

博士（農学） 植 竹 ゆかり

学位論文題名

ネジバナ種子の2核 *Rhizoctonia AG-C* による共生発芽に関する研究

学位論文内容の要旨

2核 *Rhizoctonia AG-C* によるネジバナ (*Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames) 種子の0.3%エンバク粉末寒天培地 (OPA) 上での共生発芽を、光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて観察し、さらにリンゴ酸シンターゼの酵素細胞化学によりグリオキシゾームの同定を行った。

1. 共生発芽と菌の侵入および菌糸形成

種子は長径約200μm、短径約100μmの胚と薄い種皮のみからなり、胚乳および子葉は無かった。0.3% OPA での無菌培養では、約一ヶ月後でも胚に肥大はみられなかった。共生培養では、肥大した胚の全てに菌の侵入がみられ、また肥大前の胚にも菌の侵入がみられたことから、胚の肥大は菌の侵入により起こることが明らかとなった。菌糸は胚の基部細胞から単菌糸で侵入した。菌の侵入後、胚はまず短径が肥大し、その後両方向に肥大して種皮を破り、プロトコームとなつた。プロトコームはさらに生長し、分裂組織の近くからプロトコーム毛を形成し、シュートが形成された。プロトコーム毛あるいは表皮を通じて培地中へ出る内部菌糸が観察され、菌糸が存在する毛で原形質流動が観察された。プロトコーム毛から侵入する菌糸は観察されなかった。

OPA のエンバク濃度が菌の侵入に及ぼす影響について検討した。0.3%, 0.9%, 1.5%, 2.1%, 2.7% および 3% OPA 上に播種・接種した種子を経時的に菌糸染色した結果、菌の侵入率は0.3%で最も高く、エンバク濃度に反比例して低下し、2.1%以上の濃度では侵入率が顯著に低下した。WA, 0.3%, 0.9%, 1.5%, 2.1%, 2.7% および 3% OPA の試験管斜面培地に種子を蒔いて菌を接種し、約一ヶ月後にプロトコームおよび実生の生育段階、1個体当たりの生重および生存率を調べた。その結果、生存率は1.5%以下の濃度で最も高く、2.1%以上では濃度に反比例して低下した。また、生育段階は0.3%, 0.9%および1.5%の濃度で最も進み、2.1%以上では生育度は遅れた。また、一個体当たりの生重は1.5% OPA が最も高かった。各エンバク濃度の試験管培養において、菌の侵入直後の種子を5個体ずつ移植した結果、生存率は0.9%以下の濃度で最も高く、それ以上では濃度に反比例した。生育段階は0.3%で最も進み、それ以上の濃度

度ではばらつきがあった。2.1%以上のエンバク濃度では共生関係が不安定であった。また、移植後消失した種子が菌の寄生により枯死したものであるかどうか明らかではなかった。

2 核 *Phytophthora* AG-C がセルロース膜上に形成する、侵入糸様構造物の形成に及ぼすエンバク粉末濃度の影響を、塩化亜鉛・ヨード染色により調べた。その結果、セルロース膜非染色部位数（/セルロース膜 1 mm^2 /菌の乾重 (g)）は、0.3% OPA で最も多く、次いで WA, 3% OPA では最も少なかった。

菌毬形成と消化について、ラクトフェノール・トリパンブルーおよびパラフィン切片のヘマトキシリン・サフラン染色により観察した。基部細胞から侵入した菌糸は分裂組織には侵入せず、胚およびプロトコームの基部側の準表皮柔組織 (SEP) と内部皮層柔組織 (ICP) で菌毬を形成した。前者の菌毬はサフラン染色性が良く、消化されなかつたが、後者の菌毬は同染色性が悪く、消化された。消化された菌糸を含む細胞で二次感染が見られた。ヨード・ヨードカリによるデンプン粒の染色では、デンプン粒は胚にわずかかあるいはまったく含まれなかつたが、共生発芽では表皮および分裂組織側の非感染細胞中に蓄積した。また、菌糸が赤色に染まる菌毬が観察された。スダン・ブラック B による脂肪の染色では、脂肪は胚に多量に含まれていたが、共生発芽にともない減少した。

2. 共生発芽におけるネジバナ細胞の微細構造変化

共生発芽の発芽からシートの形成までを種子の胚の短径の増加量にしたがって 7 つの生育段階に分け、微細構造の変化を観察した。各生育段階は以下の光学顕微鏡レベルの変化に相当した。

I, 菌侵入直後で胚の短径のみが増加；II, 長径の増加量が短径の増加量を上回る；III, 胚が種皮を破り、プロトコームとなる；IV, 分裂組織の分裂が活発となる；V, プロトコーム毛の形成が開始される；VI, 分裂組織表面にくぼみが生じる；VII, シートが形成される。

無菌の胚の細胞は、多量の脂肪体とタンパク体およびわずかなデンプンで満たされていた。無菌培養では 25 日目の胚の細胞で、細胞質および細胞小器官が観察された。脂肪がわずかに減少し、またアミロプラスチックが存在した。

侵入菌糸の細胞壁は、宿主由来と考えられる encasement 層と宿主原形質膜に取り囲まれ、菌糸を取り囲む宿主原形質膜に波形、陷入、突出がみられ、またパラミューラル体が観察された。ICP に形成された菌毬を構成する菌糸の細胞壁は薄く、細胞質の電子密度が高く、亜球形のミトコンドリアおよびリボソーム様の粒子が多数存在した。その後菌糸は次第に変形してつぶれ、菌糸細胞壁と encasement 層からなる層状の塊となった。菌糸の感染から消化までの過程は、全観察期間を通して ICP 細胞で繰り返された。一方 SEP の菌糸の細胞壁は ICP の菌糸のそれ

よりも厚く、どの生育期においても消化されなかった。Stage Iでは宿主の細胞質とともに、ミトコンドリア、リボソーム、プロプラスチド、ミクロボディー、粗面小胞体、ディクチオゾーム、および液胞が観察され、また菌の消化の兆候がこの生育段階すでに認められた。Stage IIでは、消化された菌糸残渣が、宿主細胞質と液胞に取り囲まれて、ICP細胞中央に存在し、同時に新たに感染した菌糸が観察された。菌の侵入を受けたICP細胞で、脂肪は宿主細胞壁沿いおよび菌糸残渣中に散在したが、菌の侵入を受けたSEPでは、脂肪は未消化の菌糸間に密に存在した。タンパク体はICPで急速に減少し、Stage IIIではいずれの細胞においても観察されなかった。Stage V以降、宿主細胞中に陥入した宿主原形質膜の中に散在している菌糸の内容物、また、結晶様の封入体を有するミクロボディーが観察された。Stage VIIにおいても微小な脂肪が観察された。共生発芽にともない、全てのSEP細胞と他の非感染細胞では、アミロプラストが存在したが、菌毬を含むICP細胞にはアミロプラストは見られなかった。例外的に、菌糸残渣のみを含む場合および非消化菌糸のみを含む場合に、アミロプラストが存在した。

3. 共生発芽におけるグリオキシゾームの存在

無菌培養の胚細胞のミクロボディーに、リンゴ酸シンターゼに特異な反応が見られ、グリオキシゾームと同定された。グリオキシゾームは4日、10日、15日、および25日の全ての観察期において認められた。

共生発芽では4日目にグリオキシゾームが観察されたが、5日目にはグリオキシゾームの強い反応が少なくなった。さらに、10日および15日目では、ミクロボディー中の反応沈澱物はわずかあるいは認められなかった。脂肪は無菌培養ではわずかに減少したが、共生培養では菌の感染の見られたICP細胞で急速に減少した。これらの結果から、菌の感染がグリオキシゾームが関与する宿主の脂肪代謝に変化を与えることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 生 越 明
副査 教授 木 村 郁 夫
副査 教授 喜久田 嘉 郎

本論文は和文で記され、図15、表1、図版27を含む総頁数175からなり、7章をもって構成さ

れている。

ラン科植物の中には共生菌をもち、種子発芽、生育に役立てているものがある。本研究は共生菌の役割を知るため、その一つである2核 *Rhizoctonia* AG-Cによるネジバナ (*Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames) 種子の共生発芽を、光学顕微鏡、走査型および透過型電子顕微鏡を用いて観察し、さらにリンゴ酸シンターゼの酵素細胞化学によりグリオキシゾームの同定を行った研究をまとめたものである。

1. 共生発芽と菌の侵入および菌球形成

種子は約 $200\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ の胚と薄い種皮のみからなり、胚乳および子葉は無かった。約一ヶ月の無菌培養では胚に肥大はみられなかった。共生培養では、肥大した胚の全てに菌の侵入がみられ、また肥大前の胚にも菌の侵入がみられたことから、胚の肥大は菌の侵入により起こることが明らかとなった。菌は単菌糸で胚の基部細胞から侵入し、内部皮層柔組織 (ICP) および準表皮柔組織 (SEP) で菌球を形成したが、分裂組織には侵入しなかった。菌の侵入後、胚はまず短径が増加し (Stage I), その後両方向に肥大し (Stage II), 種皮を破ってプロトコームとなつた (Stage III)。プロトコームはさらに生長して分裂組織の分裂が活発になり (Stage IV), プロトコーム毛を形成し (Stage V), 分裂組織表面にくぼみが生じ (Stage VI), 次いでシュートを形成した (Stage VII)。プロトコーム毛および表皮から出る菌糸が観察されたが、毛から侵入する菌糸は認められなかった。0.3%, 0.9%, 1.5%, 2.1%, 2.7% および 3% OPA の培地での菌の侵入率は 0.3% で最も高く、それ以上では濃度に反比例し、2.1% 以上では顯著に低かった。各エンバク濃度の試験管斜面培地に、菌侵入直後の種子を移植し、約一ヶ月後にネジバナの生育段階、生存率および 1 個体当たりの生重を調べた。その結果、エンバク濃度の上昇にともなって生存率が下がり、生育度がばらついた。2.1% 以上のエンバク濃度では共生関係が不安定であった。内部観察では SEP に形成された菌球はサフラニン染色性が良く全観察期間で消化されなかつたが、ICP に形成された菌球は同染色性が悪く、消化と再侵入を繰り返した。

2. 共生発芽におけるネジバナ細胞の微細構造変化

経時的な微細構造観察では、菌糸は宿主原形質膜と宿主由来と考えられる encasement 層に取り囲まれ、宿主原形質膜には波形、陥入、突出がみられ、またパラミューラル体が観察された。ICP では、亜球形のミトコンドリアおよびリボゾーム様粒子を多数有する菌糸が次第に変形してつぶれ、細胞壁と encasement 層からなる層状の塊の残渣となつた。菌の侵入前、胚は脂肪で満たされ、タンパク体とわずかにアミロプラスチドが存在した。菌の侵入後、Stage I では宿主細胞質とともに、ミトコンドリア、リボゾーム、プロプラスチド、ミクロボディー、粗面小胞体、

ディクチオゾームおよび液胞が観察され、また菌の消化の兆候が認められた。Stage IIでは、ICP 細胞では液胞が発達して菌の残渣を取り囲み、また二次感染菌糸がみられたが、SEP 細胞では脂肪の間に未消化の菌糸が存在した。タンパク体は ICP では急速に減少し、SEP ではそれより遅れたが、いずれの細胞でも Stage IIIまでに消失した。脂肪は共生発芽にともなって減少したが、Stage VIIでも微小な滴として観察された。アミロプラスチトは全ての SEP と他の非感染細胞で共生発芽にともなって増加したが、感染した ICP では観察されなかった。例外的に、菌糸残渣のみを含む場合および非消化菌糸のみを含む場合にアミロプラスチトが存在した。種子の無菌培養では、細胞小器官を含む細胞質が発達し、脂肪がわずかに減少した。

3. 共生発芽におけるグリオキシゾームの存在

グリオキシゾームの指標酵素であるリンゴ酸シンターゼの酵素細胞化学では、無菌培養の胚の4; 10, 15および25日目のミクロボディーに特異的な反応が見られたことから、ネジバナ種子がグリオキシゾームを持つことが明らかになった。共生発芽では4日目にグリオキシゾームが観察されたが、10日目以降ミクロボディー中の反応産物はわずかか、あるいは認められなかった。脂肪は菌の感染の見られた ICP 細胞で急速に減少した。これらの結果から、菌の感染が、グリオキシゾームが関与する宿主の脂肪代謝に変化を与えることが示唆された。

以上の研究成果は、ランの共生発芽における共生菌の役割について新たな知見をえたものであり、高く評価される。よって審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者植竹ゆかりは博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。