

樹脂割断によるクローバー根瘤のSEM像

野 津 幹 雄*

Mikio Nozu

Scanning Electron Microscopy of Clover Root Nodule by
Resin Fracture

はじめに

走査電子顕微鏡 (SEM) は物体の表面構造を観察するのに用いられている。植物病理学の分野では植物病原菌類や罹病組織の状態が観察され、当研究室でも各種罹病組織を臨界点乾燥後カミソリ刃で切断し、観察している。これらの試料はこわれた組織や細胞を観察する感が強く、細胞レベルでの説明ができるような試料作成が望まれる。筆者は微生物による植物肥大組織に関心があり、試料としてマメ科植物の根瘤細胞を観察中である。本報では微生物と植物細胞の相互関係を SEM で観察しようとする試みの例としてクローバー根瘤のスチレン割断面について述べる。

実験材料および方法

島根大学構内圃場で、自然着生したホワイト・クローバー根瘤 (*Trifolium repens* L. -*Rhizobium trifolii*) を供試した。根部を水道水で洗い、根瘤の余分な水をろ紙で除去し、超薄切片用試料の作成と同じように、グルタルアルデヒドとオスミウム酸で二重固定した。試料はアルコール系列で脱水し、プロピレンオキサイドを用いスチレンを誘導し、2.5% 過酸化ベンゾイルを加えたスチレンモノマーに置換し、プラスチックカプセル内で重合させた (60°C, 24h)。ブロックをトリミングし、ナイフで割断した。スチレンをプロピレンオキサイドで溶解させ、酢酸イソアミールに置換し、L-CO₂ を用いて臨界点乾燥した (HCP-2)。アルミ試料台に銀ペーストで固定し、金をコーティングし (エイコー・エン지니어リング IB-3)、走査電子顕微鏡 (SMS-30, 15kV) で観察した。

* 植物病理学研究室

結果および考察

細胞の割断には種々の方法があるが、微細構造をこわさないで面を作成する簡単な方法としては試料を樹脂に包埋して、ガラスナイフ (又はダイヤモンドナイフ) で切削するか、そのまま割断するかの方法が考えられる。細胞の微細構造の観察に使用されている樹脂とその溶媒の関係で、スチレンを選んだ。また試料作成に当っては導電染色を目的とするオスミウム酸がスチレンの重合を妨げる点を考慮した。

図1-3は脱水後、臨界点乾燥してカミソリ刃で切断した場合で、図1は根瘤を縦に切断した組織である。根瘤組織のほぼ中央部にバクテロイド細胞 (根瘤菌を持った細胞) が多く、図1の左側は根瘤先端部で、分裂細胞からなり、根瘤菌はいない。また保護組織の細胞にも根瘤菌は存在しない。乾燥後の試料はスポンジ状で柔らかく変形しやすい。図2のように組織がこわれやすく、細胞を変形させずに切断することは困難である。当然根瘤菌は切断されない。ただし偶然に、図3-Aのように細胞壁が剝離されプロトプラストになる場合がある。このプロトプラストの細胞質部分に根瘤菌が認められる (図3-B)。このような像はダイズ根瘤にも見られ前報に述べた。

図4は比較的大きな組織割断面を示した。オスミウム酸や金のコーティングはほぼ均一と考えられるが、細胞相互の接触程度の違いであろうか、帯電して観察困難な細胞がある。バクテロイド細胞には中央に大きな液泡がある (図4)。すなわち図5-A、6-Aに示すようにバクテロイド細胞には中央液泡が発達している。しかしこの液泡には根瘤菌は認められない。根瘤菌は細胞質部分のみ認められる (図5-B、6-B)。このことはソラマメ根瘤のバクテロイド細胞に似ている。また図7

のようにバクテロイド細胞に隣接していても根瘤菌を持たない細胞もある。このことについてはダイズ根瘤の組織や細胞に似ている^{1,2,3)}。図7・8ではバクテロイド細胞に液胞がないが、これは液胞に達しない場所で切断された像である。また液胞に根瘤菌が比較的鮮明に認められるのは、試料作成時におけるトノプラストの損傷によるものである。ダイズ根瘤ではバクテロイド細胞が老化し、細胞質がほとんど消失しても膜構造の損傷は認められなかった⁴⁾。

図9・10はバクテロイド細胞の核と根瘤菌の関係を示した像である。核は細胞質部分にあるので、断面では核が現われる頻度は低い。根瘤菌(R)は核にいくらか陷入しているが、核内には存在していない。なお根瘤菌は細胞質部分の空洞に入っているように見える(図5-10)。根瘤菌(R)と細胞質との間隙は、ダイズ根瘤超薄切片の場合とほぼ同じであった。すなわち樹脂溶解過程における細胞の極端な伸縮は生じていないと考えた。図9-Bで示されるように根瘤菌も切断されており、根瘤菌の細胞質の存否も確認できる。

以上のことから、罹病組織細胞内の糸状菌はもちろん、孢子や花粉等の細胞断面の作成は容易であろう。ここで用いた方法は試料をスチレンに包埋しているので永久的に保存でき、都合のよい時に観察できる利点がある。しかし、図9・10に示されるように核の二重膜など、本来存在する構造が確認できない。樹脂切断により細胞の微細構造の説明が可能なSEM像を得るには他の技法も取り入れ、試料作成時の各段階のダメージを最少限にする工夫が必要である。

摘 要

植物と微生物の相互関係の微細構造をSEMで観察す

Summary

Resin fractured surfaces of root nodule of white clover (*Trifolium repens* L.) infected with *Rhizobium trifolii* were investigated by a scanning electron microscope.

Nodules which were double fixed with glutaraldehyde and osmium tetroxide were embedded in styrene, and then fractured with knife. The fractured specimens were dipped into propylene oxide. These specimens were transferred to iso-amyl acetate and critical-point dried using liquid CO₂. The dried nodule tissues were mounted on aluminium stages with conductive paste and coated with ion-sputtered gold. Bacteroidal cell of nodule had a developed central vacuole and cytoplasmic area pushed toward the periphery of plant cell wall. In the vacuoles of bacteroidal cells, bacteria were not observable. Bacteria were usually found embedded in cytoplasmic areas, but they were not recognized in nuclei of bacteroidal cells. Nuclei and plastids were observed, but nuclear envelope and other membrane structures could not visible in the fractured cells.

る場合、細胞内部が表面になるような試料作成が必要となる。ここではクローバー根瘤をスチレン樹脂包埋し、その断面を観察した。バクテロイド細胞には発達した中央液胞があった。根瘤菌は中央液胞には存在せず、バクテロイド細胞の細胞質部分に認められた。またバクテロイド細胞の核内には根瘤菌は認められなかった。

引用文献

1. 野津幹雄・城野洋一郎・糸井節美：細胞10：534-542, 1978.
2. 野津幹雄：島根大農研報14：120-130, 1980.
3. 野津幹雄：島根大農研報1：38-42, 1967.
4. 野津幹雄：日作紀36：472-480, 1967.

図の説明

カミソリ刃による切断面(図1-3)

- 図1. 縦に切断した根瘤組織。×70
- 図2. カミソリ刃による組織の崩壊。×130
- 図3. A バクテロイド細胞のプロトプラスト。×1700
B プロトプラストと根瘤菌(R)。×7500
スチレン切断面(図4-10)
- 図4. バクテロイド細胞組織。×180
- 図5. バクテロイド細胞。液胞(V)には根瘤菌は存在しない。A ×1100 B ×5500
- 図6. バクテロイド細胞。根瘤菌は細胞質部分に存在する。A ×700 B ×3500
- 図7・8. バクテロイド細胞とその隣接細胞。×1700
- 図9・10. バクテロイド細胞の核(N)と根瘤菌(R)。A ×3000 B ×9000 図10 ×2700









