

作物病害診断のための走査電子顕微鏡試料簡易作製法

福富雅夫・松代平治・田知本正夫

Masao FUKUTOMI, Heiji MATSUSHIRO and Masao TACHIMOTO : Simple preparation methods for diagnoses of crop diseases by scanning electron microscopy

走査電子顕微鏡 (SEM) が作られたのは1938年頃²⁾であるが、生物学領域における応用は試料作製技術の開発が遅れたために著しく遅れ、わが国の植物病理学領域では1968年に至ってはじめて用いられた。最近では農学領域の研究に広く応用されるようになってきたが、医学や一般生物学領域における応用に比べて、いまだに極めて低調である。その理由の一つには試料の作製法の問題があるように思われる。

SEM の作物病害診断への応用を考えると、SEM 像は光頭像とはかなり異った見え方をするので、光頭の知識が先行する現状では、十分注意しなければならない。しかし、とくに植物の組織や細胞内における病原体の存在の観察には、光頭ではかなり面倒な試料切片の作製法を必要とし、また、後日の検討に耐える写真を撮るためには、かなり高度な技術を必要とする場合が多いが、SEM 観察では、観察しようと思う試料の断面をカミソリの刃などで切り出すことによって、極めて簡単に観察することが可能である。また、ほぼ見えているままの形態が写真撮影される点など、光頭より便利な優れた面がある。しかしながら、生きていたときの形態をそのまま、または近似的状態に保持するように試料を作製するには、固定にはじまるやや面倒な試料作製のための処理を必要とするのが普通である^{1,6,9-14)}。

本報は作物病害の診断に SEM を利用するための簡易な試料作製法を検討し、詳細かつ迅速な病害の診断に役立てようとするものである。また、これらの方法はそのまま植物組織や昆虫などの動物材料にも用いることができる。

材料および方法

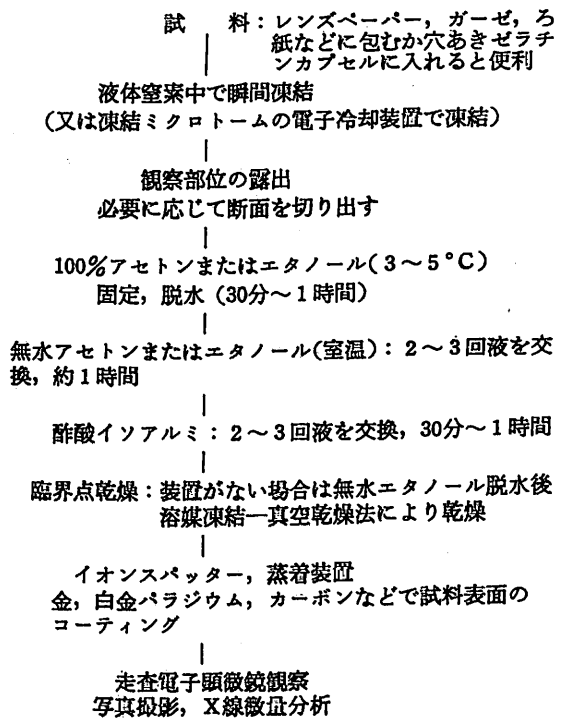
供試材料として、急速凍結脱水法には石川県石川郡野々市町採集の *Fusarium oxysporum* (分化型未同定) に起因するキク葉枯病 (新称)⁵⁾ に感染したキクの葉の健病境界部の組織を用いた。溶媒凍結乾燥法には当短大農場の温室中で発生したキュウリ幼果の腐敗する病害 (病

名未同定) を材料に用いた。凍結 SEM による観察には、普通の試料作製法では観察できない材料として、加賀市採集のニホンナン胴枯病 (品種幸水) の感染樹幹部を 26°C の湿箱におき、患部上の柄子殻より糸状に噴出した柄胞子塊 (胞子角) を用いた。

前2種の乾燥材料はイオンスプッター (日本電子(株)製, JFC-1100型) で金をコーティングした後、観察した。凍結 SEM の試料は生の材料を凍結して予備室中で銅蒸着を行ない、観察した。これら試料の観察には凍結 SEM (日本電子(株)製, JSM-35CF 型, 凍結走査装置付) を用いた。

結果および考察

最近、透過電子顕微鏡観察用試料の固定に急速凍結凍結法が用いられ、好結果が得られている^{7,8)} が、ここに



第1図 急速凍結脱水法

石川県農業短期大学農業資源研究所農業微生物研究室 Agricultural Microbiology, Research Institute of Agricultural Resources, Ishikawa Agricultural College, 1-308 Suematsu, Nonouchi, Ishikawa 921

報告する急速凍結脱水法は急速凍結置換法をさらに簡略化し、OsO₄などの固定剤も用いずに、凍結試料を無水アセトンやエタノール中に入れて固定、脱水し、臨界点乾燥によって、SEM 観察試料を作製する方法である。溶媒凍結乾燥法は固定、脱水が終わった試料を、臨界点乾燥装置を用いずに乾燥する方法⁴⁾として用いられたもので、かなり好結果が得られる方法で、その応用例を示した。これらを農作物病害診断に応用する方法について、具体的な手順ならびに応用例について説明すると以下の通りである。

1 急速凍結脱水法 (Quick freeze dehydration method)

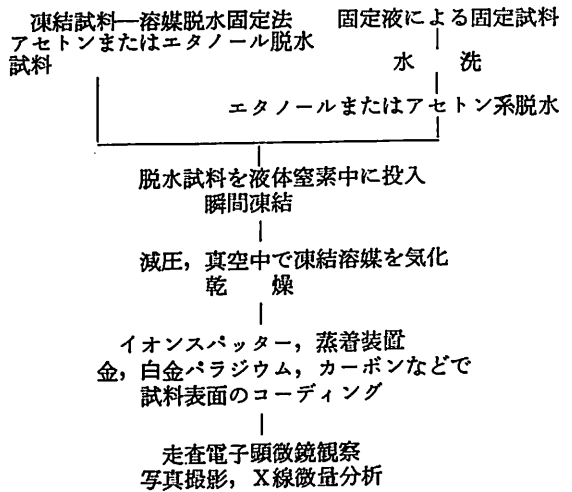
本法の概要は第1図に示す通りである。病患部などの観察試料を適当な大きさに切り、直接液体窒素中に投入して、急速に凍結させ、組織断面の観察にはメスやカミソリの刃を用いて観察面を切り出す。この操作は凍結前に手早く行なっても良い。また、電子冷却式氷結ミクロームを利用して凍結させ、切断面をつくっても良い。このようにして得られた凍結組織を無水アセトンまたはエタノール (3~5°C) 中に入れ、固定、脱水する (1~3時間, 2~3回液を交換, 初回以外は室温)。次に、酢酸イソアルミに入れ (室温で約1時間, 1~2回液を交換)、常法により臨界点乾燥を行なう。乾燥試料を試料台上に銀ペーストや Dotite などで接着して、イオンスパッターなどにより金などをコーティングした後、SEM によって観察する。

図版-1, 2は *Fusarium oxysporum* (分化型未定) に起因するキク葉枯病⁵⁾罹病葉の健病境界部組織中における菌糸の存在の観察に応用した例である。本病は葉枯線虫病に酷似した病徴を示す病害であるが、多数の試料について観察した結果、線虫の存在は全く見られず、多数の菌糸の存在が示された。したがって、研究の当初より、糸状菌病であろうと想定された。

2 溶媒凍結乾燥法 (Solvent freeze drying method)

本法は固定液による固定、脱水試料や上記方法などによる脱水試料を臨界点乾燥装置によらないで乾燥させる方法である (第2図)。まず、無水アセトンまたはエタノール中の脱水の終了した試料を取り出し、液体窒素中に入れて凍結させる。発泡が止まるのを待って、凍結試料を高真空下で乾燥させる。溶媒が気化して乾燥した試料は常法にしたがってイオンスパッターにより金をコーティングして、SEM によって観察する。

図版3, 4は温室中に発生したキュウリの腐敗効果を前記の急速凍結脱水法によってエタノール脱水し、その試料を溶媒凍結乾燥法によって溶媒を気化させて乾燥させた試料の観察結果である。病効果の組織中に多数の菌



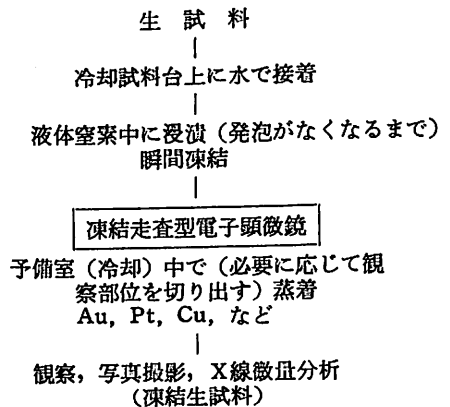
第2図 溶媒凍結乾燥法

糸や、胞子の形成が見られるが、病害の同定には至らなかったが、本法は胞子形成の観察にも使用できる方法である。

3 凍結走査電子顕微鏡法 (Cryo scanning electron microscopy)

本法は生の試料を凍結 SEM の試料台上に載せ、少量の水で密着させ、速やかに液体窒素中に入れて瞬間的に凍結させ、凍結 SEM 本体の予備室で、銅、金または白金パラジウムなどを蒸着し、生の凍結状態で観察し、写真撮影を行なう方法である (第3図)。本法によれば生試料を短時間で観察できるが、観察試料は保存できないので、写真として記録しなければならない。

本法はとくに分生胞子の形成状態³⁾の観察に適しているが、本法でないと観察できない例として、ナン胴枯病



第3図 凍結走査電子顕微鏡法

患部上に形成された柄子殻より噴出した糸状の柄孢子塊（孢子角）の観察例を図版—7に示した。また、柄子殻内に柄孢子が粘質物と思われる物質と共に充満して存在している状態の観察（図版—6）などにも極めて簡単に応用できた。

この凍結 SEM 法は極めて広範な応用分野を有していると考えられる方法で、さらに多くの分野への応用が期待される。

厳密な意味での病害診断は単一の方法のみでは困難で、病原菌の分離、同定、接種、理化学的反応の検査などを始めとして、数種の方法を用いなければならない。SEM 応用による病害診断も、系統立った研究があまりなされていない現状では、正確な病害診断に広く応用できるものにはなっていない。しかし、とくに原因不明の病害などで、糸状菌、細菌、ウイルス、線虫、生理病などのいずれであるかの初期判断を早急に下すには極めて便利で、ときには決定的証拠を得ることさえ容易である。

例えば、*Fusarium oxysporum* に起因するキク葉枯病⁵⁾の発見は、この病徴が葉枯線虫病の病徴に酷似するにもかかわらず、発病組織のどこにも線虫の存在が認められず、健病境界部組織中に多数の菌糸が存在することから、糸状菌病であろうとの確信は本病害診断の初期に SEM 観察を導入したことによって極めて簡単に得られた。この時点で、文献調査の結果と合わせて、本病が新病害であることは明らかであった。

しかしながら、一般的に SEM 応用による病害診断を行なうためには、SEM による診断例を増やし、光頭像と SEM 像との相違点などについての系統的な研究が必要である。SEM 像による病原体の分類体系の確立など、今後の研究に待つところが多い。簡易な試料作製法や観察法が、これらの研究の進展に役立てられることを期待するものである。

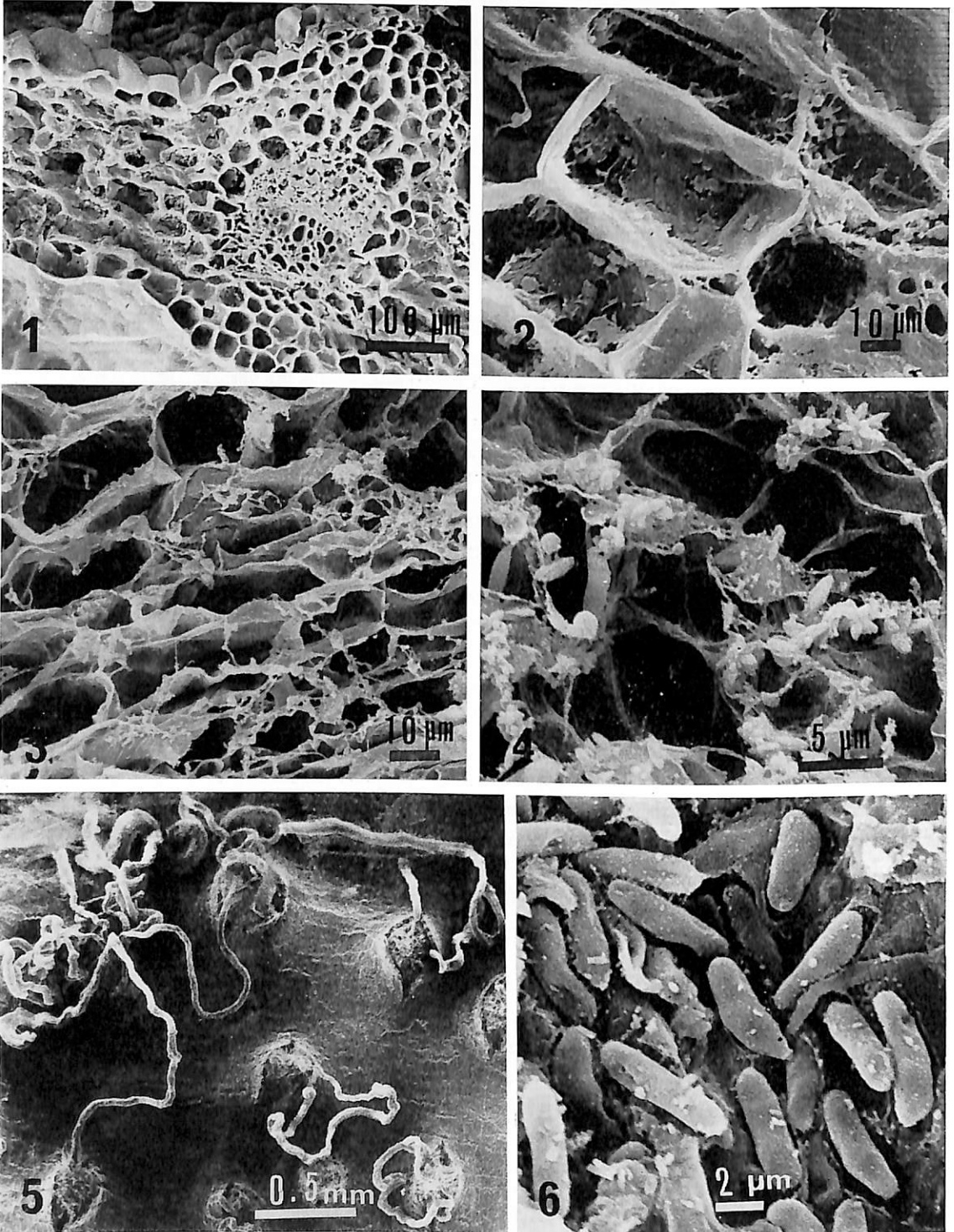
摘 要

農作物病害の診断に SEM を応用するための簡易な試料作製法ならびに凍結 SEM 法によらなければ観察できない例などについて報告した。急速凍結脱水法は生試料

を液体窒素中に浸漬して凍結し、無水アセトンやエタノール中に入れて固定、脱水し、臨界点乾燥によって観察試料を作製する方法である。溶媒凍結乾燥法は固定、脱水が終わった試料を液体窒素に入れて凍結させ、真空中で溶媒を気化、乾燥させる方法である。これらはいずれも簡易な方法であるだけでなく、試料の変形が少なく、病害診断に十分応用できるものであった。凍結 SEM 法については普通の固定法では著しく変形してしまう柄子殻よりの柄孢子塊の噴出状態の観察に用いたが、自然状態のままの形態が観察された。そして、凍結 SEM の応用範囲が極めて広いものであることについて述べた。

引用文献

- 1) 天児和暢・小池聖淳編著 (1982) 微生物学における電子顕微鏡技術 (上). 学会出版センター, 東京.
 - 2) Ardenne, M. von (1938) Z. Physik. 109: 553.
 - 3) Fukutomi, M. (1974) 8th Intern. Cong. on Elect. Microscopy, Cambera. Vol. II: 562~563.
 - 4) Fukutomi, M. (1976) JEOL News 14C(3): 2~12.
 - 5) 福富雅夫・松代平治・田知本正夫 (1986) 日植病学会関西支部会 (昭和61年度) 講要集. 6) Hayat, M. A. (ed.) (1978) Principles and techniques of scanning electron microscopy. Vol. 6, van Nostrand Reinhold Comp., N.Y. 7) Howard, R. J. and J. R. Aist (1979) J. Ultrastruct. Res. 66: 224.
 - 8) Howard, R. J. and J. R. Aist (1980) J. Cell Biol. 87: 55. 9) Kunoh, H., T. Watanabe, M. Yamada and T. Nagatani (1975) J. Elect. Microscopy. 24(4): 301~304. 10) 久能 均・渡部忠雄・山田満彦・永谷 隆 (1975) 細胞 7(2): 567~569.
 - 11) Murakami, T. (1974) Archivum histologicum japonicum 36(3): 186~193. 12) 日本電顕学会関東支部編 (1970) 電子顕微鏡技術集. 誠文堂新光社, 東京. 13) 日本電顕学会関東支部編 (1983) 走査電子顕微鏡の基礎と応用. 共立出版, 東京. 14) 渡部忠雄・永谷 隆・村上宅郎 (1975) 細胞 7(1): 118~125.
- (1986年9月8日受領)



図版説明 各種の簡易試料作製法によって作製した病害試料の SEM 写真

- 1-2. 急速凍結脱水法による試料を臨界点乾燥したキク葉枯病罹病葉組織。
 1. 維管束に近い葉肉組織の細胞中に細い菌糸が多数見られる。
 2. 葉肉細胞中に多量の菌糸が見られる。
- 3-4. 急速凍結脱水法による試料を溶媒凍結乾燥法によって乾燥させた温室キュウリの腐敗幼果の横断組織。多数の菌糸および数種の菌の分生胞子の形成が見られる。
- 5-6. 凍結 SEM によるニホンナン胴枯病柄子殻より噴出した糸状の柄胞子塊(5)および柄子殻内における柄胞子の存在状態(6)。