

18. 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切断後、<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</u>内部立体構造を<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	草 地・生産管理 総合農業・生産環境 農業環境・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〕

動物細胞での手法を応用し、試料を凍結切断後、細胞質を除去するために0.1%オスミウム水溶液に9日間浸漬することにより、植物及び糸状菌の細胞オルガネラの内部立体構造を初めて明瞭に観察することができた。

- ① イタリアンライグラス冠さび病、ケンタッキーブルーグラス黄さび病、アカクローパうどんこ病の罹病葉、種々の植物病原菌感染組織、及びオーチャードグラス、トールフェスク、とうもろこし、ペレニアルライグラスなどの健全組織を切り取り、1%オスミウム溶液（OsO₄を0.05Mカコジル酸緩衝液に溶解）で約2時間固定した。
- ② その後15、25、50% DMSO (dimethyl sulfoxide) 水溶液に各々30分間浸漬し、凍結切断後、0.1% OsO₄ 溶液（0.05Mカコジル酸緩衝液に溶解）で3、6、9日間オスミウム浸軟処理を行った。その後、1% OsO₄ 溶液で1時間固定し、2%タンニン酸水溶液で1時間導電染色を行い、再度1% OsO₄ 溶液で1時間固定した。エタノール脱水後、臨界点乾燥を行い、アルミ試料台に載せ、白金を薄く蒸着した。観察は電子顕微鏡を用いた（図1）。
- ③ とうもろこし、ペレニアルライグラス、トールフェスクなどの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（図4）や、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、ペレニアルライグラス等多くの植物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* などの病原微生物は、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
 ↓
 凍結切断
 ↓
 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

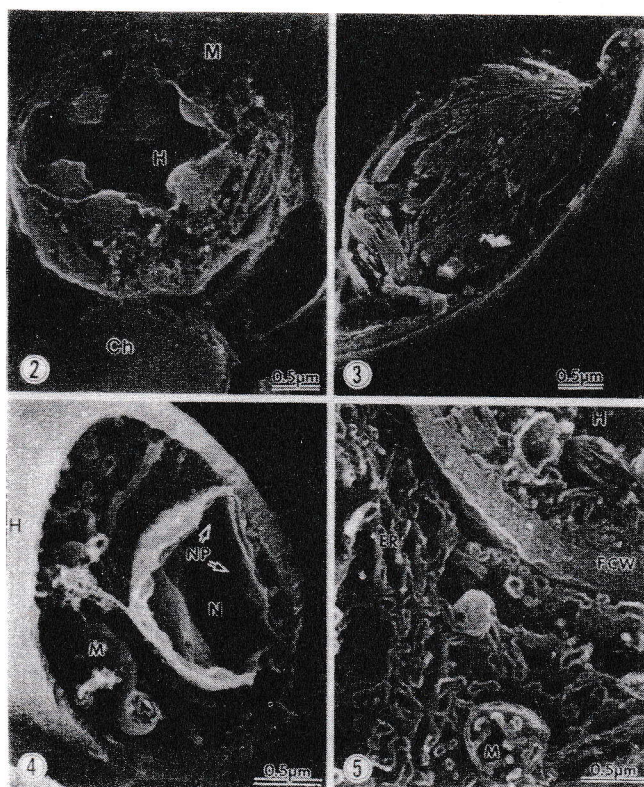


図2~5. 植物及び糸状菌の細胞オルガネラ内部立
 体構造。②イタリアンライグラス冠さび病罹病葉。
 オスミウム浸軟処理が3日間では葉肉細胞内の細胞質
 の除去は十分でない(H:さび病菌吸器、Ch:葉緑体)。
 ③~⑤オスミウム浸軟処理を9日間行った試料。③オ
 ーチャードグラスの葉緑体。④イタリアンライグラ
 ス冠さび病菌菌糸(H)とその核(N)、核孔(NP)とミトコ
 ンドリア(M)。⑤イタリアンライグラス葉肉細胞内に
 形成された冠さび病菌の吸器(H)、吸器細胞壁(FCW)
 及び宿主の小胞体(ER)。

[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 scan-
 ning electron microscopy. Bull. Natl Grassl. Res. Inst. 47:37-43.