

15.	さび病菌，うどんこ病菌に感染した牧草の細胞オルガネラの立体的観察手法							
要約 病原菌に感染した植物組織を凍結割断後， <u>オスミウム浸軟処理</u> を9日間行い細胞質を除去する手法により， <u>植物及び糸状菌の細胞オルガネラ内部立体構造</u> を <u>走査電子顕微鏡</u> で観察する方法を開発した。								
草地試験場 環境部 作物病害研究室						連絡先	0287-36-0111	
部会名	農業生態		専門	作物病害	対象	牧草類	分類	研究

〔背景・ねらい〕

発病過程の解析や病害抵抗性機構の解明などに当たっては，宿主と病原菌の相互作用を細胞オルガネラ（細胞小器官）レベルで電子顕微鏡的に究明することが必要である。しかし，植物・微生物では細胞が厚い細胞壁に被われており，細胞質も密に詰まっていることなどから，これまでオルガネラ内部の立体構造はほとんど明らかにされていない。そこで，植物及び植物病原菌に適した核・オルガネラ内部立体構造の観察手法を検討する。

〔成果の内容・特徴〕

- ① さび病，うどんこ病の罹病葉，その他種々の植物病原菌感染組織及び健全組織を切り取り，1% オスミウス溶液で約2時間固定した。
- ② 固定後15，25，50% dimethyl sulfoxide 水溶液に各々30分間浸漬し，凍結切断後，0.1% O_5O_4 溶液で3，6，9日間オスミウス浸軟処理を行った。その後，1% O_5O_4 溶液で固定し，2% タンニン酸水溶液で導電染色を行い，再度1% O_5O_4 溶液で固定した。脱水後，臨界点乾燥を行い，白金蒸着後，高分解能走査電子顕微鏡で検鏡した（図1）。
- ③ 多くの植物組織及びさび病菌やうどんこ病菌の感染葉では，いずれも細胞質の剖出はオスミウム浸軟処理期間が動物細胞での3日間では不十分であった（図2）。しかし，9日間では良好となり，葉肉細胞（図3），菌糸及び吸器において核をはじめミトコンドリア，小胞体などの立体構造が明瞭に観察された（図4）。また，さび病菌吸器と宿主細胞質との接触界面の微細構造も立体的に観察することができた（図5）。

〔成果の活用面・留意点〕

- ① 本法は，広範囲にわたる多種の植物の組織，及びうどんこ病菌やさび病菌とその宿主の細胞オルガネラ内部立体構造の観察に利用できる。
- ② *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Pythium* などの病原菌は，本法によって細胞質の除去ができなかった。これらについてはさらに検討を要する。

〔具体的データ〕

試料の採取 (1~2mm×6~8mm)

↓
1% OsO₄で2時間固定

↓
緩衝液で洗浄

↓
5%, 25%, 50% DMSO水溶液に
各々30分間浸漬

↓
凍結割断

↓
0.1% OsO₄に9日間浸漬し、
細胞質を除去 (液は毎日交換)

↓
1% OsO₄で1時間固定

↓
2%タンニン酸で1時間導電染色

↓
1% OsO₄で1時間固定

↓
エタノールで脱水

↓
酢酸イソアミルと置換

↓
臨界点乾燥

↓
白金蒸着

↓
走査電子顕微鏡で観察

図 1 植物及び植物病原菌の細胞オルガネラ内部立体構造観察のための試料作製操作

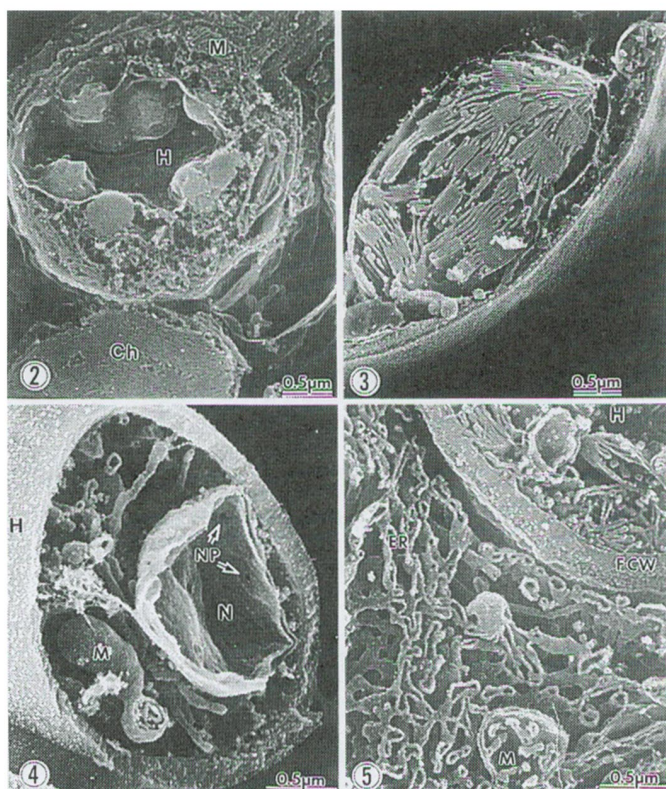


図 2~5 植物及び糸状菌の細胞オルガネラ内部立体構造。②イタリアンライグラス冠さび病罹病葉。オスミウム浸軟処理が3日間では葉肉細胞内の細胞質の除去は十分でない (H: さび病菌吸器, Ch: 葉緑体)。③~⑤オスミウム浸軟処理を9日間行った試料。③オーチャードグラスの葉緑体。④イタリアンライグラス冠さび病菌菌糸 (H) とその核 (N), 核孔 (NP) とミトコンドリア (M)。⑤イタリアンライグラス葉肉細胞内に形成された冠さび病菌の吸器 (H), 吸器細胞壁 (FCW) 及び宿主の小胞体 (ER)。

〔その他〕

研究課題名: 植物及び糸状菌の細胞オルガネラ内部立体構造の観察手法の開発

予算区分: 経常・特別研究 (バイオテク植物)

研究期間: 平成3年度

研究担当者: 古賀博則, 月星隆雄, 植松 勉

発表論文等: Koga, H., T. Tukiboshi and T. Uematsu (1992): Application of an osmium maceration technique to observe plant-microbe interfaces of Italian ryegrass and crown rust fungi by scanning electron microscopy. Can. J. Bot. 70: 438-442.

Koga, H., T. Tukiboshi and T. Uematsu (1993): The structure of the cell organelles of plant leaves revealed by high resolution scanning electron microscopy. Bull. Natl Grassl. Res. Inst. 47: 37-43.