

イチジク根に寄生したサツマイモネコブセンチュウの卵のう形成の光学顕微鏡および走査電子顕微鏡観察

一 柳 友 祐¹・宮 下 奈 緒^{1,2}・藪 哲 男^{3*}・古 賀 博 則¹

Yusuke ICHIYANAGI¹, Nao MIYASHITA^{1,2}, Tetsuo YABU^{3*} and Hironori KOGA¹ :

Light and scanning electron microscopy of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) egg sac formation in *Ficus carica*

イチジク根内に侵入しているサツマイモネコブセンチュウと寄主の病態変化を形態的に明らかにするために、マイクロサイザーを用いて本線虫の寄生したイチジクの根こぶから薄切切片を作製し、光学顕微鏡観察で有用な切片を選別した後に走査電子顕微鏡で観察した。本線虫はイチジクでもトマトなどでの既報と同様に寄主細胞に巨大細胞形成を誘導し、巨大細胞を取り囲むように木部を配置していた。しかし、イチジクでは卵のうが主に根内に形成され、そこで幼虫にふ化しているのが観察された。トマトなどでは卵のうは根外に形成されるため、イチジクでの結果は既報と著しく異なっていた。

Key words : *Meloidogyne incognita*, 根こぶ, 卵のう, 巨大細胞, 第2期幼虫

緒 言

イチジク (*Ficus carica*) はクワ科イチジク属に属する植物で、6千年以上前から生食用や乾燥イチジクとして栽培されてきた。近年ではケーキやタルトなどの材料として使用されるなど、需要が高まっている。サツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) は、イチジクの重要病害虫の一種である⁴⁾。ネコブセンチュウは果樹ではモモ (*Amygdalus persica*)、ブドウ (*Vitis* spp.)、リンゴ (*Malus pumila*) などにも寄生するが⁵⁾、特にイチジクでは被害が大きい⁶⁾。この線虫は根に寄生して根こぶを形成し、養分吸収を阻害する。生育不良として被害が現れても地上部の症状からは診断が難しいが、根を掘りあげると根こぶの有無で線虫の寄生が容易に診断可能である⁶⁾。また、線虫の防除対策としては、植え付け前の圃場での土壌消毒や根こぶ発生圃場への防除薬剤の施用^{7,10)} などがある。

植物根内に侵入したサツマイモネコブセンチュウと寄

主植物の病態変化についての研究はトマトなど一年生草本植物を使って研究されており^{2,3)}、イチジクなどの木本植物では報告が少ない^{5,12)}。サツマイモネコブセンチュウ寄生によるイチジクの病態変化についての報告はなく、これまで報告があるトマトなどに比べて根が堅いイチジクでの病態変化を細胞学的に解明することは意義がある。そこで、本研究ではイチジク根内のサツマイモネコブセンチュウと寄主植物の病態変化を明らかにする目的で、線虫が寄生したイチジク根を光学顕微鏡 (以下光顕と省略) と走査電子顕微鏡 (以下走査電顕と省略) で観察した。

材料および方法

1. 供試線虫

石川県内のヤマノイモ (*Dioscorea japonica*) から1949年に分離したサツマイモネコブセンチュウを用いた。単卵のう由来の個体群をガラス室内においてトマト

¹石川県立大学 Ishikawa Prefectural University, Suematsu1-308, Nonouchi, Ishikawa 921-8836

²中能登農林総合事務所 Nakanoto General Agriculture and Forestry Office, Kojima ni bu 33, Nanao, Ishikawa 926-0852

³石川県農林総合研究センター農業試験場 Ishikawa Agriculture and Forestry Research Center Agricultural Experiment Station, Saida bo 295-1, Kanazawa, Ishikawa 920-3198

*現在: 石川県農林水産部生産流通課 Present Address: Division of Production and Distribution, Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, Ishikawa Prefecture Kuratsuki 1-1, Kanazawa, Ishikawa 920-8580

(*Solanum lycopersicum*) (品種「強力米寿」)で増殖・維持し、Miyashita et al.⁷⁾の方法に従って、40から50日栽培した後、ポットから根を丁寧に取り出して水洗した。その後、根こぶに形成された卵のうを回収し、第2期幼虫をふ化させたものを接種に用いた。

2. サツマイモネコブセンチュウの接種と根のサンプリング

イチジク苗(品種「アーチベル」)を用い、直径38cm深さ36cmのサイズのポットと菊池産業株式会社製の「花壇・庭づくり培養土」を用いて主幹直径2cm、丈約50cmに育成されたものを供試した。イチジクは6ポット準備し、そのうち3ポットを線虫接種区、3ポットを無接種区とした。接種区には2014年の3月6日にポット当たりサツマイモネコブセンチュウの第2期幼虫を約500匹注入して接種し、その後は温室内で育成した。2014年6月10日に、根に根こぶが発生していることを確認し、根こぶの発生している根ごと採取し、水洗後に根こぶのみを約100個サンプリングした。無接種の3鉢を健全区(無接種区)として、根をサンプリングした。採取したイチジク根こぶをホルマリン・グルタルアルデヒド混合固定液(1.44%ホルマリン、1.0%グルタルアルデヒド、0.1Mカコジル酸緩衝液)に浸漬し、保存した。

3. 光学顕微鏡観察

ホルマリン・グルタルアルデヒド混合固定液に浸漬したイチジク根の根こぶ部位をカミソリで切り取り、それをさらにマイクロスライサー(DKT-3000堂阪イーエム社製)を用いて横断あるいは縦断し、厚さ200 μ mの薄片を作製し、光学顕微鏡(Optiphoto ニコン社製)による観察と写真撮影を行った。線虫や卵のうが明瞭に観察できた試料については再びホルマリン・グルタルアルデヒド混合固定液に浸漬し、走査電子顕微鏡観察に用いた。

4. 走査電子顕微鏡観察

光学顕微鏡観察後、ホルマリン・グルタルアルデヒド混合固定液で再固定した試料を0.1Mカコジル酸緩衝液に30分間浸漬して洗浄後、1%四酸化オスミウム固定液(0.05Mカコジル酸緩衝液)に4℃で12時間浸漬し、固定した。固定した試料をエタノール脱水(50%, 70%, 80%, 90%, 100% \times 3回を各10分)、*t*-ブチルアルコール置換(15分 \times 4回)を行った。*t*-ブチルアルコールに

浸した試料を-20℃で一晩凍結後、凍結乾燥装置(日立フリーズドライヤー ES-2030型)で凍結乾燥した。凍結乾燥した試料をアルミの試料台に乗せ、白金蒸着装置(日立イオンスパッター E-1010型)を用いて90秒間放電し、8nmの厚さに白金を蒸着してから走査電子顕微鏡(日立 S-4700)で観察後、写真撮影を行った。

結果および考察

1. 光学顕微鏡観察

サツマイモネコブセンチュウを接種3ヶ月後のイチジク根には、根こぶが形成されており、それらは大型の根こぶ(直径4~8mm)と小型の根こぶ(直径1~2mm)に大別された(第1図A, 第1表)。大型の根こぶは接種した第2期幼虫より形成されたものであるのに対し、小型の根こぶは次世代の線虫により形成されたものと推測される。イチジク根こぶのマイクロスライサーによる切断面を顕微鏡観察すると、卵のうは根の外部(第1図B)だけでなく、根の内部にも認められた(第1図C)。卵のうの内部には多くの卵が観察され、卵の中には、第2期幼虫がいるのが見られた。一方、無接種区では根こぶは認められなかった。このことから、供試植物、供試土壌には接種したネコブセンチュウの混入がなかったものと考えられる。

2. 走査電子顕微鏡観察

根の断面を走査電子顕微鏡で観察すると、健全根では二次木部や二次師部が明瞭に認められ、二次師部は同心円状に存在していた(第2図A)。しかし、サツマイモネコブセンチュウの寄生によって、中心部が異常に変形した根では、二次木部や二次師部は健全根とは著しく異なっており、二次師部の同心円状の配列は見られないことが多かった(第2図B)。

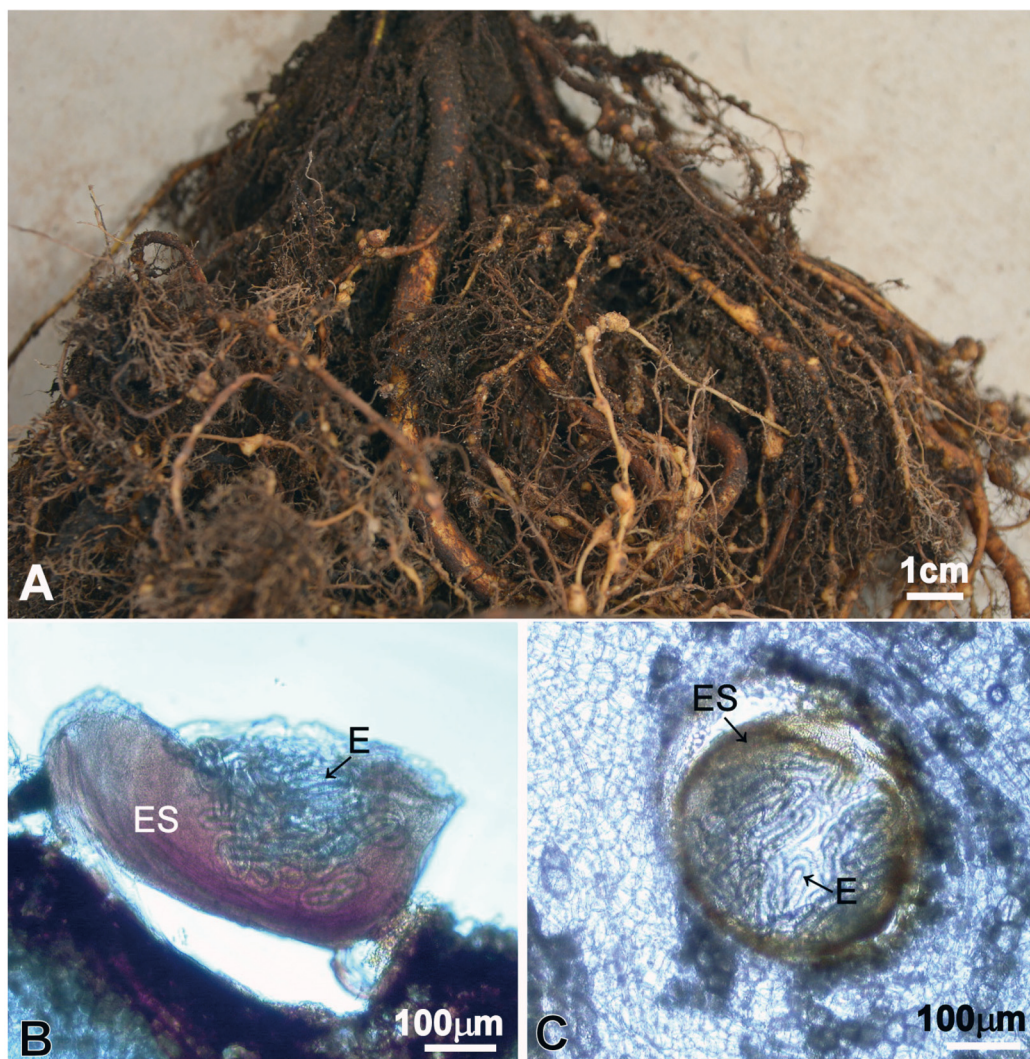
ネコブセンチュウは根の未分化の維管束細胞にエフェクターたんぱく質を放出して、巨大細胞の分化を誘導し、一生それらの細胞から養水分を摂取することが知られている²⁾。巨大細胞は周囲の細胞の数百倍の大きさとなり、細胞内には細胞オルガネラと推測されるものが多量に詰まっており²⁾、周囲の細胞とは著しく異なっていた(第2図D)。巨大細胞は線虫の頭部に対して、扇状に広がっており、いずれの巨大細胞からも吸餌することができるように、線虫の頭部はその要の部分に存在していた(第2図D)。さらに、巨大細胞を取り囲むように

木部組織が配置されていた（第2図D）。上述の線虫と巨大細胞の位置関係、また巨大細胞を木部組織が取り囲む構造は、木本植物のイチジクも草本植物のトマトなどと同じであった¹⁾。

サツマイモネコブセンチュウの外側はクチクラに覆われており（第2図C）³⁾、雌線虫の尾端周辺には、種に特徴的な会陰紋が明瞭に観察された（第2図C）⁹⁾。雌成虫の尾端の先には卵のうが形成されていた（第3図A, B）。卵のうは根組織内に形成されている場合（第3図A, C, D, E）と根外に形成されている場合があった。根組織内に形成されている場合でも、卵の中に第2期幼虫が入っている状態（第3図A, B）と、卵の一部がふ化を始め、そこから第2期幼虫が遊出している

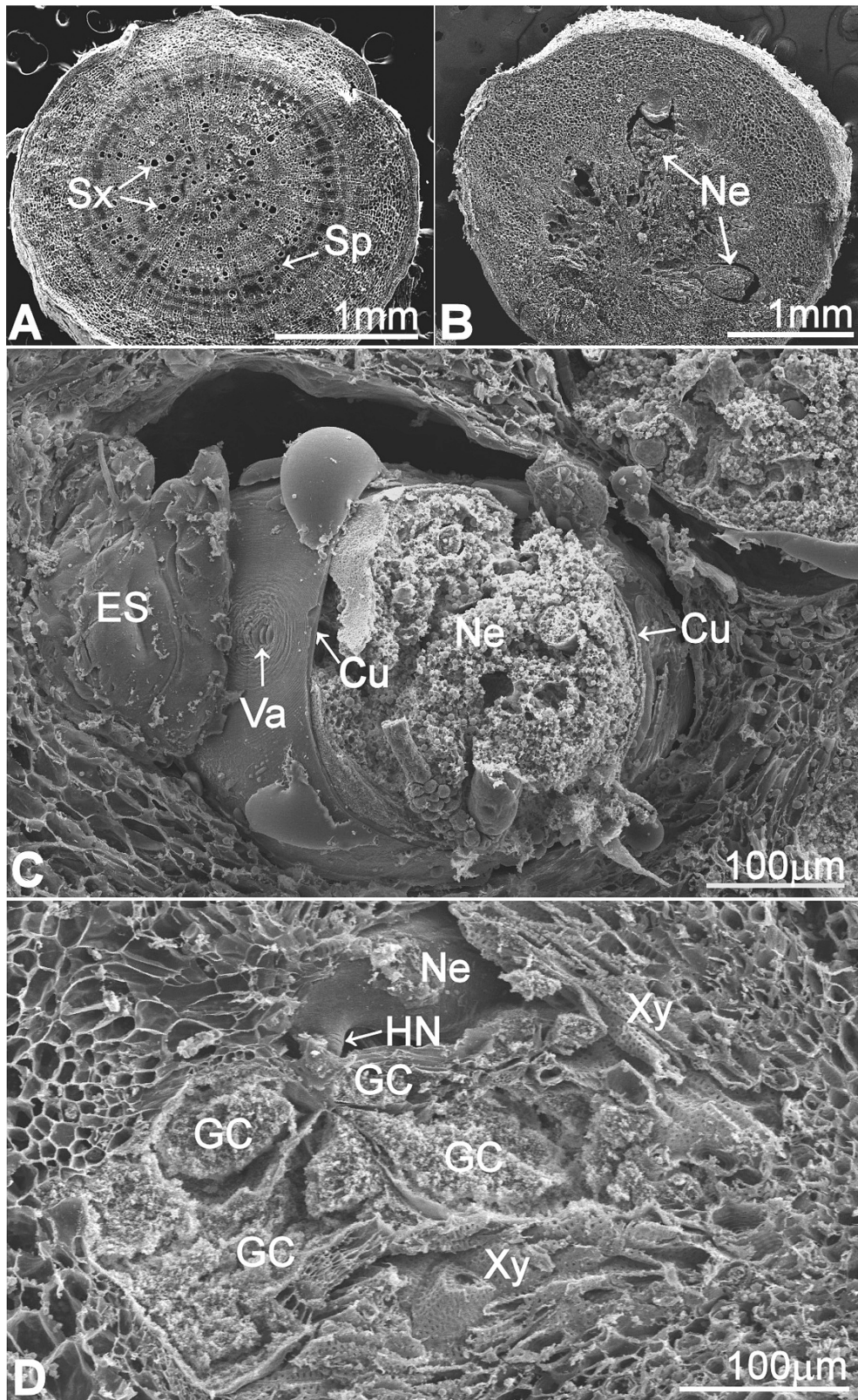
状態（第3図C, D）、そして、ふ化が進み、多くの第2期幼虫が遊出している状態（第3図E, F）が観察された。

卵のうが根の内部に形成されているか、それとも外部に形成されているかの割合を走査電顕観察の結果から類別した（第1表）。大粒の根こぶの方では、21侵入部位のうち、14箇所では卵のうが確認でき、その内12箇所は第1図Cや第3図A, C, D, Eに見られるように根内であった、2箇所が根の表皮近傍に卵のうが形成されて、卵が根外に産下するのが見られた。線虫が観察されるが、卵のうが観察されなかった7箇所では、雌が未成熟のため卵のうを形成していないのか、あるいは切片の位置の関係で卵のう形成を見落としている可能性もある。



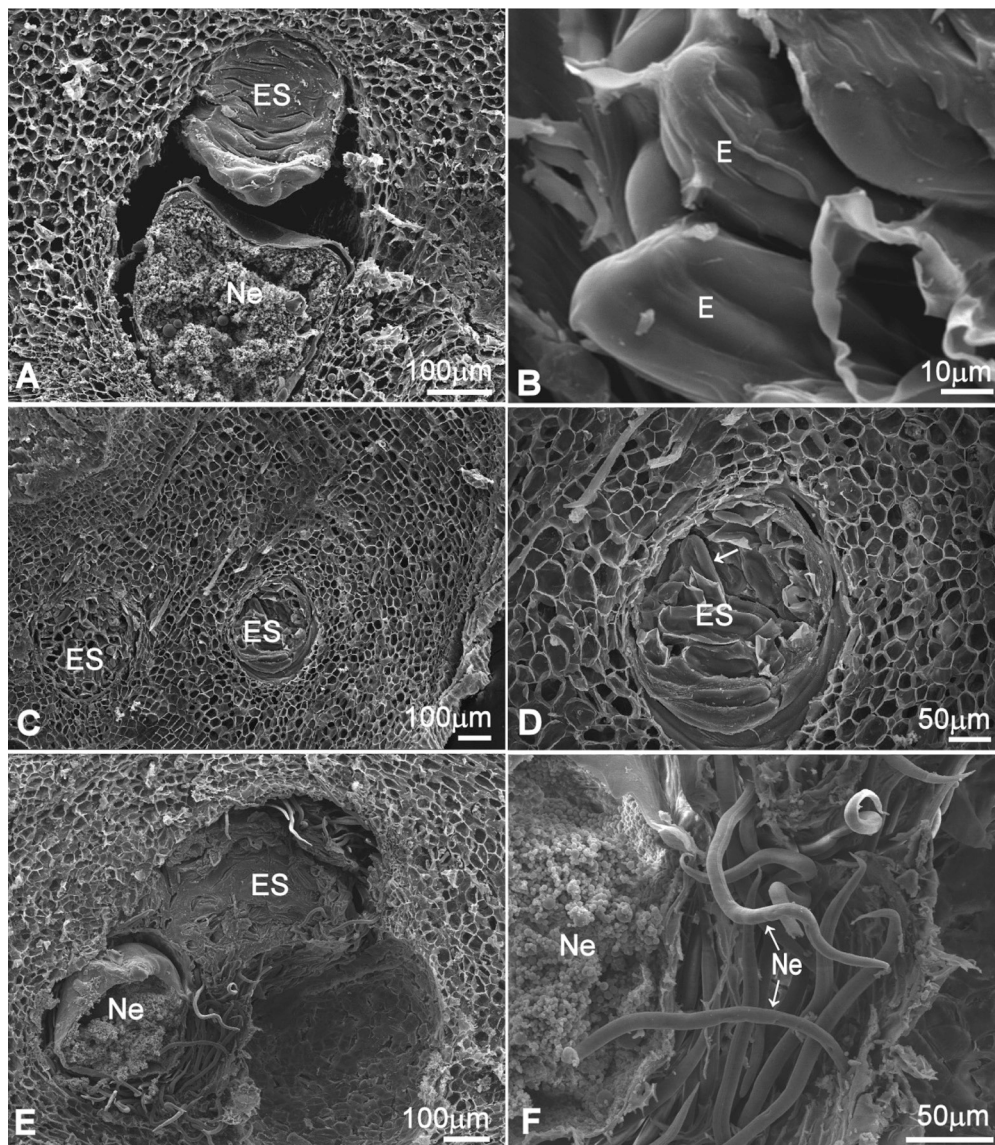
第1図 イチジク根の外観と断面の光学顕微鏡写真

- A：形成された根こぶ（接種3ヶ月後）
- B：根外に形成された卵のう（ES）と卵（E）
- C：根内に形成された卵のう（ES）と卵（E）



第2図 イチジク根の断面の走査電顕写真

- A：健全な根 Spは二次師部，Sxは二次木部。
 B：線虫寄生根 Neは線虫体。
 C：根こぶ内のサツマイモネコブセンチュウ雌成虫
 線虫体 (Ne) 表面はクチクラ (Cu) に覆われており会陰 (Va) 近くに卵のう (ES) がある。
 D：根内に形成された巨大細胞 (GC)
 線虫の頭部 (HN) を中心に巨大細胞 (GC) が扇状に広がり，巨大細胞の周縁を木部 (Xy) が囲んでいる。



第3図 イチジク根内に寄生しているサツマイモネコブセンチュウ雌成虫 (Ne) とその卵のう (ES) の走査電子顕微鏡写真

- A: 根内の線虫と卵のう
 B: 卵のう中の卵 (E)
 C: 根内の卵のう
 D: Cの一部拡大。第2期幼虫がふ化 (矢印)。
 E: 根内の線虫と卵のう
 F: Eの一部拡大。第2期幼虫 (J2) がふ化し、卵のうの外に遊出。

第1表 イチジク根におけるサツマイモネコブセンチュウの卵のう形成部位^{a)}

根こぶのタイプ	卵のう形成部位 (個)		卵のう形成未確認部位 ^{b)} (個)	合計 (個)
	根内	根外		
大粒 (直径4～8 mm)	12	2	7	21
小粒 (直径1～2 mm)	1	0	25	26

a) 接種3ヶ月後にサツマイモネコブセンチュウが侵入している各部位について、根こぶを直径に基づいて2つに大別して、卵のうが形成されているか否かを走査電顕で調査した。

b) 線虫は観察されるが卵のうは観察されない場合で、卵のうが形成されていない場合と卵のうは形成されているが観察面に現れていない場合が考えられる。

さらには、マイクロスライサーによる薄切切片作製時や電顕固定・脱水時などに卵のうが根から脱落した可能性がある。同様に小粒の根こぶの場合も根内に卵のうが1箇所認められたが、他の25箇所では卵のうは確認できなかった。この結果、イチジクでは卵のうの大部分が根内に形成され、そこで幼虫にふ化するものが、根外に形成されるものより数倍多いことが示された。イチジクの場合も卵のうが表皮近傍に形成されて、卵が根外に露出する場所が認められたが、その割合は根内に形成される割合と比較すると少なかった。サツマイモネコブセンチュウで卵のうは根外に形成されることがトマトで報告されており¹³⁾、イチジクのように根内に高頻度で形成される例はアロエ¹¹⁾、ノニ(ヤエヤマアオキ)⁵⁾、ザクロ¹²⁾などで報告されている。これら木本または多肉植物で根組織内に卵のうが高頻度で形成される要因として、相対的な根組織の堅さや卵のうが形成される深さなどが推測されるが、説明は今後の課題である。

以上のことから、イチジクの根でもトマトなどの草本植物と同様、サツマイモネコブセンチュウは巨大細胞を形成後²⁾、卵のうを形成するという生活環を持つことが明らかとなった。しかし、トマトとの大きな違いは、トマトでは卵のうを根外に形成する¹³⁾のに対し、イチジクの場合は卵のうを根外だけでなく根内にも形成し、卵からふ化した第2期幼虫がイチジク根内に存在している点である。イチジクの場合、卵のうからふ化直後の第2期幼虫が根内に存在していることが、根こぶ発生や防除対策にどのような影響を及ぼすかなど明らかにすべき課題は多いと考えられる。

引用文献

- 1) Bartlem, D. G., Jones, M. G. K. and Hammes, U. Z. (2013) Vascularization and nutrient delivery at root-knot nematode feeding sites in host roots. *J. Experiment. Bot.* 65 : 1789~1798.
- 2) Berg, R. H., Fester, T., Taylor, C. G. (2009) Development of the root-knot nematode feeding cell. In: Berg, R. H., Taylor, C. G., eds. *Cell biology of plant nematode parasitism*. Berlin, Heidelberg: Springer. 115~152.
- 3) Eisenback, J. D. (1985) Detailed morphology and anatomy of second-stage juveniles, males, and females of the genus *Meloidogyne* (root-knot nematodes). An advanced treatise on *Meloidogyne*, vol. 1. In: Sasser, J. N., Carter, C. C., editors. Raleigh, N. C.: North Carolina State University Graphics : 47~78.
- 4) 藤本 清 (2006) サツマイモネコブセンチュウ. 果樹園芸大百科13 イチジク. (社団法人農山漁村文化協会編), 177~180, 農山漁村文化協会, 東京.
- 5) Kavitha, P. G., Jonathan, E. I. and Nakkeeran, S. (2011) Life cycle, Histopathology and yield loss caused by root knot nematode, *Meloidogyne incognita* on noni. *Madras Agric. J.* 98 : 10~12.
- 6) 喜田和夫 (1986) サツマイモネコブセンチュウ. 果樹の病害虫—診察と診断—. (山口昭・大竹昭郎編), 585~586, 全国農村教育協, 東京.
- 7) Miyashita, N., Yabu, T., Kurihara, T., Koga, H. (2014) The feeding behavior of adult root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*) in rose balsam and tomato. *J. Nematology* 46 : 296~301.
- 8) 水久保隆之 (2015) 日本の線虫防除研究と防除技術の動向—日本線虫学会20周年記念事業：線虫防除に関するアンケート (1999~2011年度) の集計— *日本線虫学会誌*45 : 63~76.
- 9) 奈良部 孝 (2004) 各論 1 ネコブセンチュウ *Meloidogyne*属. 植物防疫 特別増刊号 8 : 11~16.
- 10) 新田浩通 (1999) イチジクのサツマイモネコブセンチュウに対するホスチアゼート粒剤の防除効果. *関西病虫研報*41 : 71~72.
- 11) Palomares-Rius, J. E., Castillo, P., Rapoport, H., Archidona-Yuste, A. and Tzortzakakis, E. A. (2015) Host reaction of *Aloe vera* infected by *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* in Crete island (Greece). *Eur. J. Plant Pathol.* 142 : 887~892.
- 12) Sudheer, M. J., Kalaiarasan, P. and Senthamarai, M. (2007) Report of root-knot Nematode, *Meloidogyne incognita* on pomegranate, *Punica granatum* L. from Andhra Pradesh. *Indian J. Nematology* 37 : 201~202.
- 13) Wergin, W. P., Orion, D. (1981) Scanning electron microscope study of the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on tomato root. *J. Nematology* 13 : 358~367.

(2016年10月23日受理)