

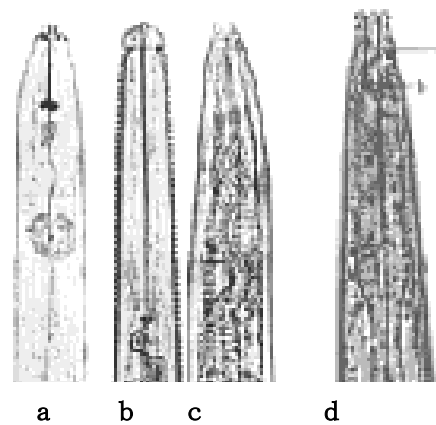
第4節 線虫の胚発生の観察

4.1 線虫類とは

線虫類は一般にはなじみの少ない動物群であるが、かつては、カイチュウやギョウチュウといった寄生性の線虫類が身近なものとして知られていた。しかし、自然界には現在もなお、きわめて多数の線虫類が棲息しており、その数は土壤生態系でもっとも多数を占め、種数でも昆虫類を上回ると言う見方もある。最近では遺伝学のモデル生物として脚光を浴びている *Caenorhabditis elegans* も土壤線虫類の一種であるが、このような土壤線虫類の中には植物の根や地上部に寄生し、大きな被害を及ぼすものがある。その被害量は害虫と呼ばれる昆虫類による被害量に匹敵するが、その重要性については今日もなお十分に理解されているとはいえない。

4.2 植物寄生性線虫類の特徴

線虫類にはきわめて多くの種が含まれるが、概して形態的な特徴に乏しいため、種の同定には難しさがともなう。しかし、それらの口器（図1）は、食性を反映して特徴があるので、食性グループを類別するのは比較的容易である。一般に植物寄生性の線虫（図1ではaとb）はその頭部に口針と呼ばれる注射針様の針を持っており、この針で植物細胞を穿孔し、その内容を吸収する。



4.3 植物寄生性線虫の胚発生速度を調べる

【目的】線虫類のような無脊椎動物の多くはその生活史の多くが環境条件によって制御されている。ここでは、温度条件が線虫の発育速度にどのように影響するのか明らかにするため、卵の孵化速度にあたる温度の影響をしらべる。

【器具】透過光源装置付き実体顕微鏡、光学顕微鏡、シラキユース時計皿、カウンター、洗浄びん、恒温器、ホールスライド

【線虫卵の準備】50 ml 三角フラスコに用意した PDA 培地（ポテトデキストロース培地）上に灰色カビ病菌 (*Botrytis cinerea*) を培養し、その菌叢上に植物寄生性線虫の一種、マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*) を植え継ぎ、3～4日後のカルチャーを実験に用いる。こうして用意した線虫培養フラスコ内に水道水を 10 cc ほど、洗浄ビンから勢いよく注入する。注入した水は、フラスコ内でよく攪拌し、菌叢上に産み付けられた線虫卵を懸濁する。

次に、線虫懸濁液をシラキユース時計皿に静かに注ぐ。この段階で、一度実体顕微鏡下で時計皿に入れた懸濁液を観察する。そこには、灰色カビ病菌の菌糸や、線虫の各生育段階の線虫の幼虫、成虫に混じって、小さな俵型の線虫卵が浮遊している。5分間静置した後、上澄みを静かに捨てる。こうすると、ガラス器の器壁に付着性のある線虫卵だけが時計皿のそこに付着し、それ以外の線虫幼虫、成虫、菌糸断片などは除去できる。さらに、数回、水を加え、幼虫、成虫、菌糸断片を完全に除去する。

【卵数の調整】 線虫卵だけが付着した時計皿に、10 ml の水を加え、実体顕微鏡下で付着した線虫卵を計数する。最終的な付着卵数が 200～300 程度になるように次のような操作を加える。まず、その数が、200 より、著しく少ないときは、他の線虫培養フラスコから、さらに線虫懸濁液を用意し、この時計皿の上に、追加する。上記と同様の操作で、線虫の幼虫、成虫、菌糸断片を除き、200～300 程度の線虫卵が残るようにする。一方、最初の操作で得られた線虫卵数が 300 より著しく多い場合は、洗浄ピンから時計皿の底に強く水をかけ、余分な線虫卵を除去し、最終的に、200～300 程度の線虫卵数が残るように調整する。

【卵の計数】 線虫の卵の計数は次のような操作で行う。線虫卵を付着させたシラキウス時計皿の底面には図 2 に示すように 6 重に同心円が刻まれている。さらに、その円は、直線により 6 等分されていて、そのうちの 1 本の直線は二重線になっている。この二重線を起点に最外周の円の中の線虫卵の数を数え、二重線のところまで来たら、その内側の円周に移り、以後同様に最内周に至るまで卵数を数える。

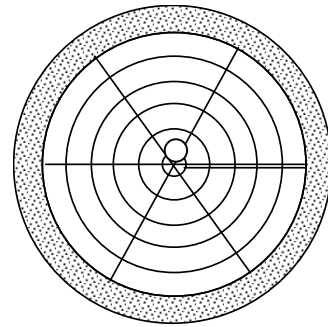


図 2 シラキウス時計皿

【線虫卵の培養】 以上の操作で準備した線虫卵は時計皿底に付着させたまま、10、15、20、25、30℃の 5 段階の温度条件下で培養する。培養開始にあたり、洗浄と卵数調整の終わった時計皿に、それぞれ 10 ml の水を加えるが、この際、加える水は、前もって各培養温度に調整した水をもちいる。つまり、20℃で培養する線虫卵には、20℃に調整した水を加えたのち、恒温器に移すよう注意する。

【孵化幼虫数の計数】 翌日、実体顕微鏡下で孵化した線虫幼虫の数を数える。線虫卵は孵化後はほとんど透明になり、確認が難しくなるので、孵化した幼虫の数と孵化していない卵の数を数えることにより、孵化卵の数を明らかにする。



図 3 マツノザイセンチュウの発生初期の卵

【胚発生過程の観察】 多数の線虫卵をホールスライドに付着させ、水滴を滴下後、カバーガラスで封入した上で顕微鏡下で胚発生過程を観察する。付着させた卵の発育ステージには多様なものが含まれているので、卵割の諸相が観察できる。

【孵化速度の検討】 求められた各温度別の孵化率にもとづき、発育速度におよぼす温度の影響の仕方を検討する。まず、横軸に温度、縦軸に各温度毎の 24 時間後の孵化率をプロットする。こうしてできた図から、線虫の卵内発生（胚発生）速度におよぼす温度の影響について検討する。