

博士論文

サツマイモネコブセンチュウの
感染行動と防除に関する研究

Studies on the infective behavior and control
of the southern root-knot nematode,
Meloidogyne incognita

平成 27 年 3 月

石川県立大学大学院

生物資源環境学研究科

宮下 奈緒

目 次

I	序 論	1
1)	本研究の背景	1
2)	本研究の目的	3
II	ネコブセンチュウの寄生関係を構築・維持するメカニズムに関する基礎的研究	5
1.	寄主植物の根内におけるネコブセンチュウ雌成虫の吸餌行動解析	5
1)	緒 言	5
2)	材料と方法	5
3)	結果と考察	6
2.	ネコブセンチュウ 2 期幼虫と雌成虫における頭部形態の差異と吸餌行動の関係	13
1)	緒 言	13
2)	材料と方法	13
3)	結果と考察	13
3.	ネコブセンチュウが誘導した巨大細胞の微細構造による解析	19
1)	緒 言	19
2)	材料と方法	20
3)	結果と考察	22
III	糖蜜を用いた土壌還元消毒によるネコブセンチュウ防除	38
1)	緒 言	38
2)	材料と方法	38
3)	結果と考察	40
IV	総合考察	48
V	謝 辞	51
VI	引用文献	52
VII	Summary	62

I 序 論

1) 本研究の背景

ネコブセンチュウは *Tylenchida* 目の *Meloidogynidae* 科 *Meloidogyne* 属に属する植物寄生性線虫で、世界中に広く分布している。ネコブセンチュウに寄生された植物は根の通水や養分吸収を阻害されることで生長が抑制され、枯死する場合もある。また根菜類では可食部に裂開やこぶなどの奇形を生じさせ、商品価値を損失させる。また、ネコブセンチュウの寄生により他の病原菌による病気の発生や品種の抵抗性を弱める事例も報告されている (平野 1983)。

ネコブセンチュウの中でも、サツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) は世界中で最も普遍的にみられる種で、露地や施設にかかわらず、さまざまな品目の栽培に深刻な被害をもたらしている (Lamberti 1979)。本種は日本国内においても検出頻度が最も高く (奈良部 2004)、サツマイモの他にもナス科、ウリ科、アブラナ科、キク科をはじめ、55 科 60 属 200 種以上に寄生することが知られている (吉田 1992)。ネコブセンチュウの防除は、主として化学的防除に依存しており、D-D 剤やクロルピクリン剤等のくん蒸型殺線虫剤、ホスチアゼート剤やオキサミル剤などの接触型殺線虫剤が普及している。くん蒸型殺線虫剤は効果が高いものの、都市化に伴う宅地と農地の混在化により揮発ガスの漂流揮散が懸念され住宅地周辺では使用が難しくなっている。人体への健康に及ぼす影響 (Lorenzo *et al.* 1977) や土壌中への残留 (弥富 1972)、土壌微生物相のかく乱 (和田ら 2008) 等の環境負荷も懸念されている。接触型殺線虫剤は地温の影響を受けることも少なく、ガス抜きも不要で手軽に処理を行うことができるものの、即効的な殺線虫効果は低い。ため、単独での処理では防除効果が劣る。

近年、食の安全安心や環境保全型農法への関心の高まりから、ネコブセンチュウの化学農薬だけに頼らない代替防除法の開発が望まれている。一方でネコブセンチュウの発生生態については不明な点も多く、総合的害虫防除に基づいた防除法の開発が遅れている要因

となっている。本研究で対象としているネコブセンチュウの寄生生態の基礎的研究は、生態に基づいた被害抑制・防除方法を開発するために不可欠である。

ネコブセンチュウは土壤中に生息し、産下卵はゼラチン質でつつまれた卵のうとして寄主植物の根に埋もれた状態で存在し、卵内で 1 回脱皮した後に 2 期幼虫として卵から孵化し、新たな根に侵入する。根の内部に侵入した幼虫は、中心柱付近に定着し、ネコブセンチュウに栄養を供給するための細胞が形成されるよう誘導する。この細胞は巨大細胞と呼ばれ、ネコブセンチュウにとって唯一の養分供給源となっている (De Guiran and Ritter 1979)。ネコブセンチュウ類は成虫・幼虫とも体が極めて小さく、さらに巨大細胞が発達するにつれて巨大細胞周辺にある細胞も盛んに分裂し、感染部位の組織が肥厚する。そのため、成長したネコブセンチュウを生きたままの状態の詳細に観察することは困難で (Wyss *et al.* 1992) ネコブセンチュウの生態解明を妨げる一因であった。

ネコブセンチュウが誘導した巨大細胞は、多核で、細胞壁の内方成長を持ち、ゴルジ体、液胞、プラスチド、小胞体、ミトコンドリアなどの多量のオルガネラを含む (Berg *et al.* 2008)。このような特徴を持つ細胞は、植物の転送細胞に見られ (Gunning *et al.* 1968)、アポプラスト・シンプラスト間の物質輸送を促進している。巨大細胞の構造と機能に関する研究には、透過電子顕微鏡を用いた微細構造解析が大きな役割を果たしてきた (Bird 1961, Bird 1962, Paulson and Webster 1969, Hussey and Mims 1991, Berg *et al.* 2008)。細胞壁の内方成長は巨大細胞の細胞膜の面積を拡大して、維管束からの養分の取り込みを促進する (Bird 1961)。巨大細胞内には多量のオルガネラや、拡大した核、小胞体が見られ、代謝が活発になっている (Jones and Northcote 1972)。さらに、グルコースやアミノ酸濃度が高いことから (Gommers and Dropkin 1977)、巨大細胞はネコブセンチュウに養分を供給するための代謝シンクであると考えられている (Bartlem *et al.* 2014)。

一方で、これらのオルガネラがどのようにネコブセンチュウへの養分移行に関わっているかについては不明な点が多く、透過電子顕微鏡による二次元的な解析に加えて三次元的

な位置関係を明らかにし、相互関係を整理する必要がある。

石川県におけるネコブセンチュウの発生状況としては、トマトやキュウリ、メロンなどの施設野菜で被害が大きく問題となっている（藪ら 1993, 清水ら 2006）。石川県における殺線虫剤の出荷量は、1,3-ジクロロプロペンを含む剤（D-D など）が最も多いものの、近年は減少傾向にあり（農薬要覧 2001～2013）、前述の理由により土壌くん蒸剤を使用しにくい状況となってきたことがうかがえる。そのため、石川県においても土壌くん蒸性殺線虫剤に替わりうる、環境や人体に対する影響がより小さいネコブセンチュウ防除体系の開発が求められている。

化学農薬代替のネコブセンチュウ防除法のうち、熱を用いた土壌消毒法として、太陽熱消毒や土壌還元消毒、蒸気消毒、熱水土壌消毒などがある（北 2006）。なかでも土壌還元消毒は、圃場へ有機物を投入して、灌水、被覆を行うもので、農業者が比較的所有しているような装備を利用して処理することができるという利点がある。また露地圃場、施設圃場のいずれにも適用できる。土壌還元消毒の作用機作としては、土壌微生物により有機物が分解されるのに伴って酸素が消費され、また灌水や被覆によって空気が遮断されているため土壌が還元状態になる。この過程で酢酸などの有機酸が生成することや、土壌中の鉄やマンガンが還元されて Fe^{2+} や Mn^{2+} などの金属イオンとして土壌水中に溶出し、病原性の土壌微生物などが減少することによりその効果が得られていると考えられている（Monma *et al.* 2010, Monma *et al.* 2011）。一方で気温や作物によって向き不向きもあることから、現場の実情に合った防除体系の確立が必要である。

2) 本研究の目的

本研究ではまず、寄主植物の根内におけるネコブセンチュウ *Meloidogyne incognita* 雌成虫の吸餌行動の解明を試みた（Ⅱ－1, Ⅱ－2）。

次に、ネコブセンチュウー巨大細胞の養分移行の仕組みを理解し、巨大細胞の発達・維

持過程の解明に貢献することを目指し、巨大細胞内の液胞, provacuole, 小胞体などの種々の構造物間の相互関係を解析した (II-3)。

最後に、環境保全型防除へ直接の貢献を目指し、糖蜜を用いた土壌還元消毒によるネコブセンチュウ防除効果について検討した (III)。

最後に、今回得られた知見に基づき、環境保全型線虫防除技術の現場での活用法、ネコブセンチュウの生態研究の意義について総合的に論じた (IV)。

II ネコブセンチュウの寄生関係を構築・維持するメカニズムに関する基礎的研究

1. 寄主植物の根内におけるネコブセンチュウ雌成虫の吸餌行動解析

1) 緒言

ネコブセンチュウは根に侵入し、線虫の吸餌部位となる巨大細胞の形成を誘導する。ネコブセンチュウの成長、発達、産卵は巨大細胞によって維持される (Berg *et al.* 2008)。寄主植物とネコブセンチュウとの間の関係は複雑で、根の中における内部寄生性線虫の動態に関する知見は限られている (Wyss and Zunke 1986, Hussey 1989, Sijmons *et al.* 1991, Wyss *et al.* 1992)。Wyss *et al.* (1992) は、ビデオレコーダーを用いた記録により、サツマイモネコブセンチュウ 2 期幼虫が植物の根に侵入し、巨大細胞の形成を誘導するため中心柱へ移動していることを明らかにした。しかし、根こぶが発達するにつれて試料の厚みが増すことから、植物根内にいる雌成虫を生きたまま記録することは、Wyss らの方法では技術的に困難である。

本研究では、雌成虫の根こぶ内での動態を解明する一助とするため、生きたまま根こぶ内の雌成虫を観察する手法を考案し、行動解析を行った。

2) 材料と方法

供試線虫

石川県内のヤマノイモから分離したサツマイモネコブセンチュウ [*Meloidogyne incognita* (Kofoed & White, 1919) Chitwood, 1949] を供試した。培養土と浜砂を1:1の割合で充填させたポリエチレンポット (直径10.5 cm) にトマト (品種: 強力米寿) を播種し、約1ヵ月間ガラス温室に栽培した。この苗に、ヤマノイモから分離したネコブセンチュウの卵塊1つを接種した。40から50日栽培した後、ポットから根を取り出して水洗し、多数の卵塊を採取した。新たに用意した、播種1ヵ月後のトマト (品種: 強力米寿) に卵塊を接種し、40から50日栽培した。これを数世代繰り返してネコブセンチュウ感染株を増やした後、接種40から50日後のトマトから卵塊を大量に採取し、2期幼虫をふ化させ

たものを接種に用いた。

線虫の接種

トマト（品種：強力米寿）とハウセンカ（品種：椿咲混合）を供試した。培養土（与作N150，ジェイカムアグリ社製）を充てんしたセルトレー（200穴/トレー）に播種し，3週間栽培した後，同培養土と浜砂を1:1の割合で充てんしたポリエチレンポット（直径10.5 cm）に苗を移植した。移植1週間後に2期幼虫を各ポットに200個体接種し，ガラス温室で栽培した。

光学顕微鏡観察とビデオによる記録

供試植物にネコブセンチュウを接種し，30日間栽培した後，マイクロスライサー（DTK-3000，堂坂EM社製）を用いて180 μm の厚さで根こぶ切片を作製した。これら切片の中から，無傷の雌成虫を含むものを光学顕微鏡下で選別した。雌成虫の動態は光学顕微鏡とデジタルカメラ（HC-300Z，Fujix社製）およびビデオレコーダー（DVR-HG865，三菱電機社製）を用いて観察，記録した。0.1秒ごとの口針の動きを記録するため，動画編集ソフト（デジゾー，プリンストン社製）を用いて動画の解析を行った。

3) 結果と考察

根こぶのマイクロスライス切片内の雌成虫を光学顕微鏡で観察し，2時間以上にわたってビデオで記録した。口針の突き出し運動は食道，背部食道腺膨大部，食道球の短いポンピングに伴って起こった。口唇部と口針節球との間の距離を0.1秒毎に測定し，口針の前後運動（第1図A）の時間間隔を比較した（第1図B）。口針を引っ込めている時の長さは13.5 μm であるのに対して，突き出した時には10.5から12.0 μm であった。それゆえ，口針は3 μm まで突き出していると推察される。観察の結果に基づいて，口針の突き出しパターン

を次の4つのカテゴリーに分類した。(a) 突き出しの停止 (口針を完全に引っ込めている状態), (b) 通常の間針の突き出し (巨大細胞へ1秒間に1回の割合で口針を突き出している), (c) 素早い口針の突き出し (1秒間に3から5回の割合で口針を突き出す), (d) 挿入した口針の静止 (口針を突き出した状態で静止している) (第1図B)。

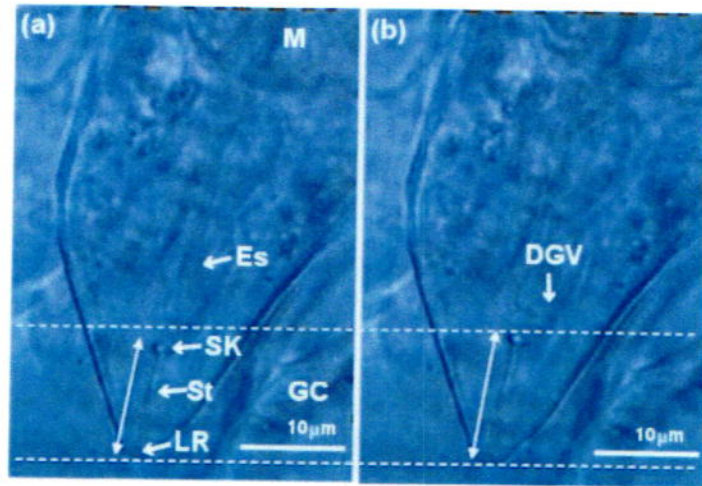
雌成虫の頭部は巨大細胞間の狭い隙間にあり、唇部と頭部先端が前方へ伸長したり、後方へ収縮したりしていた (第2図)。この動きは、口針の継続的な突き出し運動を伴っていた。Linford (1937) による報告と同様に、雌成虫の片側の頭部体環が伸長している時には、もう片側は収縮していた。頭部の輪郭と体環は、唇部の動きに伴って変形したが、口針節球付近より後方は動かしておらず、形態的な変化は認められなかった (第2図)。

頭部と口針の突き出しパターンと、各動作パターンが継続する時間を第3図に示した。通常の間針の突き出しは頭部の回転に伴って起こり、その後に頭部を静止し、ある一方向へ向けた素早い口針の動きが30~90秒間続いた。素早い口針の突き出し運動の後、雌成虫はしばしば口針を挿入したまま突き出し運動をやめ、食道球を約30秒間振動させる行動を見せた。その後口針の挿入をやめ、5から40秒間静止した。このような一連の動態は290から380秒で完了した。それゆえ、通常の間針の突き出しにより突き出す方向を探し、素早い突き出しにより巨大細胞へ口針を挿入、突き出しの停止により吸収または分泌をしていると推察された。Wyss *et al.* (1992) は、2期幼虫の吸餌動態として (1) 口針を突き出す、(2) 食道球の中心弁を振動させる、(3) 素早く口針を動かす、(4) 頭部を動かす、といった特徴的な連続性があることを報告している。このような2期幼虫でみられた連続性は、今回雌成虫でも観察することが可能であった。テンサイシストセンチュウ (*Heterodera schachtii*) では、2期幼虫が口針を突き出したまま約1時間程度食道球を振動させることが報告されている (Wyss and Zunke 1986)。サツマイモネコブセンチュウ2期幼虫では、食道球の振動は数十秒間継続するとされている (Wyss *et al.* 1992)。Wyss and Grundler (1992) は、Hussey and Mims (1991) が巨大細胞内に多くのfeeding tubeを確認した

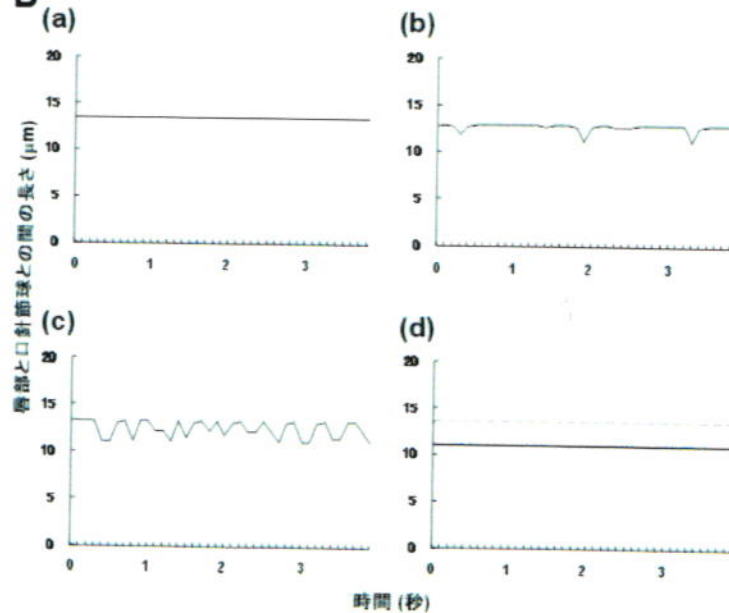
ことから、サツマイモネコブセンチュウ雌成虫も2期幼虫で見られたような吸餌サイクルを行うことを推測している。よって、サツマイモネコブセンチュウでは2期幼虫，雌成虫とも比較的短い吸餌サイクルを繰り返すと考えられた。

以上のことから推察される，根こぶ内における雌成虫の一連の「頭部の動き」と「口針の突き出し」について，各動作パターンの意義を第4図に模式的に示した。今回用いた組織学的観察手法は，寄主植物の巨大細胞におけるネコブセンチュウの吸餌動態の観察に有用であると考えられる。

A



B

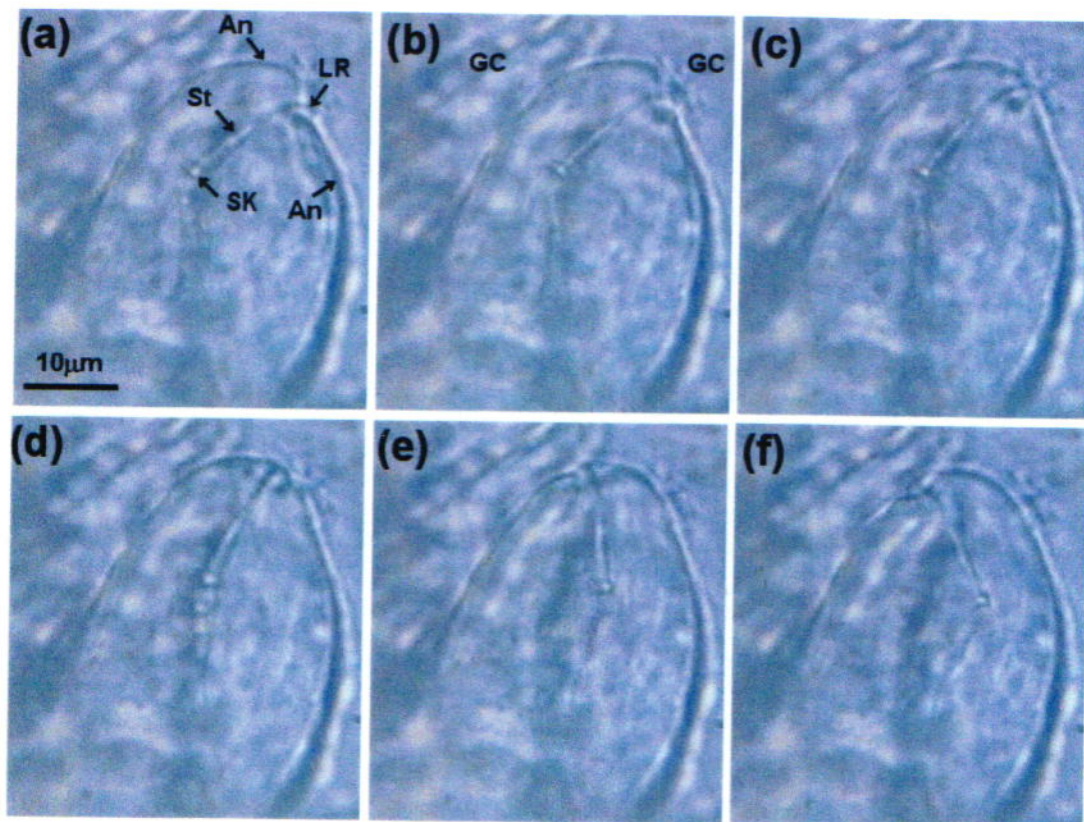


第1図. サツマイモネコブセンチュウ雌成虫における口針の突き出し

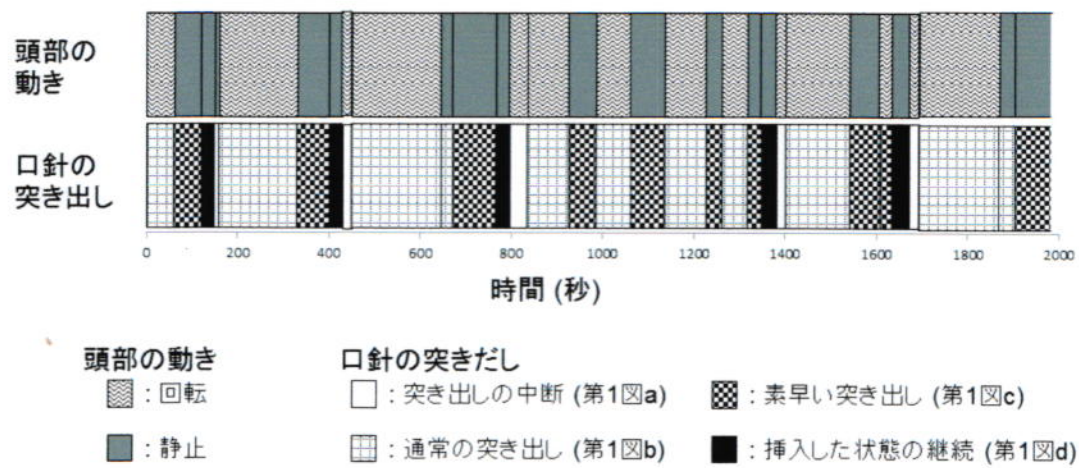
A: ホウセンカに形成された根こぶのマイクロスライサー切片における口針の突き出しを示した光学顕微鏡写真. (a) 口針を突き出した状態と (b) ひっこめた状態. 上の点線は口針をひっこめた場合の口針節球の位置を, 下の点線は唇部を示す. 矢印は唇部と口針節球との間の距離を示す.

B: トマト根こぶ内の巨大細胞における雌成虫の口針突き出しの典型的な4パターン. 唇部と口針節球との間の距離を0.1秒毎に測定したパターンの分類. (a) 口針突き出しの停止, (b) 通常の間針突き出し (1秒間に1回程度), (c) 素早い口針突き出し, (d) 口針の挿入 (数十秒程度). 点線は, 口針をひっこめたときの口針節球と唇部先端との間の距離の最大値を示す.

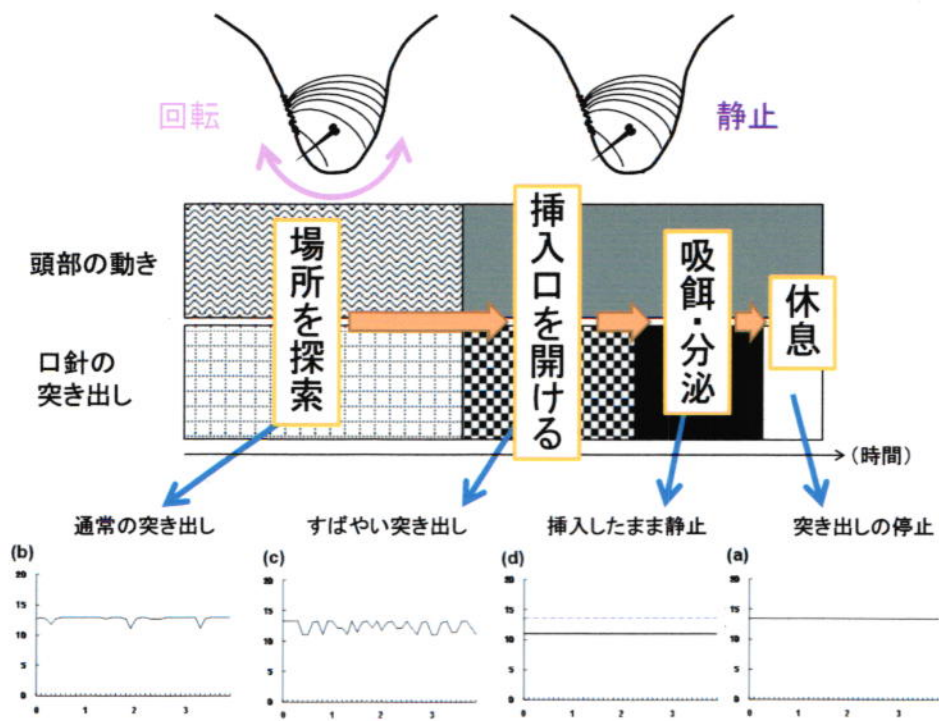
M: 食道球, Es: 食道, SK: 口針節球, St: 口針, LR: 唇部, GC: 巨大細胞, DGV: 背部食道腺



第2図. ホウセンカの根こぶ内におけるサツマイモネコブセンチュウ雌成虫の口針と頭部の動き
 (a) 0 秒 (動き始め), (b) 3 秒後, (c) 6 秒後, (d) 9 秒後, (e) 12 秒後, (f) 15 秒後. 唇部だけでなく, 口針節球や近接した体環部分も動いている. 一方, 口針節球より後方の頭部は静止している.
 An: 体環, LR: 唇部, St: 口針, SK: 口針節球, GC: 巨大細胞



第3図. トマト根こぶ内のサツマイモネコブセンチュウ雌成虫の頭部の動きと口針突き出しの経時変化
 頭部は回転または静止, 口針の突き出しパターンは第1図Bで示した (a) 突き出しの停止, (b) 通常の
 突き出し, (c) 素早い突き出し, (d) 挿入した状態での静止を表わす.



第4図 根こぶ内における雌成虫の「頭部の動き」と「口針の突き出し」の各動作パターンの意義

2. ネコブセンチュウ 2 期幼虫と雌成虫における頭部形態の差異と吸餌行動の関係

1) 緒 言

ネコブセンチュウは寄主植物との円滑な寄生関係を構築するために様々な適応をしている。適応のための形態的变化の例として、植物寄生前の 2 期幼虫のクチクラは、垂直な筋が通った基底層を持っており、寄生後に退化し始める (Bird 1968)。このクチクラの構造変化は、寄生前においては、土壌中や植物内の移動による環境の顕著な変動から幼虫を保護するため、寄生後においては、ネコブセンチュウが肥大しやすいための適応であると考えられている (Bird 1971)。前章の吸餌行動観察においても、根内での雌成虫は頭部の位置を固定したまま口針の向きを変化させており、2 期幼虫のそれとは異なることが明らかとなった。この要因として頭部形態の変化が想定されるが、頭部の動きの違いについて外部形態の観点から検討した例はない。そこで 2 期幼虫と雌成虫の頭部の形態について走査電子顕微鏡を用いた解析を行い、その違いの意義について検討した。

2) 材料と方法

根こぶ内の雌成虫と巨大細胞の境界面を、走査電子顕微鏡を用いて観察した。根こぶ内に雌成虫を含むマイクロスライス切片を、pH 7.2 に調整した 0.05 M カコジル酸緩衝液希釈の 2.5 % グルタルアルデヒドに 24 °C で 2 時間浸漬した。その後、同緩衝液で希釈した 1 % 四酸化オスミウムを 24 °C で 2 時間曝露した。試料はアルコールシリーズで脱水し、t-ブチルアルコールに浸漬して置換した後、凍結乾燥機 (ES-2320, 日立社製) で乾燥させた。試料はイオンスプッター (E-1010, 日立社製) を用いて 8 nm の厚さに白金蒸着し、走査電子顕微鏡 (S-4700, 日立社製) を用いて 15 kV で観察した。

3) 結果と考察

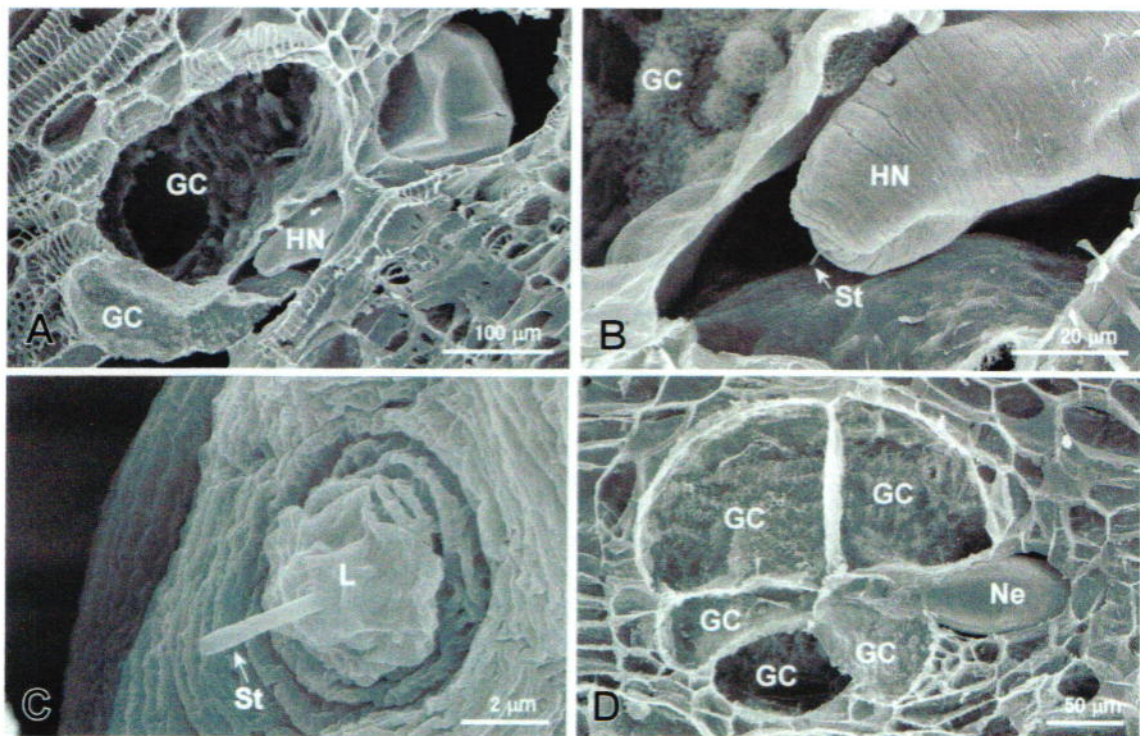
光学顕微鏡を用いてマイクロスライス切片から雌成虫を含むものを選別し、走査電子顕微鏡を用いて観察した。雌成虫の頭部は巨大細胞が複数集まった場所の中央部分にある、

狭い細胞間隙に位置していた（第5図A, D）。雌成虫の頭部先端を含む細胞間隙は非常に狭く、自由に動くことは困難であることがうかがえた。口針（直径 $0.44\text{ }\mu\text{m}$ ）は頭部先端から突き出されていた（第5図B, C）。突き出された口針の長さは $3.1\text{ }\mu\text{m}$ で（第5図C）、光学顕微鏡で観察した第1図の口針の突き出し長の最大値と一致した。巨大細胞の細胞壁の厚さは 0.8 から $2.3\text{ }\mu\text{m}$ （Hussey and Mims 1991）であることから、この長さは細胞壁を貫通させるために必要な長さであると推察された。Hussey and Mims（1991）が透過電子顕微鏡にて観察した報告によれば、サツマイモネコブセンチュウに感染したトマト根の巨大細胞における口針による穴の幅の長さは、最大 $0.43\text{ }\mu\text{m}$ であった。この値は今回走査電子顕微鏡を用いて観測した口針の直径（ $0.44\text{ }\mu\text{m}$ ）とほぼ一致した（第5図C）。

雌成虫の頭部はしわのように折りたたまれているのに対して（第5図C, 第6図A）、2期幼虫ではそのような形態は認められなかった（第6図B）。雌成虫の頭部先端の体環の形態は、光学顕微鏡により観察したように、全方向に頭部を動かすことができるようになっていた（第2図）。一方で、2期幼虫の体環はしわのように折りたたまれてはおらず（第6図B）、2期幼虫は頭部先端の全体を使って方向を変えていた（Wyss *et al.* 1992）。また2期幼虫の体壁の筋肉は体の全体を通して見られたのに対し、雌成虫では頭部先端に限定され（Elsea 1951）、雌成虫は頭部先端以外にある体壁の筋肉を消失していた（Bird 1967, Bird 1971）。これらの報告は、雌成虫が頭部先端のみを動かして唇部と口針節球を動かすことを支持している。

雌成虫と2期幼虫の根内における口針と頭部の動きを模式的に示した（第7図）。ネコブセンチュウの頭部先端に位置する labial disc と medial lip は、2期幼虫ではダンベル型（Eisenback and Hirschmann 1979）で、厚く、構造的に頑丈であるのに対して、雌成虫では星型で薄く、軟弱な構造をしていた（第6図A）。2期幼虫では根に侵入するための入口を確保するために、根の細胞の結合部分に口唇を擦りつけ、細胞壁間の結合を弱めることが報告されている（Wyss *et al.* 1992）。よってこの2期幼虫の頑丈な構造は根内に侵入

する際に用いると推察される。一方で、雌成虫は根内に埋もれているため細胞壁の間からさらに侵入する必要がなく、頭部先端の体環が巨大細胞の吸餌に特化した形になっていると考えられた。



第5図. ホウセンカ根こぶ内のサツマイモネコブセンチュウ雌成虫の走査電子顕微鏡写真

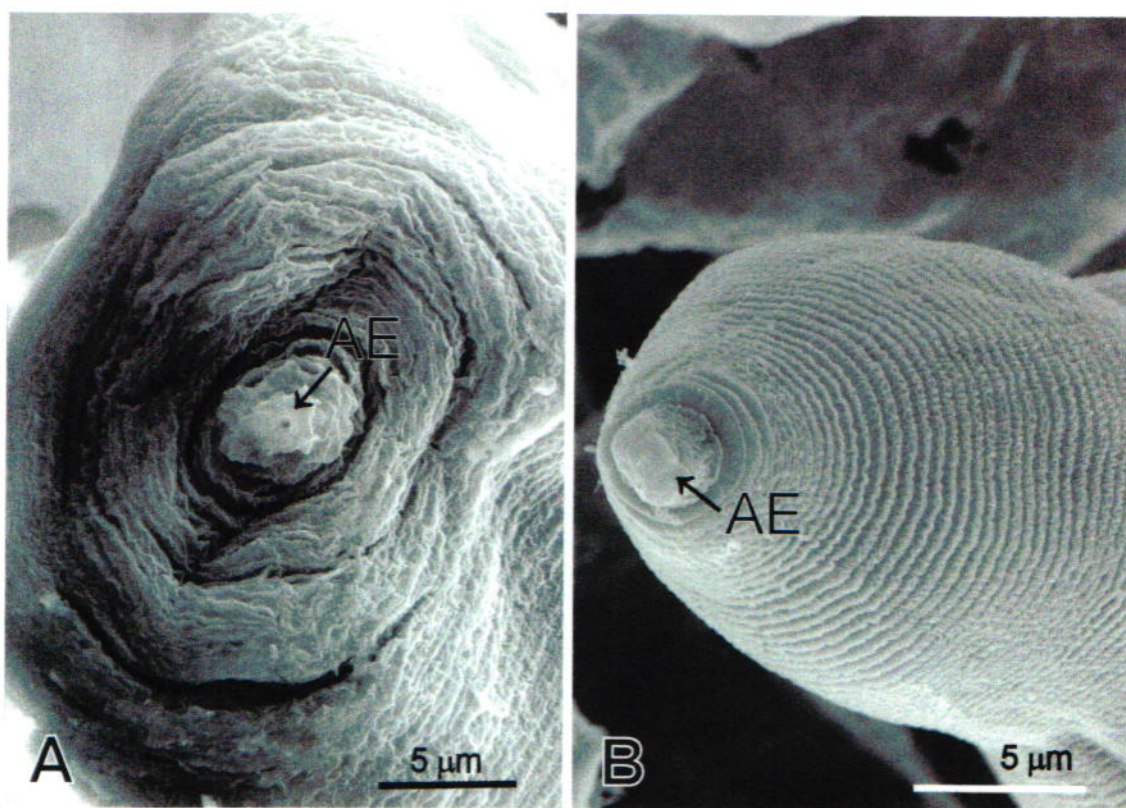
A: 巨大細胞付近の雌成虫

B: Aの雌成虫前方先端を拡大したもの 口針を突き出していることがわかる

C: Bの雌成虫の唇部 突き出している口針の長さは約3.1 μmである

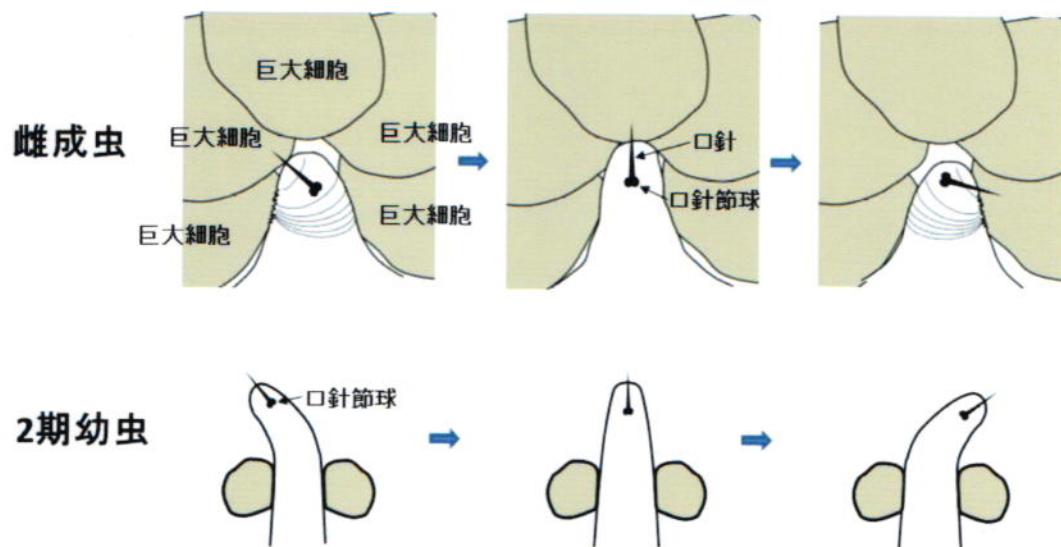
D: 巨大細胞に頭部を囲まれた雌成虫 線虫の頭部先端は周囲にある5つの巨大細胞を吸餌するのに都合のよい場所に位置している

GC: 巨大細胞, HN: 線虫頭部, St: 口針, L: 唇部, Ne: 線虫



第 6 図. ホウセンカ根こぶ内のサツマイモネコブセンチュウ雌成虫 (A) と発達中の 2 期幼虫 (B) の頭部の走査電子顕微鏡写真

雌成虫の頭部はしわが折りたたまれており、頭部先端を様々な方向へ自由に動かすことができるように見える点が 2 期幼虫と異なっている。2 期幼虫の唇部は雌成虫と比較して構造的に頑丈である。AE は頭部先端。



第7図. ホウセンカ根こぶ内のサツマイモネコブセンチュウ雌成虫と発達中の2期幼虫における、口針と頭部の動き方の模式図

雌成虫の頭部先端はしわのように折りたたまれており、頭部基部を動かさずに口針の方向を変えることができる。一方、2期幼虫ではそのような構造になっておらず、また周囲に空間があることから、頭部全体を動かして口針の方向を変える。

3. ネコブセンチュウが誘導した巨大細胞の微細構造による解析

1) 緒 言

ネコブセンチュウが植物に寄生すると、寄主植物に巨大細胞と呼ばれる細胞の形成を誘導する。この巨大細胞は寄主植物から養分を獲得、集積し、ネコブセンチュウが成長・産卵するために必要な養分を提供している。寄主植物から巨大細胞への養分の移行は、巨大細胞周囲に新たに形成される維管束と、細胞壁の内方成長によって支持されている。巨大細胞は糖やアミノ酸等を豊富に含み、多核で、細胞壁の内方成長が発達し、ゴルジ体、小さい液胞、小胞体、ミトコンドリアなどのオルガネラが多数形成されている (Berg 2008)。このことから、巨大細胞に移行してきた養分が変換されてネコブセンチュウに吸収されることが推測できる。巨大細胞は、植物が生産する同化産物由来の養分をネコブセンチュウが吸収するまでに介在する、養分加工・貯蔵工場としての機能を持っていると考えられる。

巨大細胞はかねてから形成過程や機能の解明が試みられ、その構造について光学顕微鏡や電子顕微鏡により多数の研究が行われてきた。透過電子顕微鏡を用いた微細構造観察によれば、ネコブセンチュウの接種 4 日後から巨大細胞の形成が開始され、細胞壁が肥厚し、細胞壁の密度とその容積が増大、核の数の増加といった一連の巨大細胞の形成が明らかにされている (Bird 1961)。Hussey and Mims (1991) によれば、巨大細胞内の *feeding tube* 周囲には粗面小胞体やゴルジ体が多数認められていることから、*feeding tube* 付近で合成・修飾されたタンパク質が *feeding tube* を介してネコブセンチュウへ吸収されることが示唆される。しかし、巨大細胞内の全域に存在するオルガネラが養分移行とどのように関係しているかについては不明である。

走査電子顕微鏡は三次元像を得ることができ、また比較的大きい試料を観察に供試することができるため、巨大細胞内の構造を明らかにするのに有効であると考えられる。しかし、従来法では細胞質基質に埋もれている細胞内膜構造の観察は技術的に困難であったため、細胞内容物を除去する手法を用いて、細胞壁の内方成長の表面構造が三次元的に明ら

かにされている (Jones and Dropkin 1976) だけで、細胞内の膜構造を三次元的に示した例はない。

その後、走査電子顕微鏡を用いて細胞内膜構造を観察するための試料作製法が開発された (Tanaka and Naguro 1981, Tanaka and Mitsushima 1984)。この方法はオスミウム浸軟法と呼ばれ、希釈したオスミウム溶液を用いて細胞内基質のみを溶解させることで、内部のオルガネラを走査電子顕微鏡により観察することができるものである。哺乳類の組織でのみ適用可能であったが、Koga *et al.* (1991) により植物細胞や糸状菌に応用できる条件が明らかにされ、植物組織において寄主-寄生者の境界面を三次元的に示すことができるようになったため、養分移行などの相互関係を明らかにするのに有用であると期待されている。

そこで、本研究では巨大細胞内の膜構造を三次元的に明らかにするため、オスミウム浸軟法を根こぶ組織に応用し走査電子顕微鏡観察をおこなった。

2) 材料と方法

供試線虫

II-1 と同様の材料を供試した。

線虫の接種

トマト (品種: 強力米寿) とハウセンカ (品種: 椿咲混合) を供試した。培養土 (与作 N150, ジェイカムアグリ社製) を充てんしたセルトレー (200 穴 / トレー) に播種し、培養土と浜砂を 1:1 の割合でポリエチレンポット (直径 10.5 cm) に充てんし、3 週間後に苗を移植した。移植後 1 週間後に 2 期幼虫を各ポット 200 個体接種し、ガラス温室で栽培した。

オスミウム浸軟法による走査電子顕微鏡観察

試料作製法手順概略を第 8 図に示した。供試植物にサツマイモネコブセンチュウを接種し、30 日間栽培した後、根を掘り出し水洗し、根部の根こぶ部分だけを切り出して電子顕微鏡用の試料とした。以下、Koga *et al.* (1991) の方法に従って試料を作製した。1%四酸化オスミウム 0.05 M カコジル酸緩衝液に 20℃で 2 時間浸漬した。緩衝液で洗浄した後、試料を 5, 30, 50% DMSO 溶液にそれぞれ 30 分浸漬した。50% DMSO 中の試料をゼラチンカプセルに移しシールした。カプセルは液体窒素中で凍らせ、カミソリの刃をハンマーで切断した。切断は凍結切断器 (TF-1, エイコー・エンジニアリング社製) を用いた。切断した試料はただちに 50% DMSO 溶液へ移し、室温で解凍させた。それらを DMSO が完全に除去できるまで緩衝液で繰り返し洗浄し、pH7.2 に調整した 0.05M 0.1%四酸化オスミウムに置換した。試料は 20℃に保ち、9 日間毎日 0.1%四酸化オスミウムと交換した。

9 日後に試料を 1%四酸化オスミウムで 1 時間固定した。2%タンニン酸緩衝液で 1 時間処理し、その後 1%四酸化オスミウムで 1 時間固定した。この手順は試料の電子伝導性を促進するものである。試料はエタノールシリーズで脱水した。その後、酢酸イソアミルに移し、試料を臨界点乾燥器で乾燥させ (HCP-1, 日立工機社製)、イオンスプッター (E-1010, 日立社製) を用いて白金を 8 nm の厚さにコーティングした。コートしたのち、走査電子顕微鏡 (S-4700, 日立社製) を用いて 15 kV で観察した。

透過電子顕微鏡観察

供試植物にサツマイモネコブセンチュウを接種し、30 日間栽培した後、根を掘り出し水洗し、根部の根こぶ部分だけを切り出して試料に用いた。1.44%ホルマリン、1%グルタルアルデヒド、0.1 M カコジル酸緩衝液の混合液で固定を行った。その後、0.15 M カコジル酸緩衝液により 4℃で 30 分震とうし洗浄した。2.5%グルタルアルデヒド、0.1 M カコジル酸緩衝液の混合液中でカミソリを用いて根こぶを幅 1.5 mm, 長さ 3 mm の大きさに細

切りした後、4℃で2時間固定を行い、その後0.15 M カコジル酸緩衝液で洗浄した。後固定は1%四酸化オスミウムを含む0.1%カコジル酸緩衝液により4℃で2時間行った。エタノールシリーズで脱水し、QY-1に置換し、ケトール651混合液に包埋した。包埋した試料を、ガラスナイフを用いて光学顕微鏡用切片を作製しスライドガラスに積載、トルイジンブルー染色した。観察箇所を光学顕微鏡下で確認した後、ダイヤモンドナイフを用いて電子顕微鏡用切片を作製し、グリッドメッシュに積載して、酢酸ウラン染色と鉛染色を行い、透過電子顕微鏡(H-7650, 日立社製)で観察を行った。

3) 結果と考察

第9図に、オスミウム浸軟法による根こぶ内の巨大細胞と雌成虫の走査電子顕微鏡写真を示した。三次元的な像が得られることから、巨大細胞に沿って木部が並んでいることが明確に見て取れる(第9図A)。走査電子顕微鏡観察のため、根こぶの全体(第9図A)を観察した上で、特定の部分(第9図B)を高倍率で観察することができる(第9図B)。オスミウム浸軟法を用いて細胞質基質のみを除去していることから、拡大した像ではミトコンドリアや液胞を三次元的に観察することができた。

第10図に、透過電子顕微鏡による巨大細胞を示した。通常の細胞(第10図右下)に見られるような大きい液胞がなく、細胞質密度が高い。小さい液胞、ミトコンドリアが多数ある。細胞壁は肥厚し、部分的に内方成長が見られる。

第11図に、トマト根こぶ内に形成された巨大細胞の細胞壁付近の像を示す。透過電子顕微鏡写真では細胞壁内方成長は一様に電子密度が高くなっている(第11図a)。走査電子顕微鏡写真では細胞質が除去されて内方成長の突起が明瞭に観察できる(第11図b)。内方成長の突起の切断部分では、内部の物質が抜けて中空になっている。

ソラマメの子葉やコカナダモ属植物の葉における転送細胞の細胞壁内方成長は、透過電子顕微鏡による解析から、電子密度の異なる二つの領域から構成され、外側は糖タンパク

質やカロースが蓄積し、内側はペクチンやセルロース、ヘミセルロースが蓄積していることが報告されている (Vaughn *et al.* 2007, Ligrone *et al.* 2011). 今回の透過電子顕微鏡による解析では電子密度の異なる領域は認められなかったが、走査電子顕微鏡解析では突起内側が中空になっていたことから、突起外側は試料作製過程で失われない成分で、内側は溶解される成分から構成されていることが示唆される.

第 12 図に、細胞壁の内方成長の拡大図を示した. 内方成長の突起付近にゴルジ小胞を備えたゴルジ体や粗面小胞体が見られた. 植物の転送細胞では、細胞壁の内方成長付近に、分泌オルガネラの集積が見られ、それらが細胞壁の生合成プロセスに関与することが示唆されている (Offler *et al.* 2002). そのため、ネコブセンチュウが誘導した巨大細胞の細胞壁内方成長においても、付近の小胞体やゴルジ体からタンパク質等が移行して内方成長の発達に関与していることが推察される. また、巨大細胞の細胞壁の内方成長は、周囲の維管束から養分の取り込みを促進させる (Jones and Northcote 1972, Jones *et al.* 1975, Golinowski *et al.* 1996) ことから、内方成長の付近に多数見られた小胞体やゴルジ体が、内方成長の細胞膜を通して細胞内に取り込まれた養分を集積、貯蔵する際の経路になっていることが推察される.

第 13 図に、巨大細胞内の細胞壁付近に発達した小胞体を示した. 小胞体の層の間やその付近に多数の液胞が認められる. 液胞膜の生成は小胞体に由来していると報告されている (Amelunxen and Heinze 1984, Hilling and Amelunxen 1985). このことは、巨大細胞においても小胞体から液胞が形成されることを支持するものである.

第 14 図に、巨大細胞内の液胞を拡大した透過電子顕微鏡写真 (a) と走査電子顕微鏡写真 (b) を示した. 透過電子顕微鏡により二次元的に示したものでは、複数の液胞が隣り合っているように見えていたものが、走査電子顕微鏡による三次元的像では、液胞どうしが連結している様子が認められた. 巨大細胞内に多数の小さな液胞が存在していることは知られていたが、これらの液胞に連続性が見られたことは、液胞が相互に関係していること

を示唆している。

植物細胞における、液胞の連結や融合に関する情報は限られている。シロイヌナズナの茎頂分裂組織では、細胞分裂時に中央液胞が変形、分断、融合しつつ分配されることが電子顕微鏡解析により明らかとなっている (Seguí-Simarro and Staehelin 2006)。

液胞には分解型液胞とタンパク質貯蔵型液胞の主に 2 種類あることが知られている (Zouhar and Rojo 2009)。植物の種子では種子の発達や成熟に伴い、多量のタンパク質が蓄積されるが、その多くがタンパク質貯蔵型液胞に貯蔵される (Bechtel and Barnett 1986, Hara・Nishimura *et al.* 1987)。タバコ発芽種子の根端細胞では、タンパク質貯蔵型液胞が融合して分解型液胞に転換する (Zheng and Staehelin 2011) ことから、発芽時に必要な養分を液胞に貯蔵して、必要な時に分解して利用する仕組みが備わっていることが示唆される。

これらのことから、巨大細胞内の液胞が連結・融合する理由を考察すると、(1) 細胞分裂に伴う液胞の分断が頻繁に起こるため、(2) タンパク質貯蔵型液胞に貯蔵したタンパク質を分解して、成長・産卵するネコブセンチュウに供給するため、といったことが考えられる。

第 15 図に、巨大細胞内にある小胞を含む液胞の透過電子顕微鏡写真 (a) および走査電子顕微鏡写真 (b および (c) を示した。液胞内に大小の小胞が含まれているものが見られた。

高等植物の種子では種子の発達・成熟時に大量のタンパク質を蓄積し、主にタンパク質貯蔵型液胞に貯蔵されることが知られている (Zheng and Staehelin 2011)。タンパク質貯蔵型液胞は、生殖器官だけでなく栄養器官でも確認されており、オオムギの根端分裂組織では同一細胞内に分解型液胞とタンパク質貯蔵型液胞の 2 種類の液胞が存在することも示されている (Paris *et al.* 1996)。このため巨大細胞においてもタンパク質貯蔵型液胞と分解型液胞がともに形成され、ネコブセンチュウへの養分供給に関与している可能性がある。

今回の透過、及び走査電子顕微鏡解析では、液胞内に小胞や電子密度の高い顆粒が示されたことから、液胞内での養分貯蔵や分解が行われていることが推察される。

第 16 図に、根こぶ内に形成された巨大細胞の液胞と直径 100 nm の管状器官を示した。この管状器官は、これまでの報告で、根端分裂組織の超高压電子顕微鏡を用いた三次元的な電子顕微鏡解析により確認されている provacuole (Marty 1978, Marty 1980) であると推察される。provacuole が巨大細胞内の液胞と連結し、さまざまな方向へ伸展していた。provacuole は液胞の始原とされている器官で、Trans-Golgi Network または小胞体から形成され、後に液胞になるとする液胞生成モデルが提唱されている (Marty 1999, Viotti 2014)。巨大細胞内で provacuole が様々な方向へ伸展していたことは、巨大細胞内のあらゆる場所に液胞が形成されていることと矛盾しない。

また、provacuole は液胞へのポストゴルジ輸送の際に介在するプレ液胞区画としての役割を担っている (Marty 1999)。provacuole には液胞と同様に液胞膜プロトンポンプが検出され、液胞膜タンパク質を輸送しているほか、既存の液胞に結合するものもあるとされる (Viotti *et al.* 2013)。このことから provacuole が液胞と連結して巨大細胞内の液胞間をつなぐネットワークとなり、巨大細胞内の養分移行に関与していることが推察される。

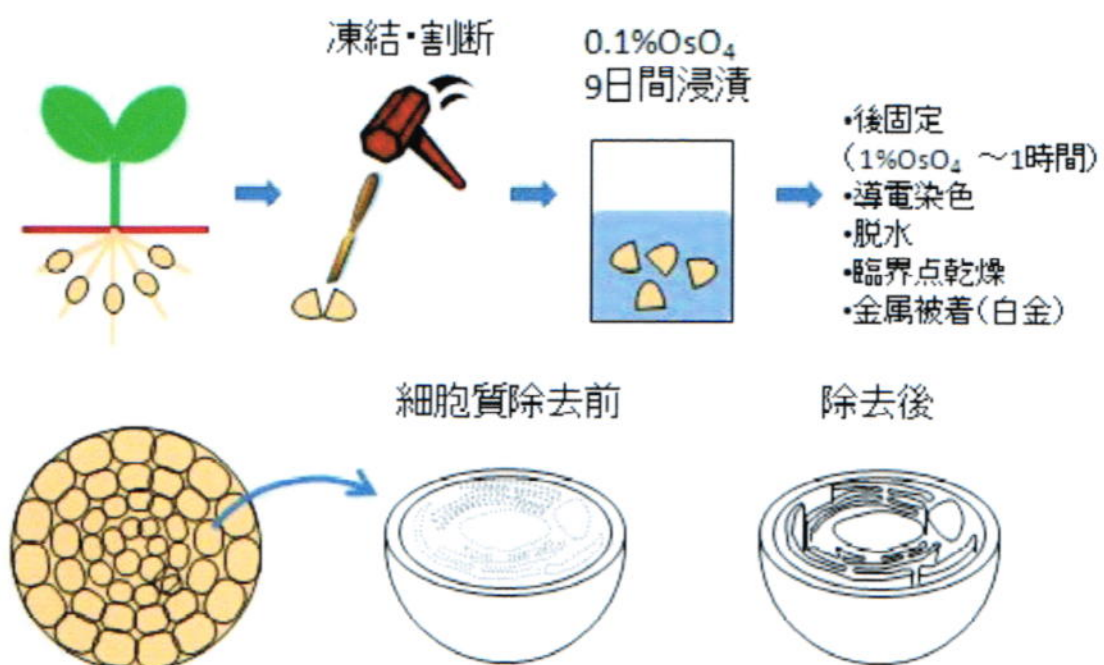
provacuole は直径が約 100 nm の管状の器官であることから、超高压電子顕微鏡を用いて立体像を観察できる方法で、かつ根端細胞のような分裂活性の高い細胞を用いるなど (Marty 1978, Marty 1980)、観察できる条件が限られており、そのために観察例が少なかったと推察される。今回用いた巨大細胞は、細胞の容積が大きく、細胞の活性が高いといった特徴を持ち合わせていることから、provacuole の観察をはじめとして、液胞の発生メカニズムを解明するための材料として有用であると考えられる。

第 17 図に、巨大細胞内で観察された feeding tube を示した。feeding tube 周辺には多数のミトコンドリアが見られることから、多量のエネルギーを必要としていることが示唆される。また、feeding tube の周囲には多数のゴルジ体と粗面小胞体が集積していた。feeding

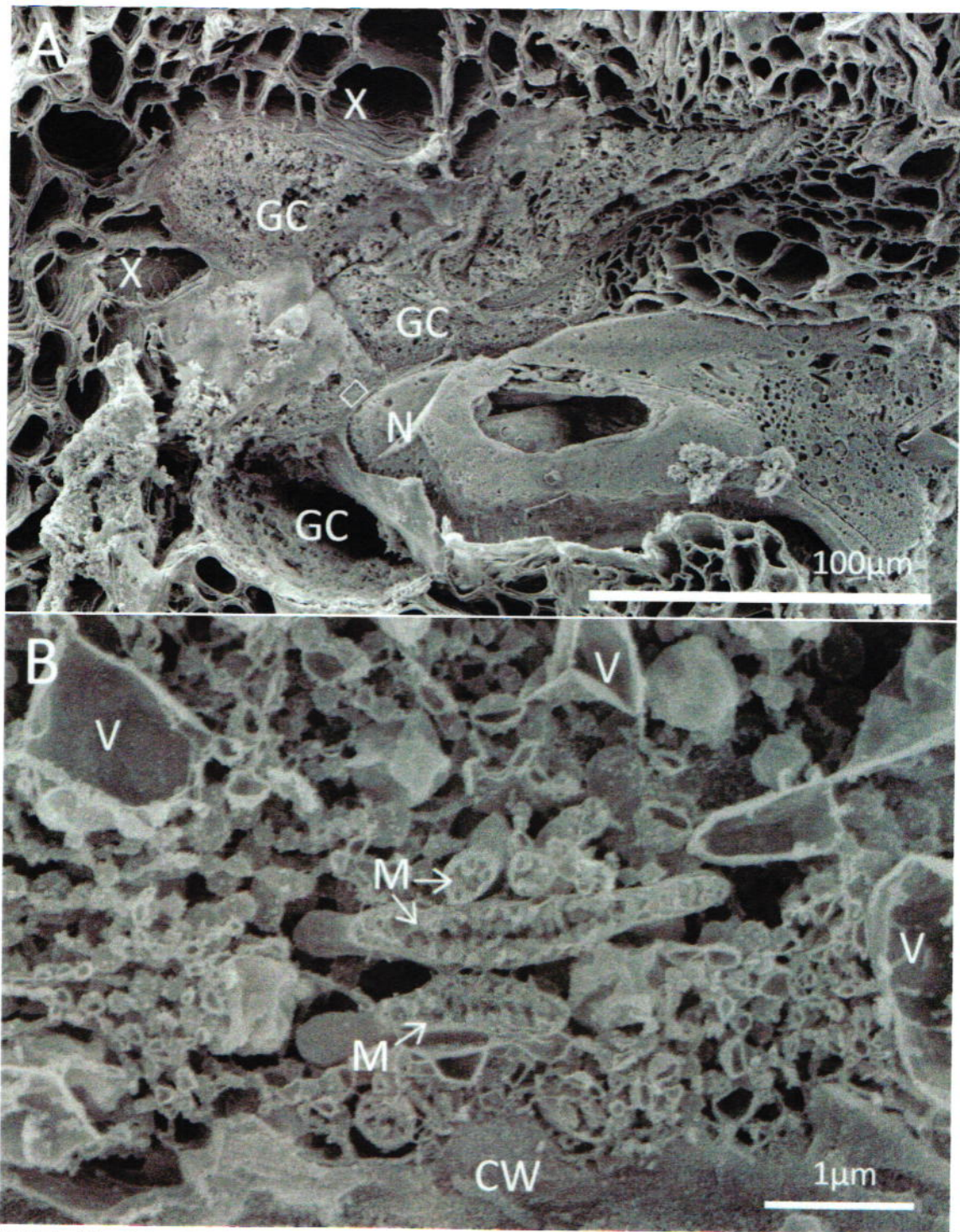
feeding tube は植物寄生性線虫が植物の同化産物を効率的に吸収するために必要であると考えられている (Hussey and Mims 1991). その具体的な方法としては、口針にオルガネラが詰まらないようにするフィルターとしての役割 (Razak and Evans 1976) や、可溶性養分の流入を促進する (Wyss 1984) といったことが想定されている. 今回の結果と併せて考えると、feeding tube 周囲でタンパク質が合成、修飾され、それらが feeding tube を通してネコブセンチュウに移行し、効率的に吸収されていることが推察された. また、feeding tube 周囲に多数のゴルジ体や小胞体が見られたことから、それに見合うだけのタンパク質の供給源が必要と考えられるが、周辺にある多数の液胞がその役割を担っているのではないかと推測される.

以上の結果から推察される巨大細胞からネコブセンチュウへの養分移行過程を、第 18 図に模式的に示した. 巨大細胞の周囲には新たに維管束が形成され、維管束により輸送される植物の養水分を取り込むために適した場所に巨大細胞は配置されている. 維管束に隣接する巨大細胞の細胞壁は内方成長が発達することから細胞膜の表面積が大きくなっており、養水分の輸送が促進される. 細胞壁付近には小胞体やゴルジ体があり、タンパク質が小胞体で合成され、ゴルジ体を通して (Hinz *et al.* 1999), または直接 液胞へ輸送される

(Levanony *et al.* 1992, Rubin *et al.* 1992). provacuole は液胞と連結し、液胞内に貯蔵されている物質の交換など相互に関係している. 液胞 (分解型液胞やタンパク質貯蔵型液胞) は融合し、貯蔵タンパク質が溶解される. 分解されたアミノ酸やペプチドが、feeding tube 付近にある小胞体やゴルジ体でネコブセンチュウに供給するための養分に作り変えられ、feeding tube を通してネコブセンチュウが養分を吸収するといった移行モデルが考えられる. 今後はこのモデルを仮定して、免疫電子顕微鏡や蛍光標識等を用いた解析により検証する必要があり、今後の研究課題として残されている.

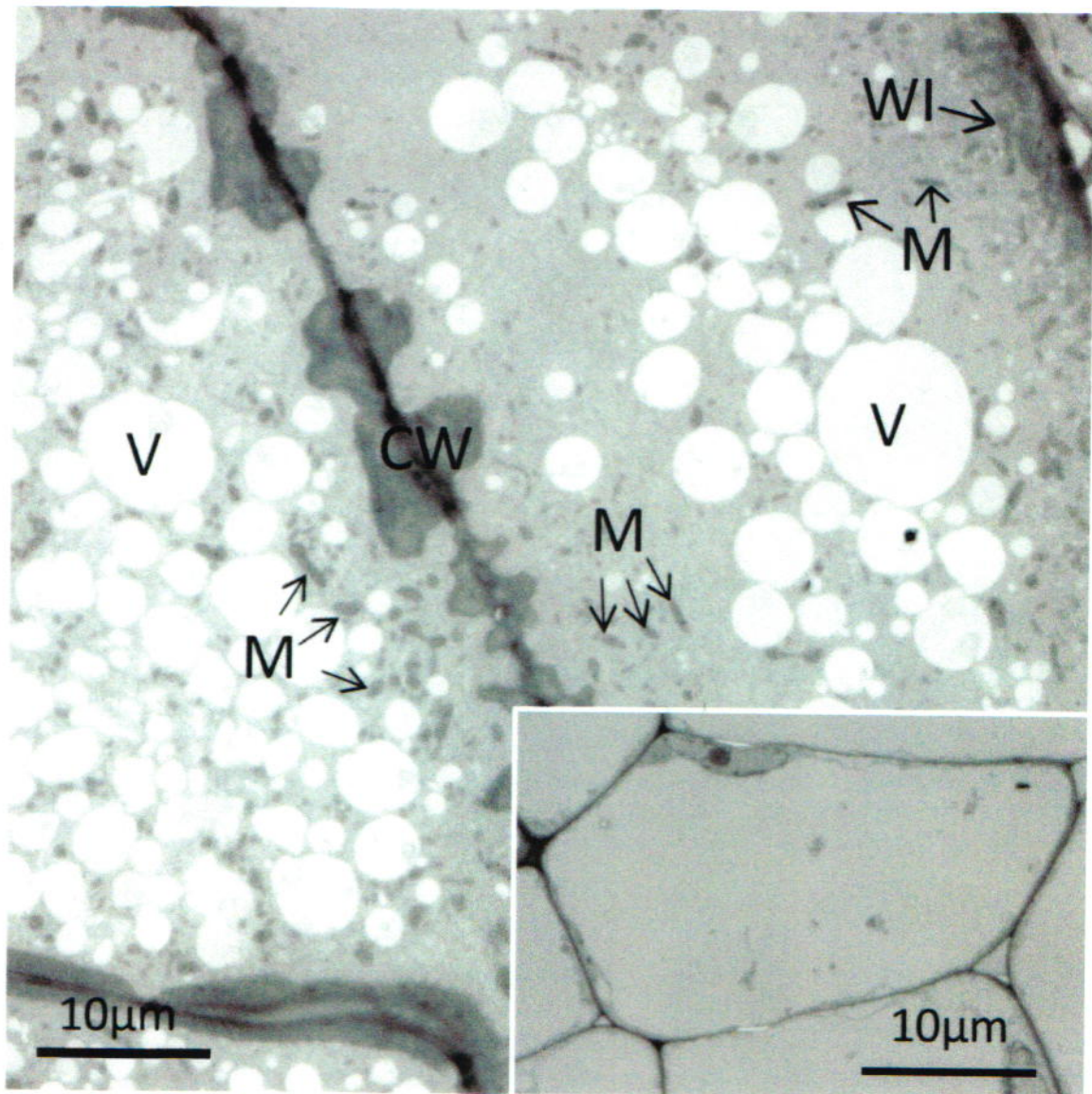


第8図. オスミウム浸軟法を応用した走査電子顕微鏡試料の作製手順



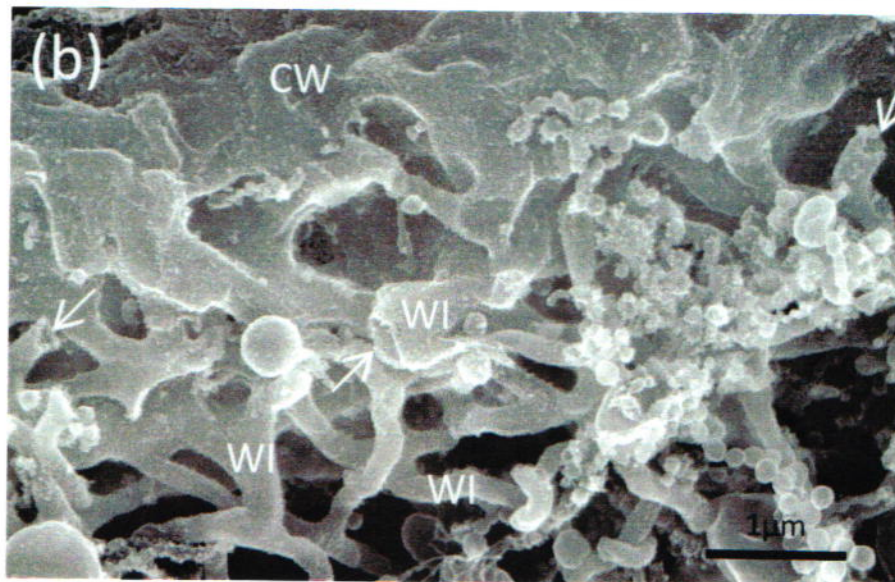
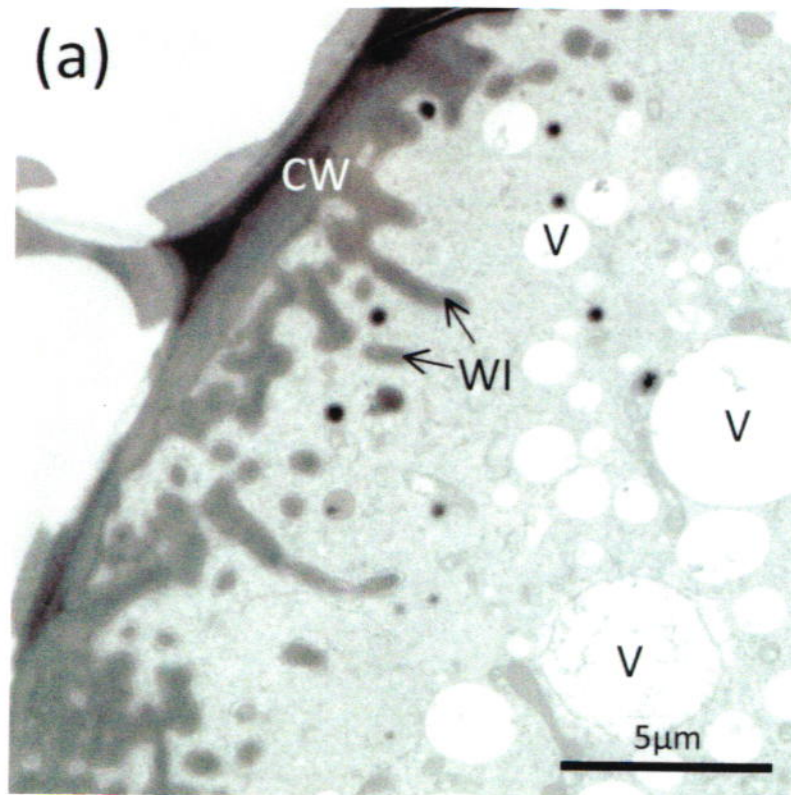
第9図. 根こぶ内の巨大細胞と雌成虫の走査顕微鏡写真

A: 雌成虫 (N) の頭部周囲を巨大細胞が取り囲んでいる。巨大細胞 (GC) の周囲に木部 (X) が並んでいる。
 B: A の長方形で囲んだ部分を拡大したもの。細胞質基質が除去され、ミトコンドリア (M) や液胞 (V) を明瞭に観察することができる。CW: 細胞壁



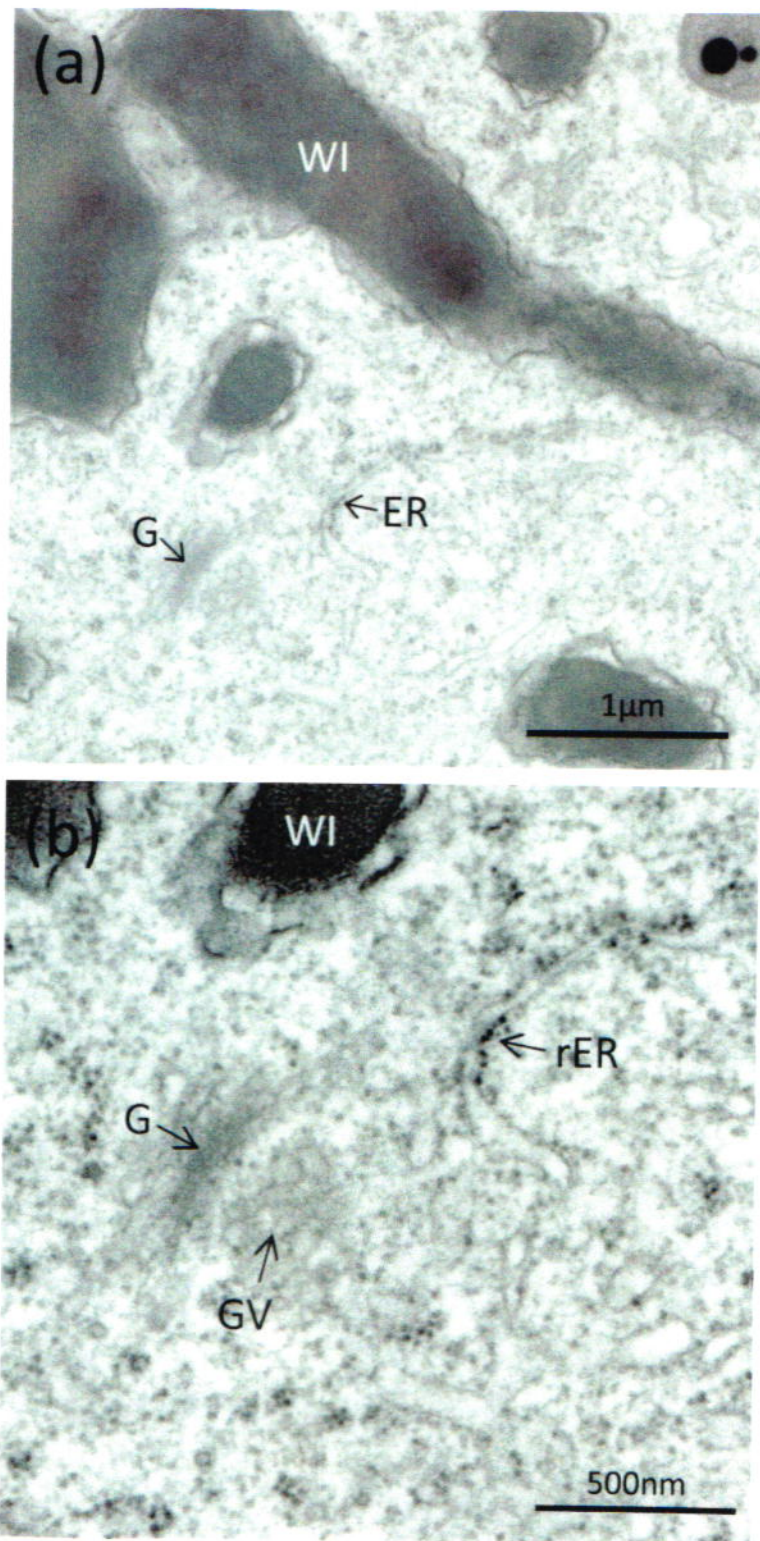
第 10 図. 巨大細胞の透過電子顕微鏡写真

細胞のサイズが大きく、細胞壁(CW)の肥厚や内方成長(WI)が見られ、液胞(V)やミトコンドリア(M)が多数存在している。右下枠内は巨大細胞でない柔細胞。



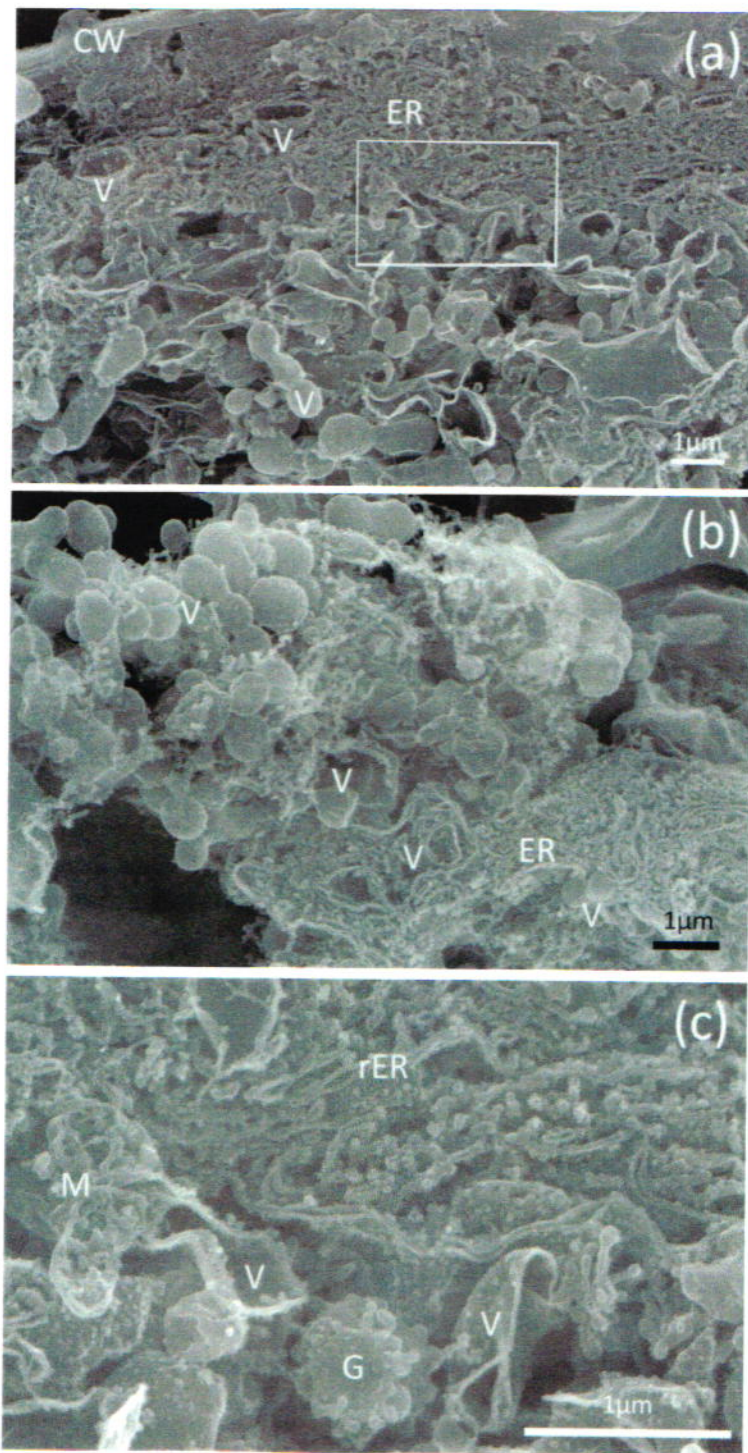
第 11 図. トマト根こぶ内に形成された巨大細胞の細胞壁の透過電子顕微鏡写真 (a) と走査電子顕微鏡写真 (b)

三次元的に観察した走査電子顕微鏡写真 (b) では、細胞壁内方成長 (WI) の突起内部 (白色矢印で示した箇所) が可溶性物質で充填され、外側の層は薄い壁で構成されていることから、内方成長の突起は異なる層から形成されていることが推察される。CW: 細胞壁, V: 液胞



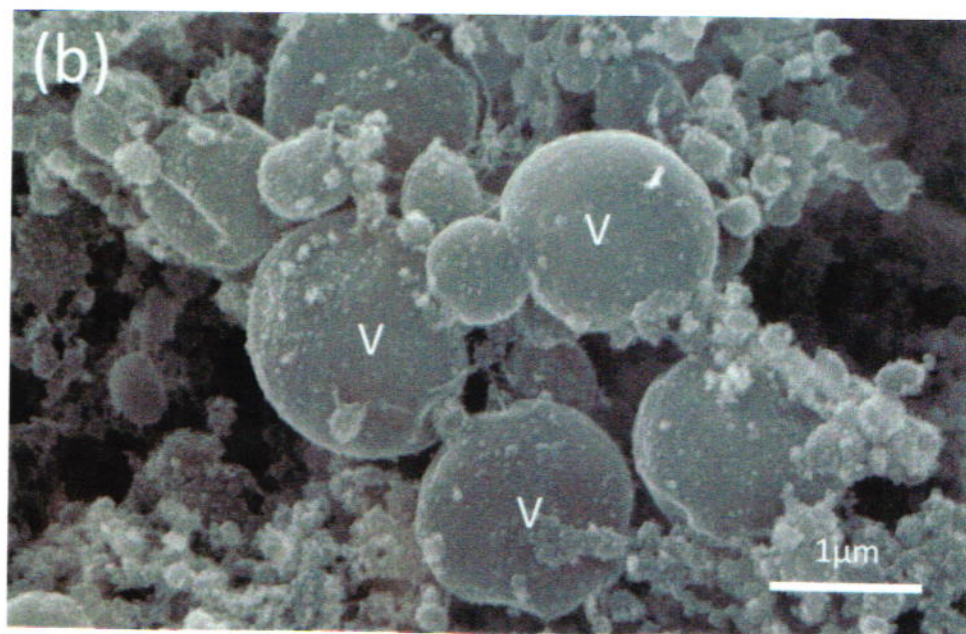
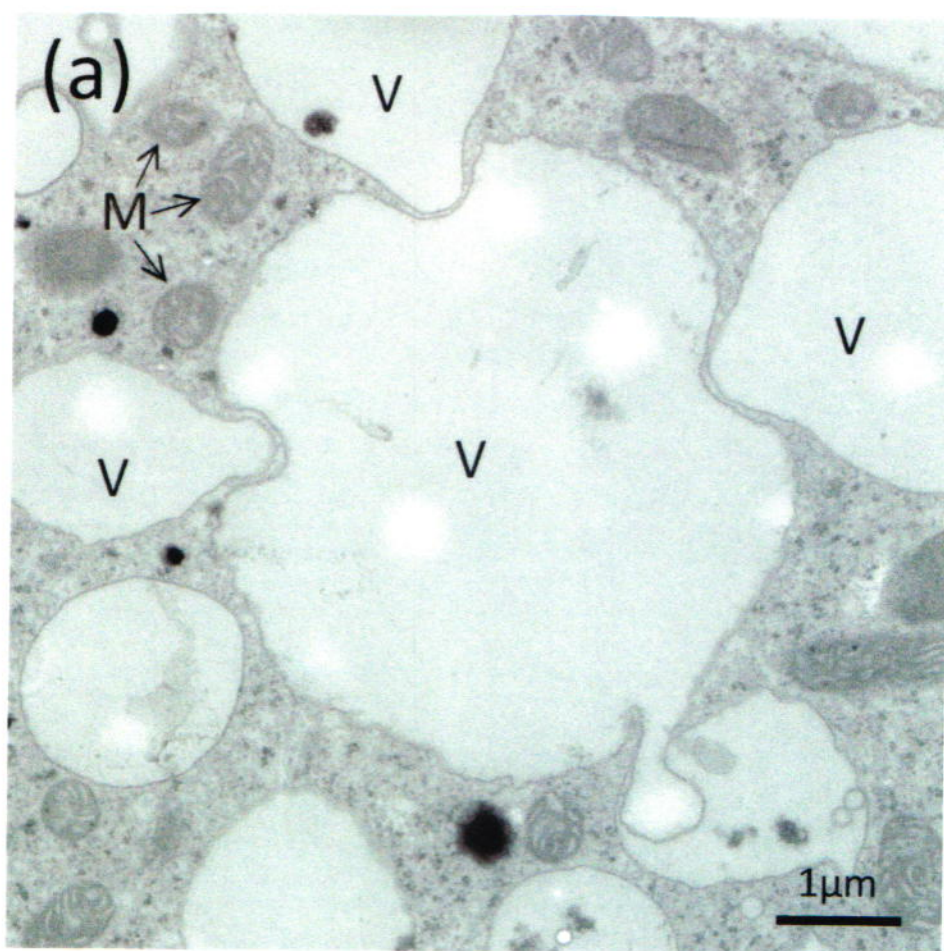
第 12 図. トマト根こぶ内に形成された巨大細胞の細胞壁周辺の透過電子顕微鏡写真

a: 細胞壁の内方成長 (WI) の突起, b: a を拡大した図. 粗面小胞体 (rER) と分泌小胞 (GV) を備えたゴルジ体 (G) があり, 細胞壁の内方成長 (WI) に分泌小胞を輸送していることが示唆される.

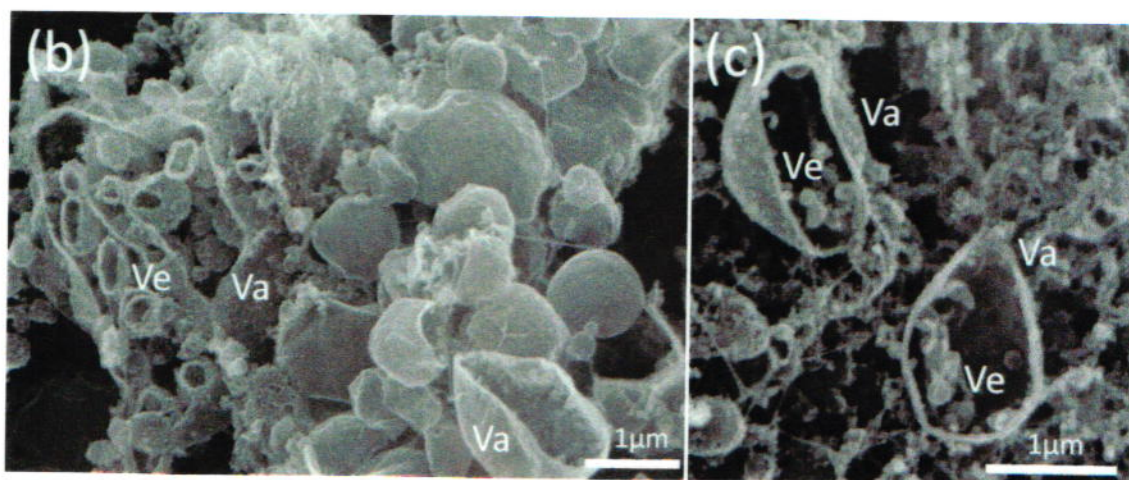
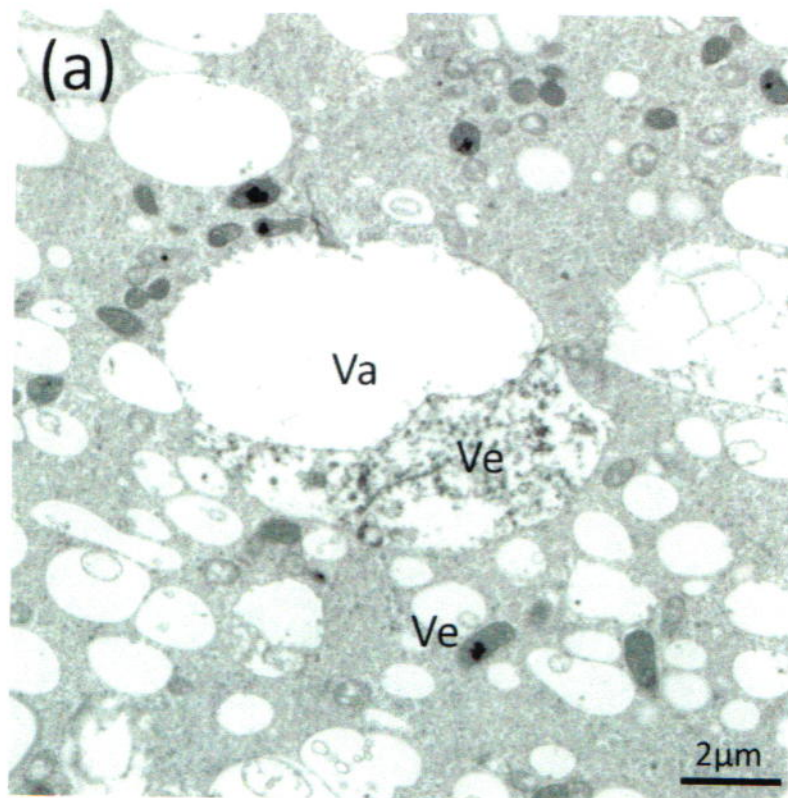


第 13 図. トマト根こぶ内の巨大細胞の走査電子顕微鏡写真

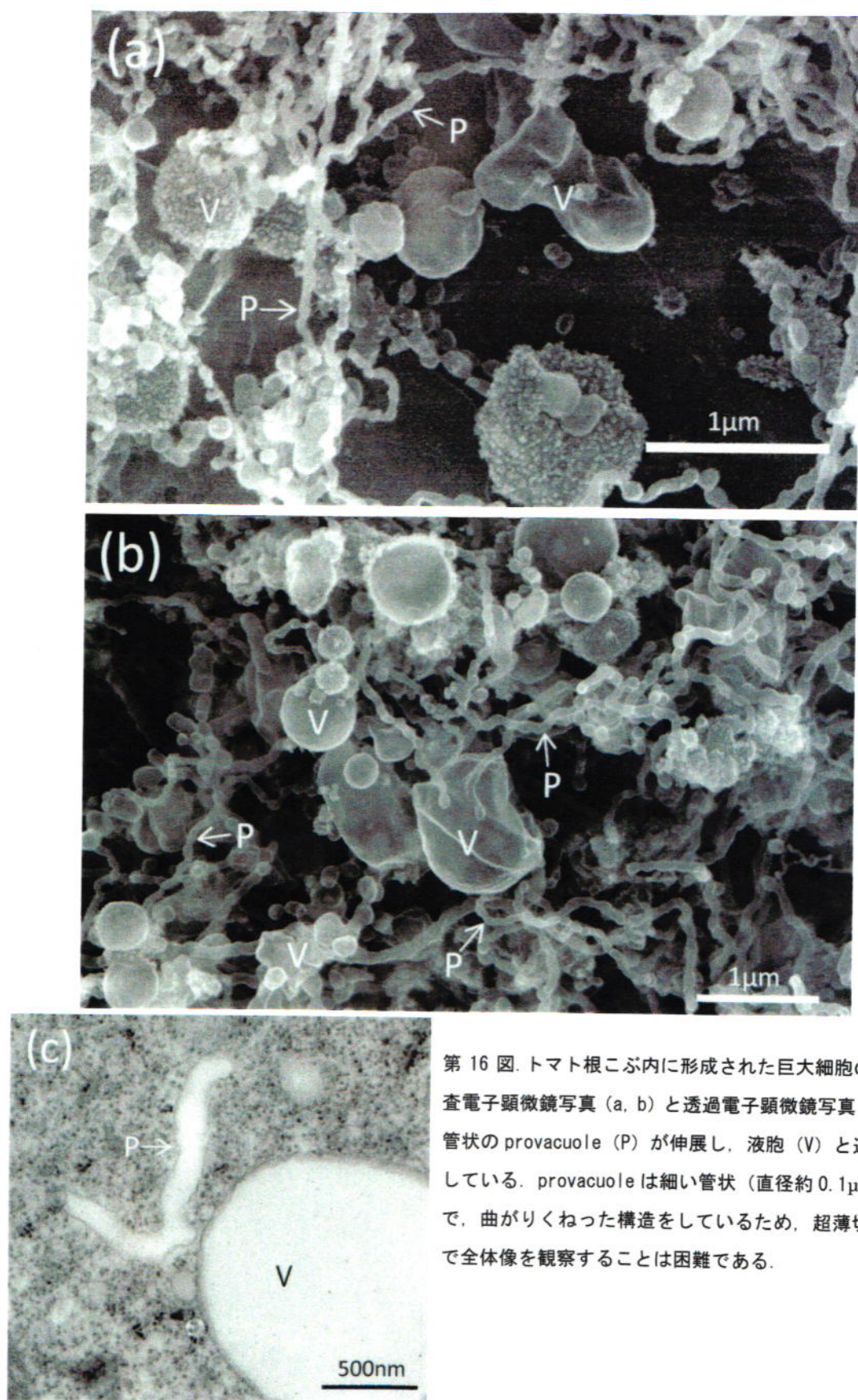
a: 巨大細胞内の細胞壁 (CW) から続いて小胞体 (ER), 液胞 (V) の明瞭な三次元像が見られる. b: 発達した小胞体の層の間や, その付近に多数の液胞が見られる. c: a を拡大したもの. 粗面小胞体 (rER) の付近にミトコンドリア (M), ゴルジ体 (G) が見られる.



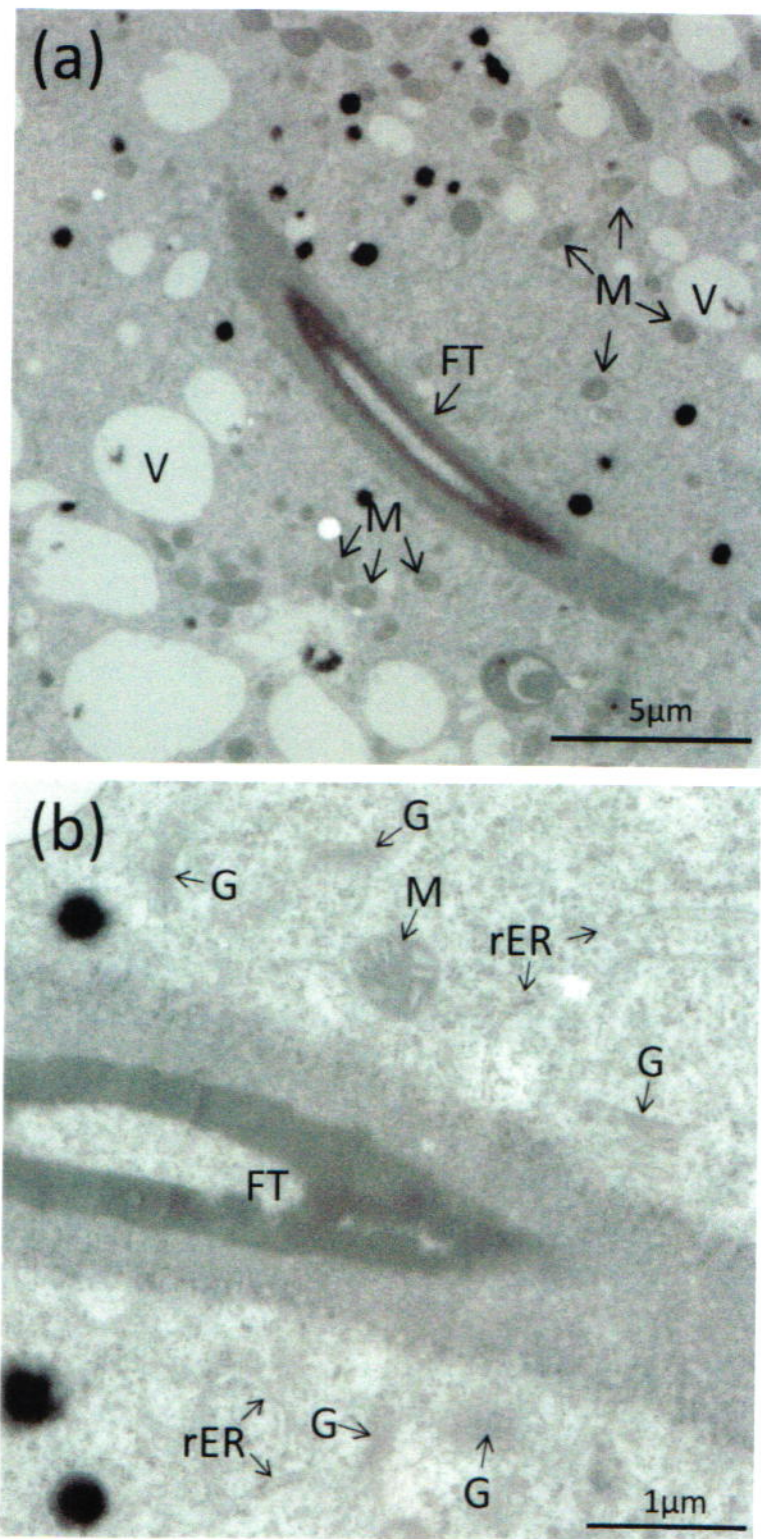
第 14 図. 巨大細胞内にある隣接した液胞の透過電子顕微鏡写真 (a) と走査電子顕微鏡写真 (b)
 V: 液胞, M: ミトコンドリア



第 15 図. 巨大細胞内にある小胞を含んだ液胞の透過電子顕微鏡写真 (a) と走査電子顕微鏡写真 (b, c)
 Va: 液胞, Ve: 小胞

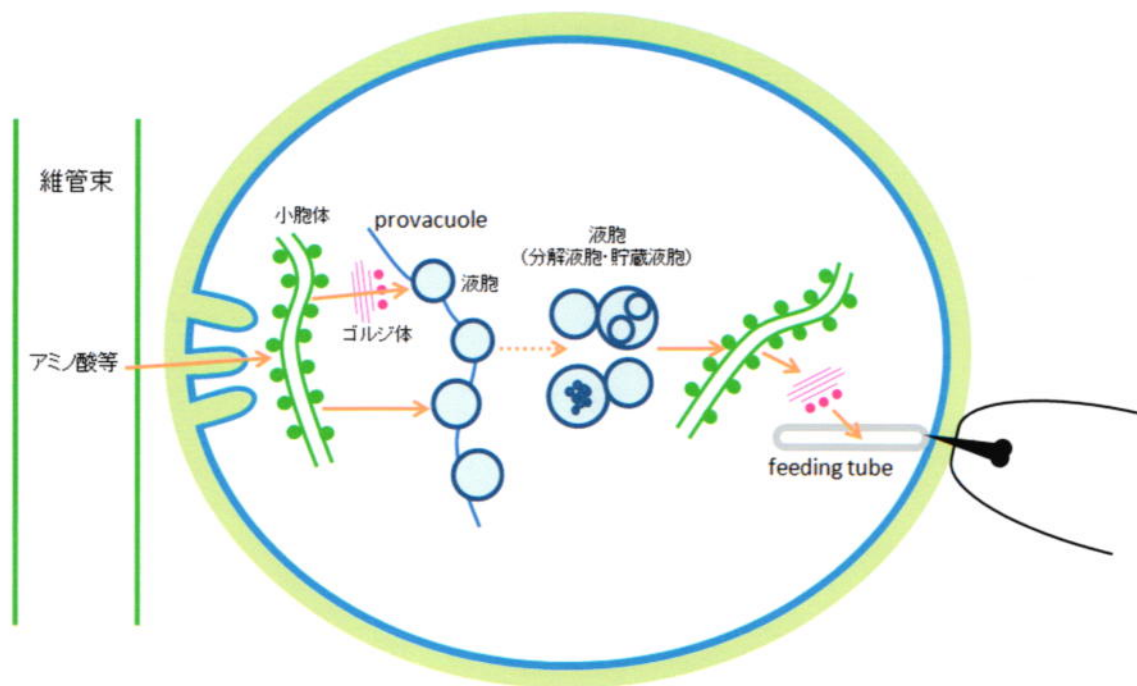


第 16 図. トマト根こぶ内に形成された巨大細胞の走査電子顕微鏡写真 (a, b) と透過電子顕微鏡写真 (c) 管状の provacuole (P) が伸展し、液胞 (V) と連結している. provacuole は細い管状 (直径約 $0.1\mu\text{m}$) で、曲がりくねった構造をしているため、超薄切片で全体像を観察することは困難である.



第 17 図. 巨大細胞内に形成された feeding tube (FT)

a: feeding tube 周囲に多数の液胞 (V) やミトコンドリア (M) が見られる. b: feeding tube の近傍に多数のゴルジ体 (G) や粗面小胞体 (rER) が集積している.



第 18 図. 巨大細胞の模式図

①巨大細胞の細胞膜は表面積が大きくなっており、アミノ酸などの養分の輸送が促進される。②タンパク質は小胞体で合成され、ゴルジ体を通して、または直接液胞へ輸送される。provacuole は液胞と連結し、相互に関連している。液胞（分解型液胞やタンパク質貯蔵型液胞）は融合し、貯蔵タンパクが溶解される。アミノ酸やペプチドが、feeding tube 付近にある小胞体やゴルジ体でネコブセンチュウに供給するための養分に作り変えられる。ネコブセンチュウは feeding tube を通して養分を吸収する。

Ⅲ 糖蜜を用いた土壌還元消毒によるネコブセンチュウ防除

1) 緒 言

石川県の施設園芸栽培では連作が多く、ネコブセンチュウによる被害が深刻な問題となっている。防除対策としては、くん蒸剤や接触性粒剤などの化学的防除のみに頼らざるを得ない現状にある。近年、消費者による農作物の安全安心や環境保全型農法への関心の高まりから、環境に配慮し、かつ効果の安定した防除技術の確立が求められている。

化学農薬に替わる土壌消毒法として開発された土壌還元消毒法（新村ら 1999）は、有機物を施用し土壌を還元化させて消毒効果を得るもので、ネコブセンチュウに対しても効果があると報告されている（高井ら 2003, 久保ら 2004）。さらに、当初用いられていたフスマや米ぬかなどの固形有機物の混和が困難な下層土へ有機物を浸透させる方法として、糖蜜溶液を用いた土壌消毒法が開発されている（新村 2003）。そこで、本県のキュウリの主要作型である抑制キュウリにおいて、糖蜜還元消毒のネコブセンチュウに対する効果を検討した。

2) 材料と方法

試験区の設置

石川県小松市のネコブセンチュウが発生している一般農家のビニルハウス（9×43 m）2棟で防除試験を実施した。供試ハウスでは2013年3月から6月下旬まで前作として未成熟ふじまめを栽培した。試験区の概要を第1表に示す。試験区として、糖蜜還元消毒のみを行った「糖蜜還元消毒単独区」、糖蜜還元消毒に加えてイミシアホス粒剤を施用した「糖蜜還元消毒＋イミシアホス粒剤区」をそれぞれ1/2棟ずつ設けた。これに隣接するハウス1棟は糖蜜還元消毒を行わず、イミシアホス粒剤とホスチアゼート粒剤を施用し、これを「イミシアホス粒剤＋ホスチアゼート粒剤区」とした。

「糖蜜還元消毒単独区」および「糖蜜還元消毒＋イミシアホス粒剤区」における糖蜜還

元消毒では、ビニルハウスの土壌上に灌水チューブを設置し、精製糖蜜をポリタンク内で 0.6%に希釈した溶液を、液肥混入器を用いて 150 L/m²を灌水チューブによりかん注処理し、ポリエチレンフィルムで被覆した。かん注処理を 2013 年 7 月 2 日に行い、その後 3 週間ポリエチレンフィルムで被覆した。被覆期間中である処理 2 週間後には湛水状態を保持するために追加灌水を行った。2013 年 7 月 26 日に「糖蜜還元消毒単独区」、「糖蜜還元消毒＋イミシアホス粒剤施用区」のポリエチレンフィルム被覆を除去した。同日に「糖蜜還元消毒＋イミシアホス粒剤区」ではイミシアホス粒剤 15 kg/10a を、「イミシアホス粒剤＋ホスチアゼート粒剤区」ではイミシアホス粒剤 15 kg/10a とホスチアゼート粒剤 15 kg/10a を全面土壌混和した。2013 年 8 月 9 日に、各試験区においてカボチャ（品種：ゆうゆう一輝黒タイプ）に接ぎ木したキュウリ（品種：恵みの風）の苗を定植した。なお、栽培管理については現地慣行に従った。

土壌の還元状態の確認

土壌還元消毒後の深さ別の還元状態を確認するために、ジピリジルにより二価鉄を検出する手法を用いた（梅村 2000）。土壌還元消毒後の圃場中央部から検土杖（直径 4 cm，長さ 30 cm）を用いて深さ 0 から 30 および 30 から 60 cm まで土壌採取を行った。採取した土壌にジピリジル溶液を滴下し、赤褐色に変化するかどうか確認した。

線虫密度調査および根こぶ指数

土壌還元消毒によるネコブセンチュウの防除効果を調べるために、土壌還元消毒前（2013 年 6 月 28 日）、土壌還元消毒後（2013 年 7 月 26 日）、抑制キュウリ栽培終了時（2014 年 1 月 8 日）のネコブセンチュウ 2 期幼虫数を調査した（第 1 表）。土壌還元消毒前および消毒後では、「糖蜜還元消毒単独区」および「糖蜜還元消毒＋イミシアホス粒剤施用区」合わせて 3 か所、「イミシアホス粒剤＋ホスチアゼート粒剤施用区」で 3 か所について、また抑

制キュウリ栽培終了時では各試験区 2 カ所について、検土杖を用いて深さ 60 cm まで土壌採取を行い、15 cm 毎の土壌層を一つに集めて混和した各土壌の生土 20g をサンプルとした。この土壌からベルマン法（20℃、48 時間静置、3 反復）を用いて線虫を分離し、光学顕微鏡下でネコブセンチュウ 2 期幼虫を計数した。また、抑制キュウリ栽培終了時にキュウリ根部の根こぶ着生程度を 5 段階（0：根系全体に根こぶを全く認めない、1：根こぶをわずかに認める、2：こぶの形成が中程度、3：こぶの数が多い、4：こぶの数がとくに多く、かつ大きい）で調査し、次式で根こぶ指数を求めた。

$$\text{根こぶ指数} = (4A + 3B + 2C + D) / 4N \times 100$$

[A：4 の株数， B：3 の株数， C：2 の株数， D：1 の株数； N：調査株数]

（日本植物防疫協会 2004. 野菜等殺虫剤圃場試験法.）

3) 結果と考察

糖蜜還元処理による還元状態の確認

土壌還元消毒後の深さ別の還元状態を調査したところ、0 から 60 cm のいずれの層もジピリジル反応を示した（第 19 図）。このことから、下層土まで還元状態が維持されたと考えられた。

糖蜜還元消毒が土壌中ネコブセンチュウ 2 期幼虫密度に及ぼす影響

糖蜜還元消毒前の 6 月 28 日には、各区すべての層にネコブセンチュウ 2 期幼虫が認められた（第 2 表）。糖蜜還元消毒後の 7 月 24 日には糖蜜還元消毒を行った区（「糖蜜還元消毒単独区」および「糖蜜還元消毒＋イミシアホス粒剤施用区」）では 0 から 60 cm のいずれの層にも 2 期幼虫が認められなかった。それに対し、糖蜜還元消毒を行わなかった「イミシアホス粒剤＋ホスチアゼート粒剤施用区」では、2 期幼虫密度が 15 から 30 cm 以外の土壌層で著しく減少していた（第 2 表）。この減少は、寄主植物を作付しないことで自然に減少

したものと推察される。液状有機物を用いた土壤還元消毒法は固形有機物よりも有機物が下層まで到達するために下層土の消毒効果が高いことが報告されており（新村 2003, 桑原ら 2011），本試験での糖蜜還元消毒についてもネコブセンチュウ 2 期幼虫の密度を減少させる効果があることが認められた。

糖蜜還元消毒が抑制キュウリ栽培時のネコブセンチュウ密度に及ぼす影響

抑制キュウリ栽培終了時のネコブセンチュウ 2 期幼虫の密度および根こぶ指数を、「糖蜜還元消毒単独区」、「糖蜜還元消毒＋イミシアホス粒剤施用区」および「イミシアホス粒剤＋ホスチアゼート粒剤施用区」の 3 区間で比較した（第 20 図）。2 齢幼虫密度については、「糖蜜還元消毒単独区」では土壤深度 0 から 15 cm および 15 から 30 cm でそれぞれ 221.3, 136.7 頭と多かったのに対して、「糖蜜還元消毒＋イミシアホス粒剤施用区」および「イミシアホス粒剤＋ホスチアゼート粒剤施用区」では土壤深度 0 から 15 cm で 23.3, 16.8 頭、土壤深度 15 から 30 cm では 63.3, 48.7 頭であった（第 20 図）。土壤深度 30 から 45 cm, 45 から 60 cm では、幼虫密度は 3 区間ともに極めて小さく、3 区間での差異は認められなかった。これらのことから、抑制キュウリ栽培終了時には糖蜜還元消毒単独では抑制キュウリ栽培終了時まで 2 期幼虫密度を抑制することはできなかったが、糖蜜還元消毒の後にイミシアホス粒剤を処理することによって、イミシアホス粒剤とホスチアゼート粒剤を施用した場合（慣行防除）とほぼ同等に 2 期幼虫密度を抑制した。

糖蜜還元消毒が抑制キュウリ栽培時の根こぶの発生に及ぼす影響

根こぶ着生程度別では、発生の顕著な 3 および 4 の合計は「糖蜜還元消毒単独区」および「イミシアホス粒剤＋ホスチアゼート粒剤施用区」でそれぞれ 29.1%, 20.8%であるのに対し、「糖蜜還元消毒＋イミシアホス粒剤施用区」では 4.2%と著しく低く、根こぶ指数も「糖蜜還元消毒単独区」および「イミシアホス粒剤＋ホスチアゼート粒剤施用区」でそれぞれ

32.3, 46.9であるのに対し、「糖蜜還元消毒+イミシアホス粒剤施用区」では8.3と低かった(第3表)。糖蜜還元消毒を行って抑制キュウリ栽培前の2期幼虫密度が抑制された「糖蜜還元消毒+イミシアホス粒剤施用区」では、糖蜜還元消毒を行わずに2期幼虫が残存していた「イミシアホス粒剤+ホスチアゼート粒剤施用区」と比較して、粒剤による被害抑制効果が顕著に現れたものと推察される。

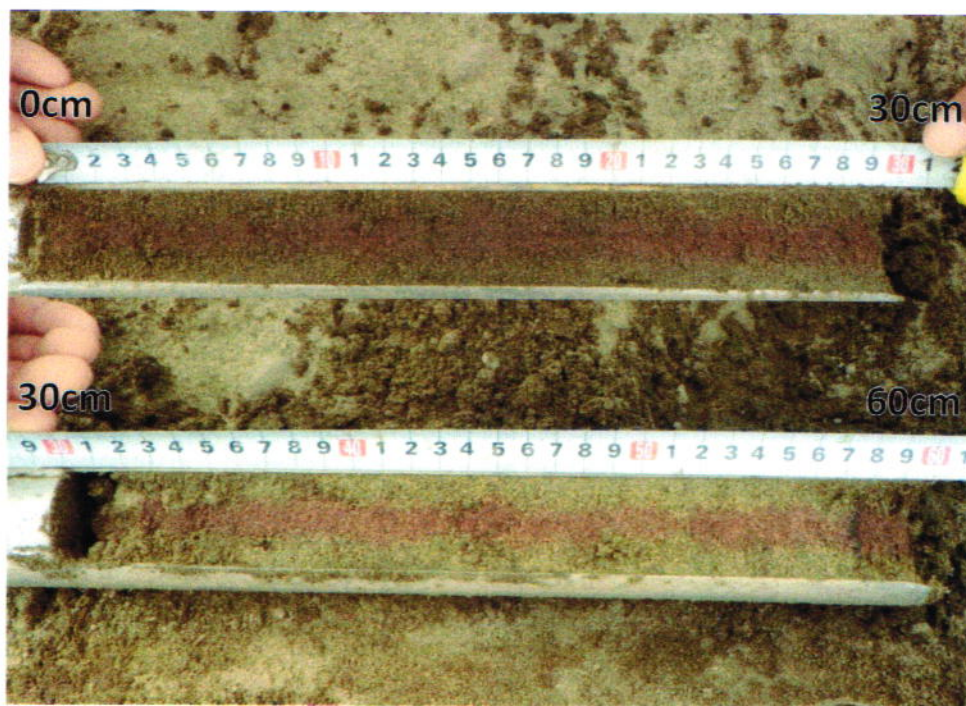
「イミシアホス粒剤+ホスチアゼート粒剤区」はキュウリ栽培後の土壤中2期幼虫密度が「糖蜜還元消毒+イミシアホス粒剤施用区」と同程度であったものの、根こぶ指数は高かった。線虫の密度推定のための標本調査法としては、分布の集中度や標本抽出精度を考慮した上で、採取した土壌それぞれを線虫分離に供して個体数を計数するのが理想的とされるが、膨大な労力が必要となることから、複数のコアがまとめられた標本土壌の一部を分離土壌として取り出して線虫分離、計数をする場合が多い(伊藤 2014)。なお、複数のコアをまとめて1標本とした場合でも、標本土壌全量から線虫を分離した場合は、標本の総個体数が誤差なく計数されるが、分布の集中度の推定や、標本抽出精度を検証することはできない。栽培終了時の土壌サンプリングは、3地点から採集したコアをまとめた標本土壌の一部を分離土壌として取り出し、線虫分離と計数を行った。そのため、分布の集中度に偏りがあったか、標本抽出精度が十分でなかった可能性があり、今後の課題として残されている。

以上のことから、糖蜜還元消毒単独では、抑制キュウリにおける根こぶの着生を十分に防ぐことはできないが、糖蜜還元消毒によって定植前のネコブセンチュウ密度を低減させることにより、イミシアホス粒剤の効果が十分に得られたと考えられた。

糖蜜還元消毒を毎作実施することは容易ではないことから、今後は還元土壌消毒後および粒剤の併用が後作物の生育に及ぼす影響を明らかにし、効果的な防除体系を構築する必要がある。

第1表 試験区の概要

試験区 実施年月日	糖蜜還元消毒 単独区	糖蜜還元消毒＋ イミシアホス粒剤 施用区	イミシアホス粒剤＋ ホスチアゼート粒剤 施用区
2013年6月28日	土壌のサンプリング・2期幼虫密度調査		
7月2日	糖蜜処理		—
7月3日	ビニールの被覆		—
7月26日	被覆除去		—
	土壌のサンプリング・2期幼虫密度調査		
	—	イミシアホス粒剤 15kg/10a 施用	イミシアホス粒剤および ホスチアゼート粒剤 各 15kg/10a 施用
8月9日	キュウリ定植		
2014年1月8日	キュウリ栽培終了		
	土壌のサンプリング・2期幼虫密度調査		
	根こぶ発生程度調査		



第 19 図. 土壤還元消毒後の土壌深度毎の還元状態

糖蜜還元消毒を行ったハウスの深さ 0 から 60 cm の土壌にジピリジル溶液を添加. いずれの層も赤褐色を呈したことから, 下層土まで還元状態が継続していたと考えてよい.

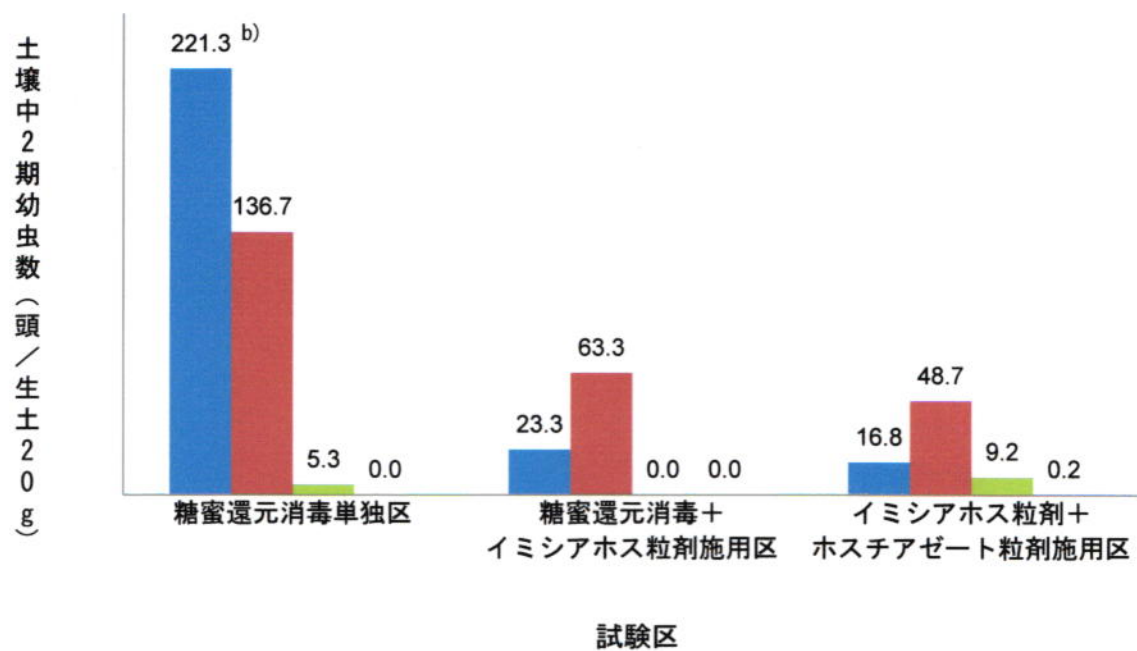
第2表 糖蜜還元消毒前後のネコブセンチュウ2期幼虫密度^{a)}

調査時期 ^{b)}	試験区	測定した土壌の深度 (cm)				
		0-15	15-30	30-45	45-60	合計
2013 年 6 月 28 日	[糖蜜還元消毒単独区]および					
	[糖蜜還元消毒+イミシアホス 粒剤施用区] ^{c)}	5.0	46.0	37.0	2.7	90.7
	[イミシアホス粒剤+ホスチア ゼート粒剤施用区]	10.3	49.3	60.7	25.3	145.7
2013 年 7 月 26 日	[糖蜜還元消毒単独区]および					
	[糖蜜還元消毒+イミシアホス 粒剤施用区] ^{c)}	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	[イミシアホス粒剤+ホスチア ゼート粒剤施用区]	1.3	41.0	0.0	0.0	42.3

a) 3 反復の平均値

b) 2013 年 6 月 28 日は糖蜜還元消毒前, 2013 年 7 月 26 日は糖蜜還元消毒後

c) 糖蜜還元消毒単独区および糖蜜還元消毒+イミシアホス粒剤施用区を併せてサンプリング



第 20 図. 抑制キュウリ栽培終了時における深さ別ネコブセンチュウ 2 期幼虫数^{a)}

a) 2014 年 1 月 8 日に調査

b) 3 反復の平均値

第3表 抑制キュウリ栽培終了時における根こぶ着生程度と根こぶ指数^{a)}

試験区	根こぶ着生程度					根こぶ 指数
	0	1	2	3	4	
糖蜜還元消毒単独区	50.0 ^{b)}	8.3	12.5	20.8	8.3	32.3
糖蜜還元消毒＋イミシアホ ス粒剤施用区	75.0	20.8	0.0	4.2	0.0	8.3
イミシアホス粒剤＋ホスチ アゼート粒剤施用区	12.5	18.8	47.9	10.4	10.4	46.9

a) 2014年1月8日に、「糖蜜還元消毒単独区」と「糖蜜還元消毒＋イミシアホス粒剤施用区」は24株を、「イミシアホス粒剤＋ホスチアゼート粒剤施用区」は48株を調査した。

b) 根こぶ程度別割合(%)

IV 総合考察

本研究では、ネコブセンチュウの寄生関係を構築・維持するメカニズムに関する基礎的研究を行うことで、長期的な観点から防除技術開発に資するとともに、環境に配慮したネコブセンチュウ防除について、より実用に近い観点から検討を行った。

第Ⅱ章の1では、寄主植物の根内におけるネコブセンチュウ雌成虫の吸餌行動解析を行うため、マイクロスライサーで根こぶ切片を用いた観察法を考案した。この方法は、マイクロスライサーを用いて根こぶ切片を作製し、雌成虫全体を含んだ切片を選抜することにより、固定せずに光学顕微鏡で生きた雌成虫の行動を観察することが可能となるため、雌成虫と巨大細胞の相互関係を、*in vivo*で経時的な変化を解析するのに有用である。これまでに2期幼虫を用いた行動解析では、シロイヌナズナの実生苗に幼虫を接種し、幼虫が含まれる細い根をそのままマウントして光学顕微鏡で観察することが可能であったが、根こぶが発達すると内部が見えなくなるため、成長した線虫を生きたまま観察することができなかった (Wyss *et al.* 1992)。本研究において考案された観察法を用いることによって、雌成虫が根こぶ内で活発に頭部を動かしていることや、吸餌行動の規則性、頭部の先端だけを動かして口針をあらゆる方向へ突き出すことが明らかにされた (Miyashita *et al.* 2014)。今後この系を用いることで、雌成虫が巨大細胞を維持するメカニズムに解明に貢献できるものと思われる。

第Ⅱ章の2では、ネコブセンチュウ雌成虫の吸餌行動が2期幼虫のそれと異なっていることについて、形態的な観点から明らかにするため、走査電子顕微鏡解析を行った。その結果、雌成虫の頭部の表皮はひだが重なり合っており、伸縮できるような構造となっているのに対し、2期幼虫ではそのようなひだが見られなかったことから、雌成虫は巨大細胞に囲まれて身動きが取れない状態でも、周囲の巨大細胞すべてにアプローチできるように適応した頭部形態となっていることが明らかとなった。

第Ⅱ章の3では、ネコブセンチュウが誘導した巨大細胞について、オスミウム浸軟法を

応用した走査電子顕微鏡解析を行い、巨大細胞内の構造を三次元的に明らかにした。この方法で観察することによって、直径約 10nm の管状の器官である provacuole の存在を巨大細胞で初めて明らかにした。巨大細胞において provacuole を立体的に示したことは、植物細胞の細胞内小器官の発生学的にも非常に重要な知見であり、本研究の成果の一つと言える。しかし provacuole について解明された点は現在までのところ非常に少なく (Marty 1978, Marty 1980, Herman *et al.* 1994), 液胞膜のマーカーである V-ATPase が provacuole にも局在する (Herman *et al.* 1994) 報告があるものの、provacuole 特異的なマーカーとなる分子は同定されていない。provacuole の成り立ちや機能解明については今後の研究課題として残されている。

第Ⅲ章では、環境に配慮したネコブセンチュウ防除という喫緊の課題解決に向けて、具体的な防除体系を提示するため、農家圃場で、糖蜜を用いた土壤還元消毒によるネコブセンチュウ防除試験を行った。その結果、糖蜜還元消毒処理を行うことで、処理しない区と比べて 2 期幼虫の密度を顕著に抑制した。抑制キュウリ栽培後において、糖蜜還元処理単独では、根こぶの着生を十分に防ぐことはできないが、糖蜜還元消毒によって定植前のネコブセンチュウ密度を低減させることにより、接触性殺線虫剤処理で高い防除効果が得られることが明らかとなった。有機物を用いた土壤還元消毒のメカニズムとしては、有機物の分解に伴う土壤の還元化、有機酸の生成 (Katase *et al.* 2009, Momma *et al.* 2010)、金属イオンの遊離 (Momma *et al.* 2011) が関与していると考えられている。今後はこれらの消毒作用のメカニズムが詳細に明らかになることで、効果の最適化や効率的な実施方法が確立され、普及が促進されることが期待される。

世界的な農薬規制として臭化メチル剤の使用が全廃され、アメリカではその他の土壤くん蒸剤の使用についてもバッファゾーンを設ける法律が定められているなど、土壤くん蒸剤の使用について今後も規制が加わる可能性もないとは言い切れないことから、代替防除法の開発は重要性を増している。さらに、石川県においては多種多様な農作物が栽培さ

れ、マイナー作物も多く含まれていることから、使用できる農薬が限られている。そのため、化学農薬代替防除技術開発はとくに重要であり、今後とも推進していく必要があると考える。

V 謝 辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました、石川県立大学生物資源環境学部 古賀博則教授に心より感謝の意と御礼の言葉を申し上げます。

また、本論文をご精読いただきました、石川県立大学生物資源環境学部 鈴木正一教授、村上賢治教授に深謝致します。

本研究の透過電子顕微鏡解析を行うにあたり、石川県立大学 栗原孝行博士に心から感謝申し上げます。また、糖蜜土壌還元消毒の現地試験を行うにあたり、ご協力いただきました、石川県農林総合研究センター農業試験場 藪 哲男研究主幹、松田絵里子専門員、高野源太郎技師、石川県南加賀農林総合事務所 池端郁美専門員に深く感謝いたします。

本論文作成の機会を与えていただきました、石川県農林総合研究センター農業試験場島田義明所長に感謝いたします。

最後に、研究を進めていく上で、ご助言やご協力をいただきました石川県立大学生産科学科植物保護学研究室の皆様、植物生産基礎系ゼミの皆様、石川県農林総合研究センター農業試験場の皆様にお礼申し上げます。

VI 参考文献

- Amelunxen, F. and Heinze, U. 1984. On the development of the vacuole in the testa cells of *Linum* seeds. *European Journal of Cell Biology* 35:343-354.
- Bartlem, D. G., Jones, M. G. K. and Hammes, U. Z. 2014. Vascularization and nutrient delivery at root-knot nematode feeding sites in host roots. *Journal of Experimental Botany* 65:1789-1798.
- Bechtel, D. B. and Barnett, B. D. 1986. A freeze fracture study on the storage protein accumulation in unfixed wheat starchy endosperm. *Cereal Chemistry* 63:232-240.
- Berg, R. H., Fester, T. and Taylor, C. G. 2008. Development of the root-knot nematode feeding cell. Pp.115-152 in R. H. Berg and C. G. Taylor, eds. *Plant Cell Monographs*, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Bird, A. F. 1961. The ultrastructure and histochemistry of a nematode-induced giant cell. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 11:701-715.
- Bird, A. F. 1962. The inducement of giant cells by *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* 8:1-10.
- Bird, A. F. 1967. Changes associated with parasitism in nematodes. I. Morphology and physiology of preparasitic larvae of *Meloidogyne javanica*. *Journal of Parasitology* 53:768-776.

- Bird, A. F. 1968. Changes associated with parasitism in nematodes. III. Ultrastructure of the egg shell, larval cuticle, and contents of the subventral esophageal glands in *Meloidogyne javanica*, with some observations on hatching. *Journal of Parasitology* 54:475-489.
- Bird, A. F. 1971. Specialized adaptations of nematodes to parasitism. In *Plant parasitic nematodes* Vol. II. Zuckerman, B. M., Mai, W. F. and Rohde, R. A. eds. Academic Press, New York, pp. 35-49.
- Eisenback, J. D. and Hirschmann, H. 1979. Morphological comparison of second-stage juveniles of six populations of *Meloidogyne hapla* by SEM. *Journal of Nematology* 11:5-16.
- Elsa, J. R. 1951. The histological anatomy of the nematode *Meloidogyne hapla* (Heteroderidae). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 18:53-63.
- De Guiran, G. and Ritter, M. 1979. Life cycle of *Meloidogyne* species and factors influencing their development. In *Root-knot nematodes (Meloidogyne species) Systematics, Biology and Control*. Lamberti, F. and Taylor, C. E. eds. Academic Press, London, pp.172-191.
- De Lorenzo, F., Degl'Innocenti, S., Ruocco, A., Silengo, L. and Cortese, R. 1977.

- Mutagenicity of pesticides containing 1,3-Dichloropropene. *Cancer Research* 37:1915-1917.
- Golinowski, W., Grundler, F. M. W. and Sobczak, M. 1996. Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* during female development of the plant parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Protoplasma* 194:103-116.
- Gommers, F. J. and Dropkin, V. H. 1977. Quantitative histochemistry of nematode-induced transfer cell. *Phytopathology* 67:869-873.
- Gunning, B. E. S., Pate, J. S. and Briarty, L. G. 1968. Specialized "Transfer Cells" in minor veins of leaves and their possible significance in phloem translocation. *Journal of Cell Biology* 37:C7-12.
- Hara-Nishimura, I., Hayashi, M., Nishimura, M. and Akazawa, T. 1987. Biogenesis of protein bodies by budding from vacuoles in developing pumpkin cotyledons. *Protoplasma* 136:49-55.
- Herman, E. M., Li, X., Su, R. T., Larsen, P., Hsu, H.-T. and Sze, H. 1994. Vacuolar-type H^+ -ATPases are associated with the endoplasmic reticulum and provacuoles of root tip cells. *Plant Physiology* 106:1313-1324.
- Hilling, B. and Amelunxen, F. 1985. On the development of the vacuole. II. Further evidence for endoplasmic reticulum. *European Journal of Cell Biology* 38:195-200.

Hinz, G., Hillmer, S., Baumer, M. and Hohl, L. 1999. Vacuolar storage proteins and the putative vacuolar sorting receptor BP-80 exit the golgi apparatus of developing pea cotyledons in different transport vesicles. *The Plant Cell* 11:1509-1524.

平野和弥 1983. トマトにおけるネコブセンチュウと萎ちょう病菌との複合病因による疾病論的考察. 千葉大学園芸学部報告 32:129-206.

Hussey, R. S. 1989. Disease-inducing secretions of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 27:123-141.

Hussey, R. S. and Mims, C. W. 1991. Ultrastructure of feeding tubes formed in giant-cells induced in plants by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Protoplasma* 162:99-107.

伊藤賢治 2014. 2.線虫の分布と密度推定法. 水久保隆之・二井一禎編, 線虫学実験, 京都大学学術出版会, 京都. 184-192.

弥富喜三 1972. 殺線虫剤の残留について. 日本線虫研究会誌 2:1-5.

Jones, M. G. K., Novacky, A. and Dropkin, V. H. 1975. Transmembrane potentials of parenchyma cells and nematode-induced transfer cells. *Protoplasma* 85:15-37.

Jones, M. G. K. and Dropkin, V. H. 1976. Scanning electron microscopy of nematode-induced giant transfer cells. *Cytobios* 15:149-161.

Jones, M. G. K. and Northcote, D. H. 1972. Multinucleate transfer cells induced in

- coleus roots by the root-knot nematode, *Meloidogyne arenaria*. Protoplasma 75:381-395.
- Katase, M., Kubo, C., Ushio, S., Ootsuka, E., Takeuchi, T. and Mizukubo, T. 2009. Nematicidal activity of volatile fatty acids generated from wheat bran in reductive soil disinfestation. Nematological Research 39:53-62.
- 北 宜裕 2006. 物理的消毒法の効果と普及. 野菜茶業研究集報 3:7-15.
- Koga, H., Thukiboshi, T., and Uematsu, T. 1991. Application of an osmium-maceration technique to observe plant-microbe interfaces of Italian ryegrass and crown rust fungi by scanning electron microscopy. Canadian Journal of Botany 70: 438-442.
- 久保周子・片瀬雅彦・清水喜一・加藤浩生・竹内妙子 2004. トマト土壌病害虫に対する土壌還元消毒の効果. 千葉農総研報 3:95-104.
- 桑原克也・高橋まさみ・大堀智也・三木静恵 2011. 施設キュウリにおける低濃度エタノールを用いた土壌還元消毒による下層土のネコブセンチュウの防除効果. 関東東山病虫研報 58:85-89.
- Lamberti, F. 1979. Economic importance of *Meloidogyne* spp. in subtropical and mediterranean climates. In *Root-knot nematodes (Meloidogyne species) Systematics, Biology and Control*. Lamberti, F. and Taylor, C. E. eds. Academic Press, London , pp.341-357.

- Levanony, H., Rubin, R., Altschuler, Y. and Galili, G. 1992. Evidence for a novel route of wheat storage proteins to vacuoles. *The Journal of Cell Biology* 119:1117-1128.
- Ligrone, R., Vaughn, K. C. and Rascio, N. 2011. A cytochemical and immunocytochemical analysis of the wall labyrinth apparatus in leaf transfer cells in *Elodea canadensis*. *Annals of Botany* 107:717-722.
- Linford, M. B. 1937. The feeding of root-knot nematode in root tissue and nutrient solution. *Phytopathology* 27:824-835.
- Marty, F. 1978. Cytochemical studies on GERL, provacuoles, and vacuoles in root meristematic cells of *Euphorbia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75:852-856.
- Marty, F. 1980. High voltage electron microscopy of membrane interactions in wheat. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 28:1129-1132.
- Marty, F. 1999. Plant vacuoles. *The Plant Cell* 11:587-599.
- Miyashita, N., Yabu, T., Kurihara, T. and Koga, H. 2014. The feeding behavior of adult root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*) in rose balsam and tomato. *Journal of Nematology* 46:296-301.
- Momma, N., Momma, M. and Kobara, Y. 2010. Biological soil disinfestation using ethanol: effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and soil microorganisms.

Journal of General Plant Pathology 76:336-344.

Momma, N., Kobara, Y. and Momma, M. 2011. Fe^{2+} and Mn^{2+} , potential agents to induce suppression of *Fusarium oxysporum* for biological soil disinfestation. Journal of General Plant Pathology 77: 331-335.

奈良部 孝 2004. 各論 1 ネコブセンチュウ—*Meloidogyne* 属—. 線虫の見分け方 植物防疫 特別増刊号 8:11-16.

日本植物防疫協会 2001-2013. 農薬要覧.

日本植物防疫協会 2004. 野菜等殺虫剤圃場試験法.

新村昭憲・坂本宣崇・阿部秀夫 1999. 還元土壤消毒によるネギ根腐萎ちょう病の防除. 日本植物病理学会報 65:352-353.

新村昭憲 2003. 糖蜜を利用した土壤還元消毒の下層土への防除効果. 日本植物病理学会報 69:78.

Offler, C. E., McCurdy, D. W., Patrick, J. W. and Talbot, M. J. 2002. Transfer cells: cells specialized for a special purpose. Annual Review of Plant Biology 54: 341-454.

Paris, N., Stanley, C. M., Jones, R. L. and Rogers, J. C. 1996. Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. Cell 85:563-572.

Paulson, R. E. and Webster, J. M. 1969. Giant cell formation in tomato roots caused by *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla* (Nematoda) infection. A light and

electron microscope study. Canadian Journal of Botany 48:271-276.

Razak, A. R. and Evans, A. A. F. 1976. An intracellular tube associated with feeding by *Rotylenchulus reniformis* on cowpea root. Nematologica 22:182-189.

Rubin, R., Levanony, H. and Galili, G. 1992. Evidence for the presence of two different types of protein bodies in wheat endosperm. Plant Physiology 99:718-724.

Seguí-Simarro, J. M. and Staehelin, L. A. 2006. Cell cycle-dependent changes in Golgi stacks, vacuoles, clathrin-coated vesicles and multivesicular bodies in meristematic cells of *Arabidopsis thaliana*: A quantitative and spatial analysis. Planta 223:223-236.

清水恵美・増田大祐・西村康平・橋本 尚 2006. 砂丘地における土壌消毒後のガス難透過性フィルムの利用がメロンのネコブセンチュウの発生抑制に及ぼす影響. 石川県農業総合研究センター研究報告 27:25-31.

Sijmons, P. C., Grundler, F. M. W., von Mende, N., Burrows, P. R. and Wyss, U. 1991. *Arabidopsis thaliana* as a new model host for plant-parasitic nematodes. The Plant Journal 1:245-254.

高井 啓・西 和文・田口義広・渡辺秀樹・勝山直樹・窪田昌春 2003. キュウリ栽培施設における熱水土壌消毒および土壌還元消毒の効果と土壌 pH、EC、およびキュウリの生育に及ぼす影響. 関西病害虫研究会報 45:99-100.

- Tanaka, K. and Mitsushima, A. 1984. A preparation method for observing intracellular structures by scanning electron microscopy. *Journal of Microscopy* 133:213-222.
- Tanaka, K. and Naguro, T. 1981. High resolution scanning electron microscopy of cell organelles by a new specimen preparation method. *Biomedical Research*. 2:63-70.
- 梅村 弘 2000. 試薬利用による理化学性の調査. 農業技術体系 土壌施肥編 4. 農山漁村文化協会, 東京, pp. 208.
- Vaughn, K. C., Talbot, M. J., Offler, C. E. and McCurdy, D. W. 2007. Cellulose synthesis is required for deposition of reticulate wall ingrowths in transfer cells. *Plant Cell Physiology* 48:147-158.
- Viotti, C., Kruger, F., Krebs, M., Neubert, C., Fink, F., Lupanga, U., Scheuring, D., Boute, Y., Fescatada-Rosa, M., Wolfenstetter, S., Sauer, N., Hillmer, S., Grebe, M. and Schumacher, K. 2013. The endoplasmic reticulum is the main membrane source for biogenesis of the lytic vacuole in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25:3434-3449.
- Viotti, C. 2014. ER and vacuoles: never been closer. *Frontiers in Plant Science* 5:1-7.
- 和田さと子・藤野智絵・豊田剛己・岡本 保 2008. 1,3-ジクロロプロペン、クロルピクリン及び太陽熱による土壌消毒がセルロース分解能及び硝化菌に及ぼす影響. *土と微生物* 21:21-31.

- Wyss, U. 1984. Ultrastructure of feeding sites of cyst nematode *Heterodera schachtii* Schmidt in roots of susceptible and resistant *Raphanus sativus* L. var. *oleiformis* Pers. cultivars. *Physiological Plant Pathology* 25:21-37.
- Wyss, U. and Grundler, F. M. W. 1992. Feeding behavior of sedentary plant parasitic nematodes. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 98. Supplement 2:165-173.
- Wyss, U., Grundler, F. M. W. and Munch, A. 1992. The parasitic behavior of second-stage of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica* 38:98-111.
- Wyss, U. and Zunke, U. 1986. Observations on the behavior of second stage juveniles of *Heterodera schachtii* inside host roots. *Revue de Nématologie* 9:153-165.
- 藪 哲男・八尾充睦・藤田和久 1993. ネコブセンチュウの耕種的防除法. 石川県農業総合試験場研究報告 17:63-75.
- 吉田睦浩 1992. サツマイモネコブセンチュウ. 中園和年編. 133-137. 茨城: 線虫研究の歩み—日本線虫研究会創立 20 周年記念誌臨時編集委員会, 日本線虫学会.
- Zheng, H. and Staehelin, L. A. 2011. Protein storage vacuoles are transformed into lytic vacuoles in root meristematic cells of germinating seedlings by multiple, cell type-specific mechanisms. *Plant Physiology* 155:2023-2035.
- Zouhar, J. and Rojo, E. 2009. Plant vacuoles: where did they come from and where are they heading? *Current Opinion in Plant Biology* 12:677-684.

VII Summary

Meloidogyne incognita is a parasitic root-knot nematode that causes considerable yield loss in a wide range of plants. In this study we documented the movement of adult female nematodes for over two hours in micro-slices of infected tomato (*Solanum lycopersicum*) and rose balsam (*Impatiens balsamina*) plants using light and video microscopy. Stylet thrusting was followed by short pumping actions of the esophagus, dorsal esophageal gland ampulla, and metacorpul bulb. Regular thrusting was normally accompanied by head turning and always preceded continuous stylet thrusting aimed at a single point (for 20 to 90 seconds). Females often held the stylet in a protruded position, while pulsating the metacorpul bulb, for about 30 seconds. Subsequently, the stylet was paused in a retracted position for 5 to 40 seconds. This sequence of behavior took 290 to 380 seconds to complete. The procedure developed here-in provides a useful cytological technique to investigate the interaction between root-knot nematodes and the giant cells formed by infected plants. Scanning electron microscopy revealed that the head of the adult nematode was located in the narrow intercellular spaces among several giant cells. The anterior part of the head of the adult was folded like a concertina, whereas that of the second-stage juvenile was not. The labial disc and medial lips of second-stage juveniles seemed expanded and sturdy, whereas those of the adult were star-shaped, appeared to be contracted and softer. These morphological differences in the heads of adult and second-stage juveniles are discussed with respect to their movement.

The fine structure of giant cell induced by root-knot nematode has been repeatedly described by transmission electron microscopy, whereas studies by high-resolution scanning electron microscopy are rare and limited in surface structure morphology. This

report describes the result of an HRSEM study on giant cell, induced by *Meloidogyne incognita*, which was carried out by an osmium maceration protocol. Thus, we visualized various intracellular structures including small mitochondria, endoplasmic reticulum, gorge body, the vacuolar system and provacuole, which is the origin of vacuoles. Some small vacuoles were connecting each vacuole and/or provacuole.

We assessed the effect of biological soil disinfestation (BSD) using molasses to control the root-knot nematode in cucumber under agricultural conditions. Three soil treatments were applied: molasses BSD alone (m-BSD), m-BSD combined with contact nematicide (m-BSD + CN) and contact nematicide alone (CN). We evaluated the density of second stage juveniles (J2) and root galling. Just after treatment of m-BSD, J2 were not detected at m-BSD and m-BSD + CN, but were detected at CN. After cultivated, J2 population and root gall index were low at m-BSD + CN although J2 population were high at m-BSD and root gall index were high at CN. These results show that m-BSD treatment reduced the density of the J2, so that contact nematicide can control the root galling.