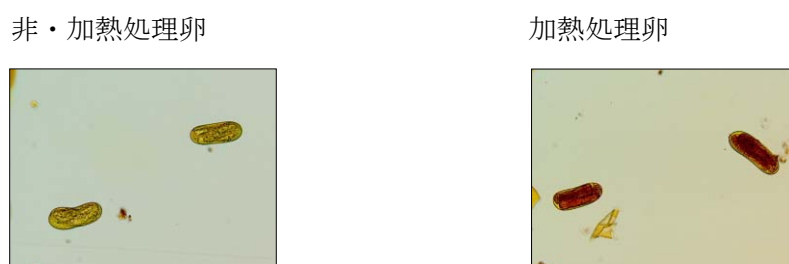


図1 Acridine Orange による加熱処理卵の染色状況.

表2 青色系色素3種類による薬剤 (D-D) 処理卵の染色率の相違 (( ) は計測卵数)

色 素	無処理区染色卵率 (%)	薬剤処理区染色卵率 (%)
Toluidine Blue	10.7 (648)	52.1 (188)
Trypan Blue	1.7 (348)	0.0 ( 79)
Water Blue 6B	0.0 (370)	0.5 (191)



図2 Toluidine Blue による薬剤処理卵の染色状況.

表3 薬剤処理前・後の染色卵率の変化 (Toluidine Blue, ( ) は計測卵数)

処 理	薬剤処理 前 染色卵率 (%)	薬剤処理 後 染色卵率 (%)
無処理	22.7 ( 22)	8.9 (383)
D-D 剤処理	1.8 (436)	64.9 ( 94)
ダゾメット剤処理	1.0 ( 98)	71.3 ( 87)

表4 蒸気散水消毒実施前・後の染色卵率の変化 (Toluidine Blue, ( ) は計測卵数) <sup>a</sup>

処 理	実施前染色卵率 (% , 平均±S. D.)	実施後染色卵率 (% , 平均±S. D.)
無処理	6.1±3.4 (1586)	21.0±27.9 (1024)
蒸気散水消毒	0.8±0.9 ( 963)	82.1±19.6 ( 367)

a) 2連・2反復の平均値.