

マツノザイセンチュウの走査型電子顕微鏡による観察

林業試験場九州支場 清原友也

走査型電子顕微鏡（以下、SEM）を使用することによって、光学顕微鏡では観察しにくい線虫体表面の微細構造を明らかにし、形態的、分類学的新知見を加えることが可能になってきた。

マツノザイセンチュウとその近縁種との形態的識別を行なう目的でSEMによる観察を行なっているが、今回は試料の固定、脱水法について知見を述べるとともに若干の観察結果を報告する。

多大のご指導をいただいた昆虫研究室吉田成章氏、菌類研究室安藤正武氏に深識の意を表する。

材料および方法

菌叢上で培養したマツノザイセンチュウ（以下、線虫）を供試した。菌叢から分離した線虫を蒸留水で数回洗滌し、I) 65℃で熱殺し固定するか、II) 生きた線虫を5℃下に30分間保った後、5℃の固定液でもって固定¹⁾する2方法を用いた。固定液にはホルマリン（4%）、GA（4%）、TAF、FA、FAAを使用し比較した。固定は5℃で12~17時間行なった。固定後十分水洗し、1%O₃O₄ 燐酸緩衝固定液で5℃、2~5時間の後固定を行なった。固定後、同緩衝液で十分洗滌し脱水乾燥した。脱水乾燥にはつぎの3方法を用いた。1) Stone & Green²⁾の方法でアセトン脱水し風乾する、2) Bird¹⁾に従いアルコール脱水し、常法で臨界点乾燥をする、3) 固定、水洗後に真空凍結乾燥する。3) は今回新たに試みた方法であり、大亜真空凍結乾燥機（VFD-1100FAM-BF型）を使用した。乾燥した線虫を試料台に両面接着テープで接着し、15~20分間金で蒸着しSEMで観察した。蒸着装置およびSEMはそれぞれ日本電子のJFC-1100型、JSM-SIO型を使った。SEMの加圧電力は10KVとした。

結 果

前処理：殺虫固定にはI) 法よりII) 法がすぐれた結果を示した。ただし、後者の場合首を曲げたり、S字型になつたりした個体がかかり認められた。しかし、正面像や雄尾部の観察にはこれらの個体がかえって好都合であった。固定液としてはホルマリンがもっともよかった。脱水乾燥法としては、2) 法がもっともよく3) 法でもかなりよい結果がえられたが、1)

法ではあまりよい結果がえられなかった。口唇部の保存は3) でもっともよかった。

従って、本線虫のSEM観察の前処理としては生きた線虫をホルマリンで固定し、O₃O₄で後固定を行なった後アルコール系列で脱水し、臨界点乾燥装置で乾燥する方法が適切と考えられる。

観察結果：線虫主要部位の写真をA~Fに示した。口唇部は深い溝によって体部より区切れ、その横巾と高さはほぼ同じで、丸い形状をしている。（写真A）顔正面像（写真B）は円形で6個の口唇はほぼ同じ大きさであるが、側唇（1・1）2個は他の4個に比べやや小さい。正面中央に小さな口腔開口部がみられる。

つぎに雄尾翼を背面から観察した。尾翼（写真C）は尾乳頭の下から尾末端をこえてかなり長く伸びている。尾翼末端は長円形のものや浅い凹形を示すものなどその形状は多様であった。雌尾部（写真D）は末端が円形または長円形の個体が多いが、先端に小さな突起をもつものもかなり認められた。肛門は下方に湾曲し、肛門直下が丸く隆起している。

乳頭（写真E）は肛門上部に1対、下部に2対認められた。下部の乳頭は互に隣接し並列しているのが特徴的であり、内側の乳頭は外側のそれより小さい場合が多かった。さらに、肛門のや、上部の復部中央に1個の乳頭が認められた。これは側復部の乳頭に比べてかなり小さい。つぎに、体外部に突出した交接刺を示した。交接刺（写真E）は中央よりや、前方でくの字に屈折し、先端附近が深くくびれている。光学顕微鏡での観察では交接刺は対をなし融合していないが、この写真では融合してみえる。

この外多くのことが観察されたが、横条溝と側帯について述べる。横条溝は比較的浅くきざまれ、体環の巾は約0.7μであった。4本の側帯溝があり側帯の巾は約3μであった。

考 察

今回、マツノザイセンチュウをSEMで観察するため、2~3の固定・脱水法を検討して、若干の知見をえたが、未だ吟味すべき課題も残されている。

上に述べた観察結果から、マツノザイセンチュウの形態に、従来報告されていない新しい知見が加えられ

た。すなわち、口唇部の詳細な形態、雄尾翼の形状や乳頭の個数と位置などが明らかにされた。復部中央に認められる1個の乳頭については *Bursaphelenchus* 属では記載された例が少なく本種を除いてはRühmによる *B. idius*³⁾ だけである。*B. fraudulentus*⁴⁾ および *B. pit yogeni*⁵⁾ は本種に類似するが、この乳頭は記載されていない。今後、マツ枯損木から検出される本属の線虫のSEM観察を行なうとともにマツノザイセンチュウの形態の種内変異も追求したい。

引用文献

- (1) Bird, A. F.: The structure of nematodes, 5-15, Academic Press, 1971
- (2) Stone, A. & Green, C. D.: Nematologica .17, 490-491, 1971
- (3) Rühm, W.: Parasit. Schriftenreihe, 6, 236-237, 1956
- (4) ———— : ———— , ———— 240-241, 1956
- (5) Massey, C. L.: USDA For. Service, Agr. Handbook .446, 186-190, 1974

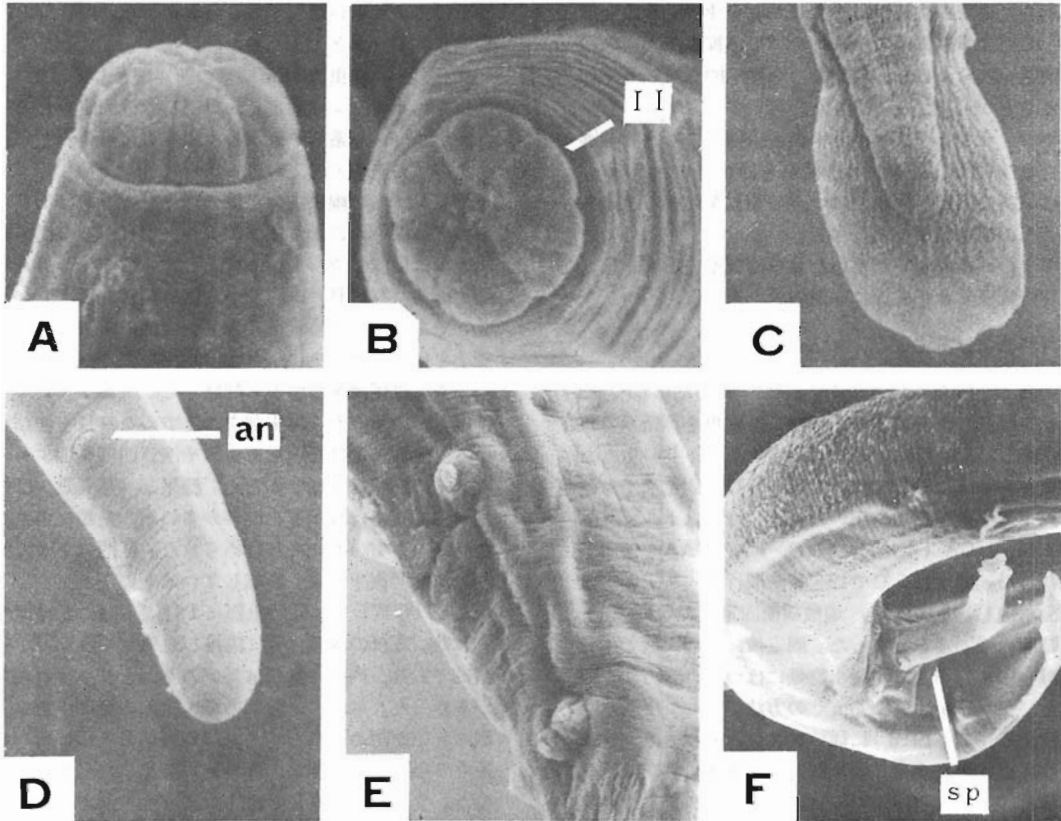


写真-1, マツザイセンチュウの走査電顕像

- A : 口唇部 (× 4,500)
- B : 顔正面 (× 5,000), 1・1…側唇
- C : 尾翼 (× 3,000)
- D : 雌尾部 (× 2,000), an…肛門
- E : 雄乳頭 (× 4,600)
- F : 交接刺 (× 1,600), sp…交接刺