

Fusarium oxysporumにおける酸化還元酵素の超微構造的局在

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松村, 治和 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8976

Fusarium oxysporum における酸化還元酵素の 超微構造的局在

金沢大学医学部皮膚科学教室 (主任: 広根孝衛教授)

松 村 治 和

(昭和57年2月15日受付)

Fusarium oxysporum の菌細胞内の酸化還元酵素の活性を, diaminobenzidine (DAB) を基質とした電顕細胞化学的方法により検討した。Seligman らの方法 (J. Cell Biol., 38, 1-14, 1968) により検出された cytochrome oxidase 活性は, 菌糸・分生子および厚膜胞子の細胞のすべてにおいてミトコンドリアの櫛間腔と外区画に限局していた。この酵素活性は KCN および NaN_3 により阻害された。Graham & Karnovsky 法 (J. Histochem. Cytochem., 14, 291-302, 1966) および Novikoff & Goldfischer 法 (J. Histochem. Cytochem., 17, 675-680, 1969) により検出された cytochrome *c* peroxidase 活性は, 菌糸・分生子および厚膜胞子の細胞のすべてにおいてミトコンドリア櫛に局在していた。なお, この酵素の活性は KCN および NaN_3 により阻害されたが, aminotriazole では阻害されなかった。catalase 活性は Novikoff & Goldfischer 法により検索したが, 菌糸細胞内のペルオキシゾームに似た形態を示す microbody に本酵素活性は認められなかった。

Key words *Fusarium oxysporum*, cytochrome oxidase, cytochrome *c* peroxidase, catalase

Fusarium 属菌は不完全菌類に属し, 空中, 土壌中および水中に存在する¹⁾。それは種々の農作物や樹木の幼苗を侵す植物病原菌であるが, ヒトの角膜真菌症^{2)~4)}および爪真菌症^{5)~6)}の原因菌として, また熱傷^{7)~8)}や下腿潰瘍⁹⁾の汚染菌としても知られている。しかし, 治療の基礎資料として役立つこの属の細胞活性に関する情報はまだ少ない。著者はこの属の代表的菌種である *Fusarium oxysporum* (*F. oxysporum*) について cytochrome oxidase, cytochrome *c* peroxidase および catalase の活性と超微構造的局在を電顕細胞化学的に検討したので, ここに報告する。

材料および方法

1. 材 料

被検菌株はヒト爪より分離, 同定された *F. oxysporum* (金沢大学医学部皮膚科学教室保存株, No.1486) である。この菌株を potato - dextrose agar 平面培地

上に移植, 室温で約1ヵ月間培養した (図1)。形成された集落の半径のほぼ中央より寒天とともに菌塊を採取, 1 mm³以下に細切し, 試料とした。

2. 方 法

1) cytochrome oxidase の検出

Seligman らの方法¹⁰⁾に従い, 試料を 0.1 M リン酸塩緩衝 2% ダルタルアルデヒド (pH 7.4) に 4°C で 1 時間固定後, 次の反応液に 37°C で 30 分間浸漬した。

dist. water	5 ml
3, 3'-diaminobenzidine tetra - HCl (DAB, 同仁)	5 mg
0.2 M phosphate buffer (pH 7.4)	5 ml
catalase (Sigma)	2 mg
cytochrome <i>c</i> (Sigma, Type III)	10 mg
sucrose	750 mg

対照として反応液から DAB を除いた液に 37°C で 30 分間浸漬した。阻害試験として, 反応液に 10 mM KCN

Ultrastructural Localization of Oxidoreductase Activities in *Fusarium oxysporum*. Harukazu Matsumura, Department of Dermatology (Director: Prof. T. Hirone), School of Medicine, Kanazawa University.

または 10 mM NaN_3 を加えた液に 37°C で 30 分間浸漬した。

酵素細胞化学的反應後、光顕用標本作製のため、試料を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 60 分間 (3 回交換) 洗浄し、グリセリンゼリーで封入した。電顕用には、試料を 2% 過マンガン酸カリウム (KMnO_4) 水溶液に 4°C で 1 時間固定、蒸留水で洗浄後アセトン系列で脱水、エポン 812 に包埋した。次いで薄切切片を LKB III 型超ミクロトームに取り付けたダイヤモンドナイフで作製し、染色することなく日立 H-500 型または同 HU-12 A 型電顕で検索、写真撮影した。

2) cytochrome c peroxidase の検出

試料を 0.1 M リン酸塩緩衝 2% グルタルアルデヒド (pH 7.4) に 4°C で 2 時間固定後、Graham & Karnovsky¹¹⁾ または Novikoff & Goldfischer¹²⁾ の反応液に 37°C で 30 分間浸漬した。

Graham & Karnovsky の反応液は次の通りである。

DAB	5 mg
50 mM Tris - HCl buffer (pH 7.6)	10 ml
1% H_2O_2	0.1 ml

Novikoff & Goldfischer の反応液は次の通りである。

DAB	20 mg
50 mM 2 - amino - 2 - methyl - 1, 3 - propenediol (Sigma) buffer (pH 10.0)	9.8 ml
1% H_2O_2	0.2 ml

対照として反応液から H_2O_2 を除いた液に 37°C で 30 分間浸漬した。阻害試験として、反応液に 10 mM KCN または 10 mM NaN_3 を加えた液に 37°C で 30 分間浸漬した。なお、catalase 活性による反応を除外するため、反応液に 10 mM 3 - amino - 1, 2, 4 - triazole (ATZ) を加えた液に 37°C で 30 分間浸漬した。

光顕用および電顕用標本の作製は前項におけると同様の方法で行った。

3) catalase の検出

試料を 0.1 M リン酸塩緩衝 2% グルタルアルデヒド (pH 7.4) に 4°C で 2 時間固定後、Novikoff & Goldfischer の反応液¹²⁾ に 37°C で 30 分間浸漬した。

対照および阻害試験は cytochrome c peroxidase の場合と同様に行った。光顕用および電顕用標本の作製も前項におけると同様に行った。

成 績

1. cytochrome oxidase 反応

1) 光顕像：菌糸 (図 2)、小分生子 (図 4)、大分生子および厚膜胞子 (図 5) の細胞内に、不規則に配列する褐色ないし黒褐色の cytochrome oxidase 反応陽性

顆粒がみられた。DAB 欠如反応液に浸漬した対照 (図 3)、KCN 添加反応液または NaN_3 添加反応液に浸漬した阻害試験標本では、すべての菌細胞において反応陽性顆粒はほとんどまたは全く認められなかった。

2) 電顕像：菌糸細胞では (図 8)、ミトコンドリアの櫛間腔 (intracristal space) および外区画 (outer compartment) に高電子密度の反応産物の沈着がみられた。反応産物の沈着の強さは一様でなく、同一のミトコンドリアでも櫛により異なり、また同一の櫛でも部位により異なっていた。小分生子細胞 (図 9)、大分生子細胞および厚膜胞子細胞 (図 10, 11) においても、反応産物の沈着はミトコンドリアの櫛間腔と外区画にみられ、菌糸細胞の場合とほぼ同様の所見であった。いずれの菌細胞においても反応産物の沈着はミトコンドリアに限局され、核膜、小胞体および形質膜には認められなかった。なお、菌糸の隔壁付近に存在する Woronin 小体にも反応産物の沈着は認められなかった。対照では菌細胞内に反応産物は認められなかった。KCN 添加反応液および NaN_3 添加反応液に浸漬した阻害試験標本では、すべての菌細胞内に反応産物は全く認められなかった。

2. cytochrome c peroxidase 反応

1) 光顕像：Graham & Karnovsky 液浸漬標本でも Novikoff & Goldfischer 液浸漬標本でも、菌糸 (図 6)、小分生子、大分生子 (図 7) および厚膜胞子の細胞内に、不規則に配列する褐色ないし黒褐色の peroxidase 反応陽性顆粒がみられた。Graham & Karnovsky 液浸漬標本と Novikoff & Goldfischer 液浸漬標本との間に所見の差異は認められなかった。 H_2O_2 欠如反応液に浸漬した対照では反応陽性顆粒は認められなかった。KCN 添加反応液および NaN_3 添加反応液に浸漬した阻害試験標本では反応陽性顆粒はほとんどまたは全く認められなかった。ATZ 添加反応液浸漬標本では、その無添加反応液に浸漬した標本におけると同様に、細胞内に反応陽性顆粒がみられた。

2) 電顕像：菌糸 (図 12, 13)、分生子 (図 14, 15) および厚膜胞子 (図 16, 17) の細胞内において、反応産物の沈着はミトコンドリア櫛に認められた。反応産物の沈着の強さはミトコンドリア櫛により、また櫛の部位により差異を示した。いずれの菌細胞においても反応産物の沈着はミトコンドリアに限局され、核膜、小胞体および形質膜には認められなかった。対照では菌細胞内に反応産物は認められなかった。KCN 添加反応液および NaN_3 添加反応液に浸漬した阻害試験標本では、すべての菌細胞内に反応産物は全く認められなかった。ATZ 添加反応液浸漬標本では本酵素活性の阻害は認められなかった。

3. catalase 反応

1) 光顕像：すべての菌細胞において反応陽性顆粒は cytochrome *c* peroxidase 反応の場合と同様に細胞内に出現した。この所見を catalase 阻害剤である ATZ 添加反応液に浸漬した標本における所見と比べても、ATZ による反応陽性顆粒の減少は認められず、ペルオキシゾームの存在を示す所見は得られなかった。

2) 電顕像：菌糸細胞内にペルオキシゾームに類似の形態を示す卵円形小体が少数みられたが、この小体に反応産物の沈着は認められなかった (図 18, 矢印)。分生子および厚膜胞子の細胞にはそういう小体は認められなかった。

考 察

1. 過マンガン酸カリウム固定について

Wergin¹³⁾¹⁴⁾はトマトの茎に接種された *F. oxysporum* のオスミウム酸固定標本を電顕的に観察し、菌糸細胞は細胞質内に核、核小体、ミトコンドリア、リボゾーム、粗面ならびに滑面小胞体、液胞、脂質滴、グリコーゲン様顆粒および microbody を含有し、また microbody 由来の Woronin 小体が隔壁付近に存在すると述べている。しかし、著者は KMnO_4 固定標本において菌糸細胞の細胞質内に核、ミトコンドリア、小胞体、液胞および脂質滴を観察したが、核小体、遊離および小胞体に付着するリボゾームとグリコーゲン様顆粒を見出し得なかった。この差異はおそらく KMnO_4 固定によるものであり、同様のことは他の真菌¹⁵⁾や動物組織の細胞¹⁶⁾について既に指摘されている。しかし、 KMnO_4 固定標本でも酵素細胞化学的反応の反応産物は電子密度の高い物質として観察されること、その局在を示すのに必要な細胞内膜系の微細構造は KMnO_4 固定によりよく保存されること、また無染色の状態では細胞内膜系はオスミウム酸固定標本におけるよりもむしろ KMnO_4 固定標本の切片においてより明瞭にみられることが示されたので、本研究では KMnO_4 固定を用いたわけである。これらの利点から、 KMnO_4 固定は酵素細胞化学的反応後の真菌および細菌の固定法として有用であると考えられる。

2. cytochrome oxidase の局在

真菌細胞における cytochrome oxidase 活性の電顕細胞化学的証明には初め aryl amine 類を基質として用いる Burstone 法^{17)~20)}が応用されたが、のちに diaminobenzidine (DAB) を基質とした Seligman らの方法¹⁰⁾が導入され、特異性の高い、信頼できる所見が得られるようになった。この方法を用いた電顕細胞化学的研究はこれまで *Aspergillus niger*²¹⁾、*Candida albicans*²²⁾および *Trichophyton rubrum*²³⁾について行われ、

これらの菌細胞では cytochrome oxidase 活性はミトコンドリアにおいてのみ証明されること、またそれはミトコンドリアの櫛間腔と外区画に局在することが報告されている。

著者の観察でも *F. oxysporum* の菌細胞における cytochrome oxidase 活性はミトコンドリアの櫛間腔と外区画に局在することが示され、それは核膜、小胞体および形質膜には認められなかった。なお、Woronin 小体に cytochrome oxidase 活性は認められなかった。cytochrome oxidase 活性に関する所見は *F. oxysporum* の菌糸、分生子および厚膜胞子の細胞においてミトコンドリアが電子伝達系の主な場であることを示している。

3. cytochrome *c* peroxidase

cytochrome *c* peroxidase は最初酵母菌²⁴⁾において生化学的ならびに電顕細胞化学的に証明され、この菌に特異的な酵素と考えられていたが、その後、他の真菌^{21)~23)}や細菌²⁵⁾でも証明されている。cytochrome oxidase の場合と同様に、cytochrome *c* peroxidase の電顕細胞化学的証明には当初 aryl amine²⁴⁾が基質として用いられたが、のちに特異性のより高い DAB を用いる方法、すなわち Graham & Karnovsky 法¹¹⁾が導入され、この酵素の細胞内分布が示されるようになった。次いで、この方法の変法として高アルカリ性 DAB 反応、すなわち Novikoff & Goldfischer 法¹²⁾が peroxisome の catalase の検出用に開発されたが、この方法もミトコンドリアの cytochrome *c* peroxidase の検出に用いられている。これら二つの方法を用いて、*Aspergillus niger*²¹⁾、*Candida albicans*²²⁾、*Trichophyton rubrum*²³⁾および *Saccharomyces*²⁶⁾ の菌細胞のミトコンドリアにおける cytochrome *c* peroxidase 活性の局在がこれまでに証明されている。

しかし、この反応の特異性に関係のある阻害試験について若干の議論がある。大槻²¹⁾は、Novikoff & Goldfischer 法で *Aspergillus niger* のミトコンドリアの cytochrome *c* peroxidase 活性を検出し、その際酵素活性は 10 mM NaN_3 により阻害されなかったと述べている。また、Hirai²⁷⁾は、Graham & Karnovsky 法の変法で検出された *Tetrahymena pyriformis* のミトコンドリアの cytochrome *c* peroxidase は 10 mM NaN_3 で阻害されなかったと述べている。これに反して、佐野²³⁾は、Novikoff & Goldfischer 法で検出された *Trichophyton rubrum* のミトコンドリアの cytochrome *c* peroxidase は 10 mM NaN_3 により強く阻害されたと述べている。なお、*Thiobacillus novellus*²⁵⁾ から分離された cytochrome *c* peroxidase の活性は 1 mM ~ 8 mM NaN_3 により速かに阻害されるという生化学的知

見も報告されている。

著者の観察では *F. oxysporum* における cytochrome *c* peroxidase 活性は主にミトコンドリア櫛に局在すること、またそれは核膜、小胞体および形質膜には認められないことが示された。そういう所見はこの菌の菌糸細胞、分生子細胞および厚膜胞子細胞に共通であった。そして、*F. oxysporum* における cytochrome *c* peroxidase 活性は Graham & Karnovsky 法でも Novikoff & Goldfischer 法でも同じように検出され、いずれの場合にも 10 mM NaN_3 により強く阻害されることが観察された。著者の所見は NaN_3 による阻害試験が異なる検出法により異なる結果を示すのではないかという疑問を解消したわけである。上述の報告がいずれも誤りのないものであるならば、観察対象の違いにより阻害試験結果も異なるのではないかと思われるが、この点に関しては分離された酵素に対する阻害効果を調べるといふ生化学的研究を含む将来の研究にまたねばならないと考えられる。

4. catalase 活性

従来 catalase はペルオキシゾームの標識酵素として種々の動物および植物の組織細胞において電顕細胞化学的に証明されていて、それには Novikoff & Goldfischer 法¹²⁾が好んで用いられている。真菌類の間では、catalase 活性は酵母類^{28)~30)}、藻菌類¹¹⁾および不完全菌類である *Aspergillus niger*²¹⁾と *Trichophyton rubrum*²³⁾において従来 microbody といわれた小体に証明されているが、*F. oxysporum*¹³⁾では検出されていない。他方、Maxwell ら³²⁾は *F. oxysporum* を含む 14 種の真菌の microbody とその catalase 活性を検討し、生化学的に菌の抽出液に catalase 活性が証明されても、電顕細胞化学的にはその菌の microbody に酵素活性が検出されなかったと述べている。

著者の観察では、*F. oxysporum* の菌糸細胞内にペルオキシゾームに似た形態を示す microbody が認められたが、その小体に catalase 活性は認められなかった。この小体の性質は明らかでなく、今後検討する必要がある。

結 論

ヒト爪の病巣より分離された *F. oxysporum* の菌細胞内の cytochrome oxidase, cytochrome *c* peroxidase および catalase の活性を電顕細胞化学的方法により検討した。得られた成績は次のようである。

1. Seligman らの方法により検出された cytochrome oxidase 活性は菌糸、分生子および厚膜胞子の細胞のすべてにおいてミトコンドリアの櫛間腔と外区画に局限されていて、その他の細胞内小器官には認め

られなかった。

2. Graham & Karnovsky 法および Novikoff & Goldfischer 法により検出された cytochrome *c* peroxidase 活性は菌糸、分生子および厚膜胞子の細胞のすべてにおいてミトコンドリア櫛に局在していた。また、酵素反応産物が検出方法の違いにより異なることはなかった。なお、この酵素の活性は NaN_3 により強く阻害されることが示された。

3. catalase 活性は Novikoff & Goldfischer 法により検索されたが、それは菌糸、分生子および厚膜胞子の細胞のすべてにおいて検出されなかった。

謝 辞

稿を終るに当り、御指導いただきました福代良一名誉教授、御校閱いただきました広根孝衛教授、および御助言いただきました金沢医科大学金原武司助教授に深甚の謝意を表します。また技術的援助いただきました当教室の呉座久治技官に謝意を表します。

本論文の要旨は第 25 回日本医真菌学会総会（昭和 56 年 10 月 30・31 日、於東京）において発表した。

文 献

- 1) 松尾卓見：生活環境をとりまくフザリウム菌—とくに植物病原菌とヒト真菌症病原菌の関係—。真菌誌, 20, 164 - 170 (1979).
- 2) 石橋康久：本邦における角膜真菌症の原因菌—*Fusarium* による症例の増加—。眼臨医報, 71, 1074 - 1081 (1977).
- 3) 木村亘・三嶋弘：*Fusarium* による角膜真菌症の 1 例。眼臨医報, 72, 153 - 156 (1978).
- 4) 小川武・大石正夫：Pimaricin が著効を呈した *Fusarium* 角膜真菌症。日眼紀, 29, 1793 - 1797 (1978).
- 5) Rush - Munro, F. M., Black, H. & Dingley, J. M.: Onychomycosis caused by *Fusarium oxysporum*. Australas. J. Dermatol., 12, 18 - 29 (1971).
- 6) DiSalvo, A. F. & Fickling, A. M.: A case of nondermatophytic toe onychomycosis caused by *Fusarium oxysporum*. Arch. Dermatol., 116, 699 - 700 (1980).
- 7) Peterson, J. E. & Baker, T. J.: An isolate of *Fusarium roseum* from human burns. Mycologia, 51, 453 - 456 (1959).
- 8) Wheeler, M. S., McGinnis, M. R., Schell, W. A. & Walker, D. H.: *Fusarium* infection in burned patients. Am. J. Clin. Pathol., 75, 304 - 311 (1981).
- 9) English, M. P., Smith, R. J. & Harman, R. M.: The fungal flora of ulcerated legs. Br. J. Dermatol., 84, 567 - 581 (1971).

- 10) Seligman, A. M., Karnovsky, M. J., Wasserkrug, H. L. & Hanker, J. S.: Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB). *J. Cell Biol.*, **38**, 1 - 14 (1968).
- 11) Graham, R. C. Jr. & Karnovsky, M. J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 291 - 302 (1966).
- 12) Novikoff, A. B. & Goldfischer, S.: Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. *J. Histochem. Cytochem.*, **17**, 675 - 680 (1969).
- 13) Wergin, W. P.: Ultrastructural comparison of microbodies in pathogenic and saprophytic hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology*, **62**, 1045 - 1051 (1972).
- 14) Wergin, W. P.: Development of Woronin bodies from microbodies in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Protoplasma*, **76**, 249 - 260 (1973).
- 15) 田守昌樹: *Hormodendrum dermatitidis* の微細構造について—電子顕微鏡的研究—. *日皮会誌*, **80**, 157 - 180 (1970).
- 16) Luft, J. H.: Permanganate - A new fixative for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **2**, 799 - 802 (1956).
- 17) Burstone, M. S.: Histochemical demonstration of cytochrome oxidase with new amine reagents. *J. Histochem. Cytochem.*, **8**, 63 - 70 (1960).
- 18) Avers, C. J., Pfeffer, C. R. & Rancourt, M. W.: Acriflavine induction of different kinds of "petite" mitochondrial populations in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **90**, 481 - 494 (1965).
- 19) 野口義典: 二, 三皮膚真菌の微細構造と機能. *真菌誌*, **7**, 3 - 13 (1966).
- 20) 石原和之: *Microsporium gypseum* の微細構造と機能—電顕組織化学並びに電顕オートラジオグラフによる観察—. *日皮会誌*, **78**, 1027 - 1053 (1968).
- 21) 大槻典男: 真菌細胞の電顕的細胞化学的研究—*Aspergillus niger* における酸化還元酵素群の活性部位—. *真菌誌*, **16**, 135 - 147 (1975).
- 22) De Nollin, S., Thoné, F. & Borgers, M.: Enzyme cytochemistry of *Candida albicans*. *J. Histochem. Cytochem.*, **23**, 758 - 765 (1975).
- 23) 佐野勉: 真菌細胞の電顕的細胞化学的研究—*Trichophyton rubrum* における酸化還元酵素の活性部位並びに *Aspergillus niger* におけるフォスファターゼの活性部位について—. *真菌誌*, **20**, 1 - 9 (1979).
- 24) Avers, C. J.: Distribution of cytochrome *c* peroxidase activity in wild - type and petite cells of bakers' yeast grown aerobically and anaerobically. *J. Bacteriol.*, **94**, 1225 - 1235 (1967).
- 25) Yamanaka, T.: A cytochrome *c* peroxidase isolated from *Thiobacillus novellus*. *Biochim. Biophys. Acta*, **275**, 74 - 82 (1972).
- 26) Todd, M. M. & Vigil, E. L.: Cytochemical localization of peroxidase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Histochem. Cytochem.*, **20**, 344 - 349 (1972).
- 27) Hirai, K.-I.: Distribution of peroxidase activity in *Tetrahymena pyriformis* mitochondria. *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 189 - 202 (1974).
- 28) Hoffmann, H. P., Szabo, A. & Avers, C. J.: Cytochemical localization of catalase activity in yeast peroxisomes. *J. Bacteriol.*, **104**, 581 - 584 (1970).
- 29) Osumi, M., Miwa, N., Teranishi, Y., Tanaka, A. & Fukui, S.: Ultrastructure of *Candida* yeasts grown on *n* - alkanes. Appearance of microbodies and its relationship to high catalase activity. *Arch. Microbiol.*, **99**, 181 - 201 (1974).
- 30) Fukui, S., Tanaka, A., Kawamoto, S., Yasuhara, S., Teranishi, Y. & Osumi, M.: Ultrastructure of methanol - utilizing yeast cells: Appearance of microbodies in relation to high catalase activity. *J. Bacteriol.*, **123**, 317 - 328 (1975).
- 31) Powell, M. J.: Ultrastructural cytochemistry of the diaminobenzidine reaction in the aquatic fungus *Entophlyctis variabilis*. *Arch. Microbiol.*, **114**, 123 - 136 (1977).
- 32) Maxwell, D. P., Maxwell, M. D., Hänsler, G., Armentrout, V. N., Murray, G. M. & Hoch, H. C.: Microbodies and glyoxylate - cycle enzyme activities in filamentous fungi. *Planta*, **124**, 109 - 123 (1975).

Figure legends

Fig. 1. Colony of *Fusarium oxysporum* on potato - dextrose agar for one month at room temperature, showing a fluffy surface and violet pigmentation.

- Fig. 2. Light micrograph of the mycelia of *F. oxysporum* incubated in the medium of Seligman et al. for 30 minutes at 37°C. Cytochrome oxidase reaction - positive granules can be seen in the mycelial cells. $\times 1,200$.
- Fig. 3. Light micrograph of the mycelia of *F. oxysporum* incubated in the medium of Seligman et al. without diaminobenzidine for 30 minutes at 37°C (control). No reaction - positive granules are seen in the mycelial cells. $\times 1,200$.
- Fig. 4. Light micrograph of the microconidia of *F. oxysporum* treated with the same procedure as in Fig. 2 for 30 minutes at 37°C. Cytochrome oxidase reaction - positive granules are visible in the microconidial cells. $\times 1,200$.
- Fig. 5. Light micrograph of the chlamydospore of *F. oxysporum* treated with the same procedure as in Fig. 2. Cytochrome oxidase reaction - positive granules are seen in the cell. $\times 1,200$.
- Fig. 6. Light micrograph of the mycelia of *F. oxysporum* incubated in the Graham and Karnovsky medium for 30 minutes at 37°C. Peroxidase reaction - positive granules can be seen in the cells. $\times 1,200$.
- Fig. 7. Light micrograph of the macroconidium of *F. oxysporum* treated with the same procedure as in Fig. 6. Peroxidase reaction - positive granules are visible in the cell. $\times 1,200$.
- Fig. 8. Electron micrograph of the mycelial cell of *F. oxysporum* incubated in the medium of Seligman et al. for 30 minutes at 37°C. The cytochrome oxidase reaction product is present in the intracristal spaces and, to a lesser degree, in the outer compartments of mitochondria (M). N: nucleus, ER: endoplasmic reticulum, CW: cell wall, OC: outer coating. $\times 38,000$.
- Fig. 9. Electron micrograph of the microconidial cell of *F. oxysporum* treated with the same procedure as in Fig. 8. The cytochrome oxidase reaction product is seen to be localized in mitochondria (M). No reaction product is seen in the endoplasmic reticulum (ER) and plasma membrane (P). N: nucleus, L: lipid droplet. $\times 26,000$.
- Fig. 10. Electron micrograph of the chlamydospore of *F. oxysporum* treated with the same procedure as in Fig. 8. The cell contains large lipid droplets (L) in the cytoplasm. N: nucleus, M: mitochondria. $\times 14,000$.
- Fig. 11. High magnification of a portion of Fig. 10, showing the localization of cytochrome oxidase reaction product in mitochondria. N: nucleus, L: lipid droplet. $\times 32,000$.
- Fig. 12. Electron micrograph of the mycelial cell of *F. oxysporum* incubated in the Graham and Karnovsky medium for 30 minutes at 37°C. The peroxidase reaction product is seen to be localized in mitochondria (M). N: nucleus, V: vacuole. $\times 38,000$.
- Fig. 13. Electron micrograph of a transverse section of the mycelial cell of *F. oxysporum* treated with the same procedure as in Fig. 12, showing the localization of peroxidase reaction product in mitochondria (M). N: nucleus, ER: endoplasmic reticulum, P: plasma membrane. $\times 46,000$.
- Fig. 14. Electron micrograph of the conidium (probably microconidium) of *F. oxysporum* treated with the same procedure as in Fig. 12. The cell contains a number of large lipid droplets (L) in the cytoplasm. N: nucleus, M: mitochondria. $\times 15,000$.
- Fig. 15. High magnification of a portion of Fig. 14, showing the localization of peroxidase reaction product in mitochondria (M). ER: endoplasmic reticulum, L: lipid droplet. $\times 46,000$.
- Fig. 16. Electron micrograph of the chlamydospore of *F. oxysporum* treated with the same procedure as in Fig. 12. The cell contains a number of large lipid droplets (L) in the cytoplasm. N: nucleus, M: mitochondria, ER: endoplasmic reticulum. $\times 15,000$.
- Fig. 17. High magnification of a portion of Fig. 16, showing the localization of peroxidase activity in mitochondria (M). N: nucleus, ER: endoplasmic reticulum. $\times 31,000$.
- Fig. 18. Electron micrograph of the mycelial cell of *F. oxysporum* incubated in the Novikoff and Goldfischer medium for 30 minutes at 37°C. A round body (arrow) resembling a peroxisome shows no positive catalase reaction. The deposition of reaction product in mitochondrial cristae is due to cytochrome *c* peroxidase. M: mitochondria. $\times 46,000$.

Ultrastructural Localization of Oxidoreductase Activities in *Fusarium oxysporum* Harukazu Matsumura, Department of Dermatology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Jusen Med. Soc., **91**, 300–313 (1982)

Key words: *Fusarium oxysporum*, cytochrome oxidase, cytochrome *c* peroxidase, catalase

Abstract

Oxidoreductase activities in *Fusarium oxysporum* were studied by electron microscope cytochemical techniques using diaminobenzidine (DAB) as substrate. DAB reaction product of cytochrome oxidase, demonstrated by the procedure of Seligman et al. (J. Cell Biol., 38, 1–14, 1968), was localized in the intracristal spaces and outer compartments of mitochondria in the cells of mycelia, conidia and chlamydospores. The reaction was inhibited when cyanide or azide was present. DAB reaction product of cytochrome *c* peroxidase, demonstrated by the Graham and Karnovsky procedure (J. Histochem. Cytochem., 14, 291–302, 1966) and Novikoff and Goldfischer procedure (J. Histochem. Cytochem., 17, 675–680, 1969), was observed only in the intracristal spaces of mitochondria in all of the fungus cells. The reaction was inhibited by the presence of cyanide or azide, but not affected by aminotriazole. DAB reaction product of catalase, investigated by the Novikoff and Goldfischer procedure, was not present in the microbodies resembling peroxisomes in ultrastructure.













