



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	紅藻ツルシラモ <i>Gracilaria chorda</i> Holmes (Gracilariaceae, Rhodophyta) の再生に関する研究
Author(s)	村岡, 大祐
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産学)
Dissertation Number	甲第4482号
Issue Date	1998-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3137198
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51481
Type	doctoral thesis
File Information	000000322388.pdf



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称	博士（水産学）	氏 名	村岡 大祐
学 位 論 文 題 名			
紅藻ツルシラモ <i>Gracilaria chorda</i> Holmes (Gracilariaceae, Rhodophyta) の再生に関する研究			
再生とは個体の一部が失われた際に、それに該当する部分が復元される現象をいい、単細胞・多細胞生物を問わず広く生物界に認められる修復現象である。 紅藻オゴノリ属植物 (<i>Gracilaria</i>) は熱帯から温帯に広く分布する海藻で、強い再生力を持つことが知られている。藻体の細胞間には寒天成分のアガロースを大量に含んでいるため、寒天原藻としての需要が高く、現在では世界の寒天原藻の約 60% を担っている。この需要に伴い世界各地で様々な方法による増養殖が行われているが、その中でもロープに切断した藻体を挟み込む方法、あるいは藻体片を地まきする方法は、本属植物の強い再生力を利用した最も効率が良い増養殖の手段として広く採用されている。 本研究ではツルシラモ (<i>Gracilaria chorda</i>) の藻体片を培養によって再生させ、その形態形成の過程を詳細に観察した。さらに、基質への接触、再生枝の切断、水温、光周期などが再生におよぼす影響について実験し、本属植物の繁殖、および増養殖に重要な役割を果たす再生現象について以下の点を明らかにした。 培養実験に先立ち天然藻体を観察した結果、傷害を受けた部位には傷害組織（傷害を受けた部位を覆う、皮層状の組織）と再生枝（傷害部位に形成される新しい枝）の形成が頻繁に起こっていることを確認した。 本種の主軸、および第一側枝から切り取った藻体片（円柱状、直径約 1mm、長さ 5mm）を培養した結果、傷害組織は先端側（藻体片の両切断面のうち、元の藻体の先端側）と付着器側（両切断面のうち、元の藻体の付着器側）の両切断面に形成された。先端側切断面の傷害組織は 3-4 層の細胞から成る皮層状の形態を示したのに対し、			

付着器側切断面の傷害組織は、縦方向の分裂により藻体片内で細胞塊にまで発達した。しかし、再生枝（平均 2.5 本）は先端側切断面の縁辺部からのみ形成され、付着器側切断面から生じることはなかった。以上の観察から、本種の藻体片の先端側と付着器側切断面の間には、形態形成上明瞭な極性が存在することを明らかにした。さらに、藻体から皮層組織だけを方形に切り取って培養した場合でも、先端側の一辺からのみ再生枝を生じ、極性がなお維持されていることを示した。

先端側、または付着器側切断面を常に基質に接触させた状態で培養した結果、付着器側切断面からのみ仮根様組織が発達して基質に着生した。さらに、その仮根様組織からは直立体が発出した。一方、先端側切断面では、生じた再生枝の伸長が抑制されたのみで、接触刺激に対する形態形成の反応でも両切断面に極性が存在することを示した。

藻体片の培養で生じた再生枝をすべて切断した場合、藻体片本体の先端側切断面から新たな再生枝を形成した。しかし、再生枝を 1-2 本残した場合、新たな再生枝を生じることはなく、本種の再生枝形成が残された再生枝によるアピカルドミナンス（頂芽優勢）の支配を受けていることを示唆した。

長さ 1-30mm の藻体片を培養し、再生に伴う生物量の変動を測定した結果、総生物量（藻体片、再生枝、再生側枝を合わせた重量）の増加は藻体片が長い場合ほど大きかった。特に 30mm の藻体片では再生枝の他に藻体片の側面から多数の再生側枝を生じ、再生枝形成に次ぐ二次的な生長として生物量の増加に寄与していた。一方、藻体片の単位重量あたりの増加率は藻体片が短いほど大きかった。以上の結果は、本種を増養殖する際に、藻体片の大きさを再生側枝を形成する長さにすることが種苗として有効であることを示した。

藻体の様々な部位から切り取った藻体片を培養したところ、主軸、側枝ともに下部由来の藻体片で総生物量の増加率が大きく、上部は

ど低かった。一方、藻体片本体の増加率は逆に上部由来の藻体片で大きく、中央部、下部のものでは小さい値を示した。この差異は、各々の藻体片を構成する細胞の細胞年齢を含めた生理状態の差によるものと考ええる。

藻体片を温度、および光周期条件を変えて培養した場合、藻体片の状態（長さ、藻体の部位など）に関わりなく、温度では 20℃で、光周期では 20L4D で総生物量の最大増加率を示した。

傷害組織の形成過程を透過型電子顕微鏡で観察し、以下の結果を得た。藻体に傷害を与えると直接切断された細胞からは核と細胞質が流失したが、それに直接接する細胞（隣接細胞）は正常な状態に維持されていた。切断後 1-2 日以内に隣接細胞の核と細胞質は切断面側に移動し、さらに隣接細胞のゴルジ体は増加すると同時に、多数の分泌小胞を細胞膜と細胞壁の間に放出した。隣接細胞には同時に多数の多胞体や分裂中の葉緑体も見られた。切断 2 日目、隣接細胞で最初の細胞分裂が起こった。分裂は周囲に細胞質を伴った分裂溝が細胞の両側から求心的に伸長することによって進み、複数核のうち一個を取り込んで新細胞を形成した。本種の細胞は多核であるため、新細胞の形成には核分裂を伴わず、一個の隣接細胞が同時に複数の新細胞を形成した。新細胞はさらに分裂を繰り返し、切断 24 日以内に切断面を覆う傷害組織を形成した。本種の新細胞形成、およびその後の傷害組織の形成に至るまでの時間は他種と較べて早かった。これは本種が新細胞形成の際に核分裂を必要としない多核細胞で構成されていることによるものと考ええる。また、切断面に露出した全ての隣接細胞でこの様な新細胞が形成されたことから、分裂能力を持たないと考えられてきた体の中心部を構成する髓層細胞を含めて、全ての細胞が傷害という環境変化に反応して新細胞を形成する潜在能力を有することを確認した。傷害組織を完成した後、先端側切断面からは再生枝を、付着器側切断面からは仮根様組織を形成した。

主論文

紅藻ツルシラモ *Gracilaria chorda* Holmes
(Gracilariaceae, Rhodophyta) の
再生に関する研究

村岡 大祐

平成十年

紅藻ツルシラモ *Gracilaria chorda* Holmes (Gracilariaceae, Rhodophyta)

の再生に関する研究

ツルシラモ断片の環境による再生現象

1. 材料と処理 1

2. 結果と考察 10

一重の断片を基とした断片の再生現象の形成と再生

1. 材料と処理 1

2. 結果と考察 10

再生現象を基とした断片の再生

1. 材料と処理 1

2. 結果と考察 10

断片の再生現象を基とした断片の再生

1. 材料と処理 1

2. 結果と考察 10

北海道大学大学院水産学研究科

村岡大祐

目 次

I	緒 言	1
II	ツルシラモの天然藻体に見られる再生現象	
1	材料と方法	4
2	結果と考察	4
III	ツルシラモ藻体片の培養による再生現象	
1	材料と方法	8
2	結果と考察	10
IV	一定の条件を与えた場合の傷害組織の形成と再生	
1	切断面を基質に接触させた場合の再生	16
a	材料と方法	17
b	結 果	19
2	再生枝を切断した後の再生	20
a	材料と方法	20
b	結 果	20
3	皮層組織培養による再生	22
a	材料と方法	22
b	結 果	22
4	考 察	24
V	ツルシラモの再生に伴う生物量の変動	

1	藻体片の長さによる再生量の変動	30
a	材料と方法	31
b	結 果	31
2	藻体の部位による藻体片の再生量の変動	35
a	材料と方法	35
b	結 果	36
3	水温の違いによる再生量の変動	40
a	材料と方法	40
b	結 果	40
4	光周期の違いによる再生量の変動	44
a	材料と方法	45
b	結 果	45
5	考 察	48

VI 傷害組織の形成とそれに伴う微細構造の変化

1	細胞分裂に伴う微細構造の変化	54
a	材料と方法	55
b	結 果	55
2	新細胞の核数	61
a	材料と方法	62
b	結 果	62
3	考 察	62

VII 総合考察

69

VIII	摘 要	77
------	-----	----

IX	謝 辞	80
----	-----	----

X	参考文献	81
---	------	----

XI	図 版	
----	-----	--

本論文で使用した語句の説明

藻体片 (fragment) : 藻体から一定の長さに切り取った組織片。

頂端藻体片 (apical fragment) : 藻体の頂端部を含む藻体片。

頂端部 (apex) : 藻体の主軸と側枝部の最も先の部位。ツルシラモの場合はこの部位に分裂組織が存在する。

先端側切断面 (distal cut surface) : 切り取った藻体片 (円柱状) の両切断面のうち、元の藻体の先端側 (頂端部) に近い切断面。

付着器側切断面 (proximal cut surface) : 切り取った藻体片 (円柱状) の両切断面のうち、元の藻体の付着器側に近い切断面。

再生 (regeneration) : 失われた個体の一部を復元する現象。本論文では傷害組織、再生枝、再生側枝を形成することを指す。

再生枝 (regenerative shoot) : 切断部位に形成される新しい枝。本論文では切断面の皮層部から生じる枝を指す。

再生側枝 (regenerative lateral shoot) : 藻体片の側面に形成される新しい枝。

皮層細胞 (cortical cell) : 隣接する細胞間に第二次壁孔連絡を持た

ない細胞。体の皮層 (cortex) を構成する小形の細胞。

髄層細胞 (medullary cell) : 隣接する細胞間に第二次壁孔連絡を持つ細胞。体の髄層 (medulla) を構成する大形の細胞。

隣接細胞 (inside cell) : 直接切断された細胞に隣接している無傷の細胞。

新細胞 (new cell) : 隣接細胞が切断に反応し、細胞分裂によって形成する細胞。傷害組織の基になる。

傷害組織 (wound tissue) : 傷害を受けた部位を覆うようにして発達する、小形の細胞からなる組織。多くの場合皮層状を呈する。

仮根様組織 (rhizoid-like tissue) : 付着器側切断面から発達し、藻体片を支える付着器。

横切片 (cross section) : 藻体軸に対して垂直の方向に切断した顕微鏡観察用切片。

縦切片 (longitudinal section) : 藻体軸に対して縦の方向に切断した顕微鏡観察用切片。

原形質連絡 (plasmodesm) : 2 細胞間を連絡している、細胞膜に囲まれた細い細胞質の構造。紅藻の壁孔連絡に相当する。

壁孔連絡 (pit connection) : 細胞間の隔壁にある小孔状の連絡構造。
通常隔壁の中心部にある。その構造に種々の型があり、紅藻の目
(もく) の指標になっている。

Conjunct cell : 隣接する 2 細胞間に壁孔連絡を形成する際に、一方
の細胞が造る単核の小形細胞。これが他方の細胞と融合し、第二
次壁孔連絡を形成する。

Plug core : 壁孔連絡を構成する構造の一つで、壁孔連絡の中心部に
位置する。sulfate と carboxyl 群を含む acid polysaccharide-protein
から成り、能動輸送を担うと言われている。

Cap membrane : plug core を包む膜状構造。ツルシラモの plug core は
一枚の cap membrane で包まれている。

極性 (polarity) : 細胞・細胞集団・組織または個体の各部分相互の
相対的位置関係で、形態的または生理的特性を示すこと。本論文
では切断などに反応して形成された組織の構造や機能に方向性が
認められる場合に用いた。

I 緒 言

再生とは個体の一部が何らかの理由で失われた際に、それに該当する部分が復元される現象をいい、単細胞・多細胞生物を問わず広く生物界に認められる修復現象である。植物についてみると、カサノリ *Acetabularia ryukyuensis* やハネモ *Bryopsis plumosa* の葉状体、ヒトヨタケ *Coprinus atramentarius* など菌類の子実体、維管束植物の茎端・根端の分裂組織や形成層は傷を受けるとその周辺の細胞が増殖し、失われた組織とほとんど同じ組織を造り出す。高等植物では失った器官と同じものを傷害を受けた部位にではなく、別の部位に再生することが多い。このように植物は動物に較べて個体の統一性が弱いため、茎や葉から新しい芽と根を容易に形成し、完全な体制に戻ることができる。

この修復現象は海藻でも知られている。Doty (1987) は天然の紅藻キリンサイ属 *Eucheuma alvarezii* var. *tambalang* (= *Kappaphycus alvarezii* var. *tambalang*) の葉体で、傷害部位の表面を覆うように新しい皮層が形成され、そこに枝が再生することを観察した。また、Robaina ら (1992) は紅藻ソゾ属 (*Laurencia*) でも切断面から枝が再生することを海中での再生実験で確認し、更に藻体片を室内培養すると枝、およびカルスが再生することを明らかにした。Hales and Fletcher (1992) は褐藻タマハハキモク *Sargassum muticum* の生殖器床が再生し、正常な卵と精子を形成する能力を有することから、この現象は雌雄同株である本種が自家受精によって生育域を拡大することに寄与しているものと推察している。

紅藻オゴノリ属 (*Gracilaria*) は熱帯から温帯に広く分布する海藻

であり、強い再生力を持つことが知られている。藻体の細胞間には寒天の原料であるアガロースを大量に含んでいるため、寒天原藻としての需要が大きく、現在では世界の寒天生産の約 60% を担っている (Nelson et al., 1983; McLachlan, 1985)。この需要に伴い世界各地で増養殖が盛んになり、これまで生育していない海域に藻体を移植する方法や、ロープに藻体片をくくりつけて再生させる方法が一般的に採用されている。中でもロープに切断した藻体片をはさみ込む方法は、本属植物の強い再生力を利用した最も効率が良い養殖手段として、ビルマ、インド、ブラジル、アメリカ、ナミビア、西インド諸島で普及している (Critchley, 1993)。日本では天然の藻体を採取するにとどまり、現在商業的な増養殖は行われていない。しかし、養殖方法は古くから検討されている。須藤 (1965) は本州南部太平洋岸の多少波のある所では、ツルシラモ *Gracilaria chorda* が他の種より生長が早く、寒天としてのゼリー強度も高いので養殖に有利であると指摘している。実際ツルシラモの再生力は非常に強く、有明海の熊本沿岸では毎年四分孢子体が体再生による栄養繁殖をくり返し、1989 年から 1992 年までの 4 年間にわたり大発生したという報告がある (右田ら, 1993)。

このようにツルシラモを含むオゴノリ属の繁殖、および増養殖には再生力が重要な意味を持っているが、この再生現象に伴う細胞、組織構造の変化に関する研究はほとんどない。本研究ではツルシラモの藻体の一部を切り取り、これを人工培養することによって再生を誘発させ、形態形成の過程を詳細に観察すると共に、諸要因が再生におよぼす影響について実験した。さらに、傷害組織を形成する際の細胞分裂とそれに伴う細胞内小器官 (オルガネラ) の挙動、お

II ツルシラモの天然藻体に見られる再生現象

本研究ではツルシラモの野生体に見られる再生の外部形態と内部形態を詳細に観察した。

1 材料と方法

実験に用いたツルシラモは、1993年5月18日、北海道上磯町七重浜の水深約2mの砂泥地から採取した四分孢子体である（本種の生活史については Fig. 1 参照）。十分に生長した藻体について再生部の有無を確認した後、再生部位を藻体から切り離して5%ホルマリン海水で固定し、観察用試料に供した。

内部組織を観察するために凍結ミクロトームで縦切片（厚さ20 μ m）を作成し、これを1%アニリンブルーグリセリン溶液で染色後、染色を強化するために1N塩酸を添加した。

2 結果と考察

天然で傷害を受けた部位からは、藻体の長さや太さにかかわらず通常2~6本の再生枝を形成していた（Fig. 2, Plate 1-1）。この再生枝は常に切断面の皮層部から形成されており、外部形態は藻体の側面から出ている側枝と同じであった。また、切断面の髓層部は藻体と同じ色素を持った組織で覆われていた（Plate 1-2）。

切片で組織を観察した結果、切断面には切断によって露出した髓層細胞を覆うように、皮層組織に似た組織が発達していた（Plate 1-3）。この組織は3-4層の細胞層からなり、皮層細胞と同じくアニリンブルーで濃染した。

以上の結果から、天然で傷害を受けたツルシラモは切断によって露出した部分を覆うように皮層状の傷害組織を発達させ、そこ

から再生枝を形成することが明らかになった。また、傷害部位から生じている再生枝の外形、および内部組織は通常の枝と同じであり、その後の伸長によって藻体の増量に寄与しているものと考ええる。ツルシラモに見られるこのような再生現象は、他のオゴノリ属でも頻繁に起こっている。例えばオゴノリ *Gracilaria verrucosa* は 20-50cm に生長し、潮間帯上部に生育するため傷害を受けやすく、再生枝を付けている藻体が多い。また、扁平葉状のカバノリ *G. textorii* は縁辺部から突起状の再生枝を出すため (Plate 2), 別種のような形態を呈する藻体も見られる。

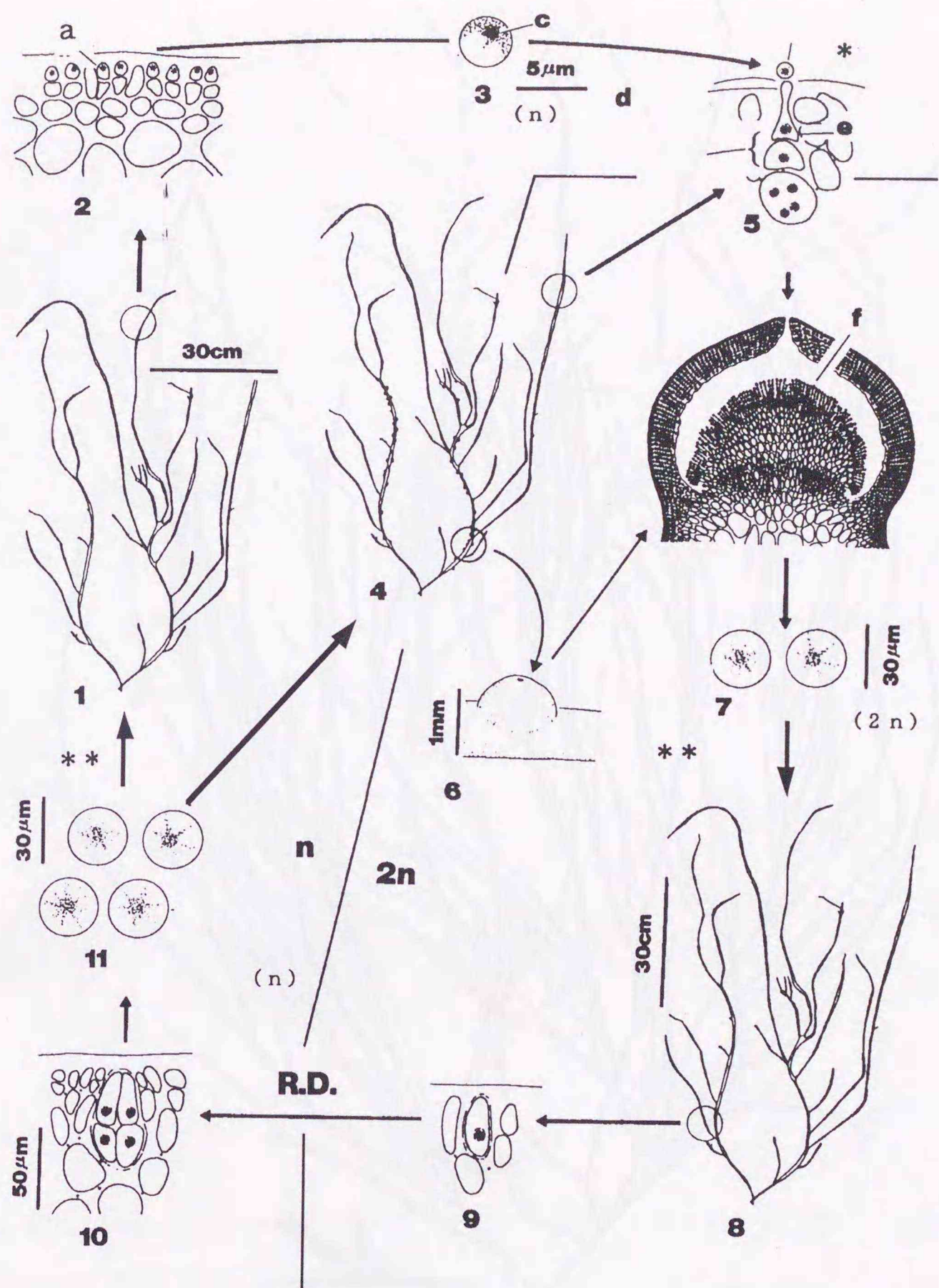


Fig. 1. Life history of *Gracilaria chorda*.

1, male gametophyte. 2, spermatangial sorus.

3, spermatium. 4, female gametophyte. 5, carpogonial

branch. 6, cystocarp. 7, carpospore. 8, tetrasporophyte.

9, tetrasporangial initial. 10, tetrasporangium.

11, tetraspore. a, spermatangium. c, nucleus.

d, trichogyne. e, carpegonium. f, carposporangium.

*fertilization. **immediate discal type.

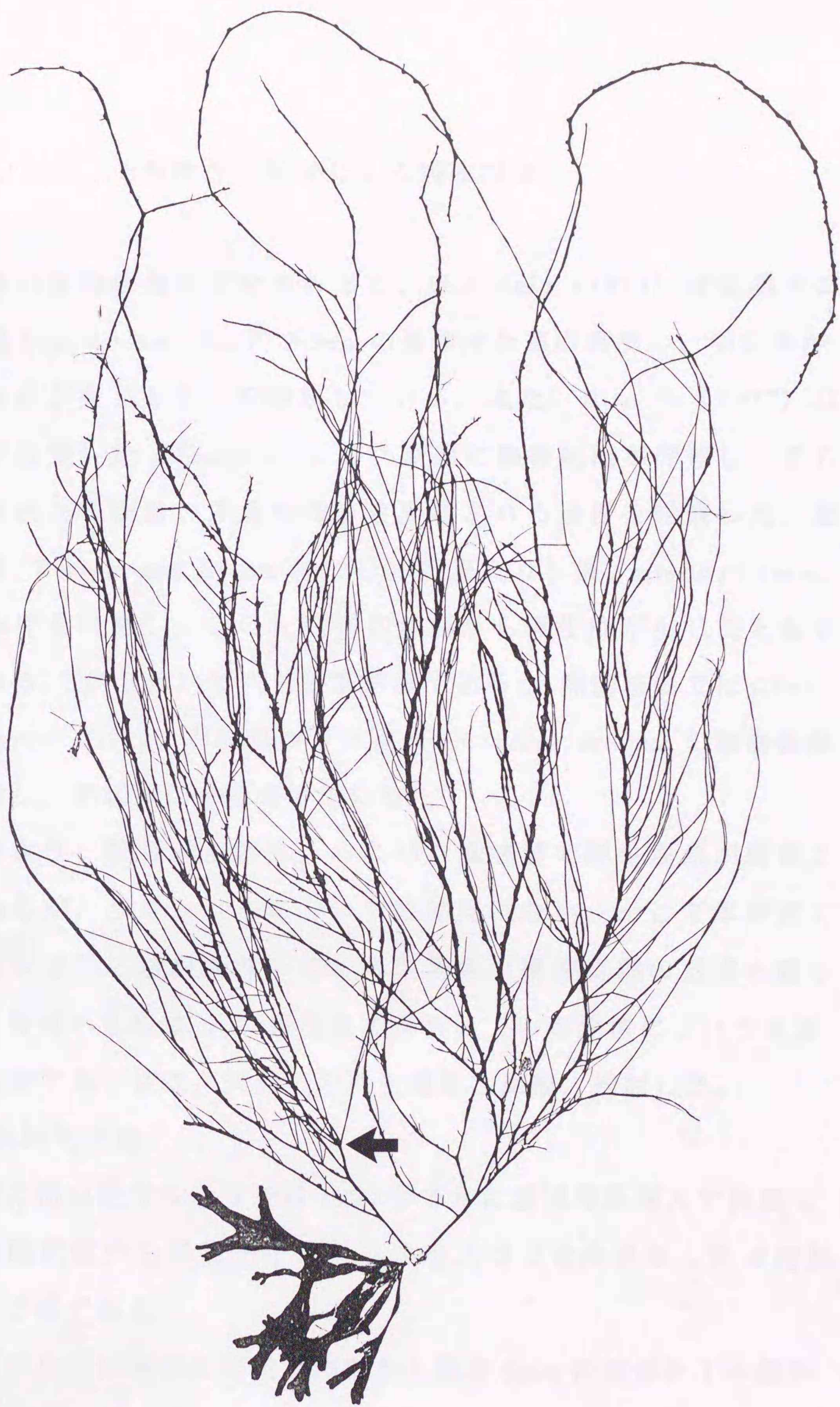


Fig. 2. Specimen of *Gracilaria chorda*. Regenerative branches (arrow) occur at wounded portion. x0.6.

III ツルシラモ藻体片の培養による再生現象

海藻の組織培養の歴史をみると、Goldstein (1973) は紅藻オゴノリ属 *Gracilaria debilis* の 2-3 cm の藻体片を室内培養し、切断面から再生枝が生じたことを報告している。また、Bird ら (1977) は室内で培養した *Gracilaria* sp. の切断面に傷害組織が発達し、さらに再生枝が切断面の皮層組織から形成される過程を観察した。最近では、Perrone and Cecere (1997) が紅藻ミリン属 *Solieria filiformis* の藻体片を培養し、この先端側切断面から再生枝が生じたと報告している。これらはいずれも有菌培養であるが、無菌培養では Chen and Taylor (1978) が紅藻ツノマタ属 *Chondrus crispus* の髄層組織を培養し、葉状体にまで育てている。

このように数種の藻体片、および組織培養で再生現象が観察されているが、ツルシラモについての知見はない。そこで本研究ではツルシラモの培養条件下での再生現象（傷害組織の形成と新しい枝の形成）を観察し、現在まで得られている他種についての知見と比較すると共に、天然での再生現象と比較、検討した。

1 材料と方法

実験に用いたツルシラモは 1992 年 5 月に鹿児島県喜入で採集した雌性配偶体から果胞子を採り、フラスコで室内培養した未成熟四分孢子体である。

実験のために藻体の側枝中央部から長さ 5 mm の藻体片 150 個体をメスで切り取った。切り取った藻体片の上下両切断面のうち、元の藻体の先端側の切断面を先端側切断面、付着器側の切断面を付着器側切断面と呼ぶ (Fig. 3)。

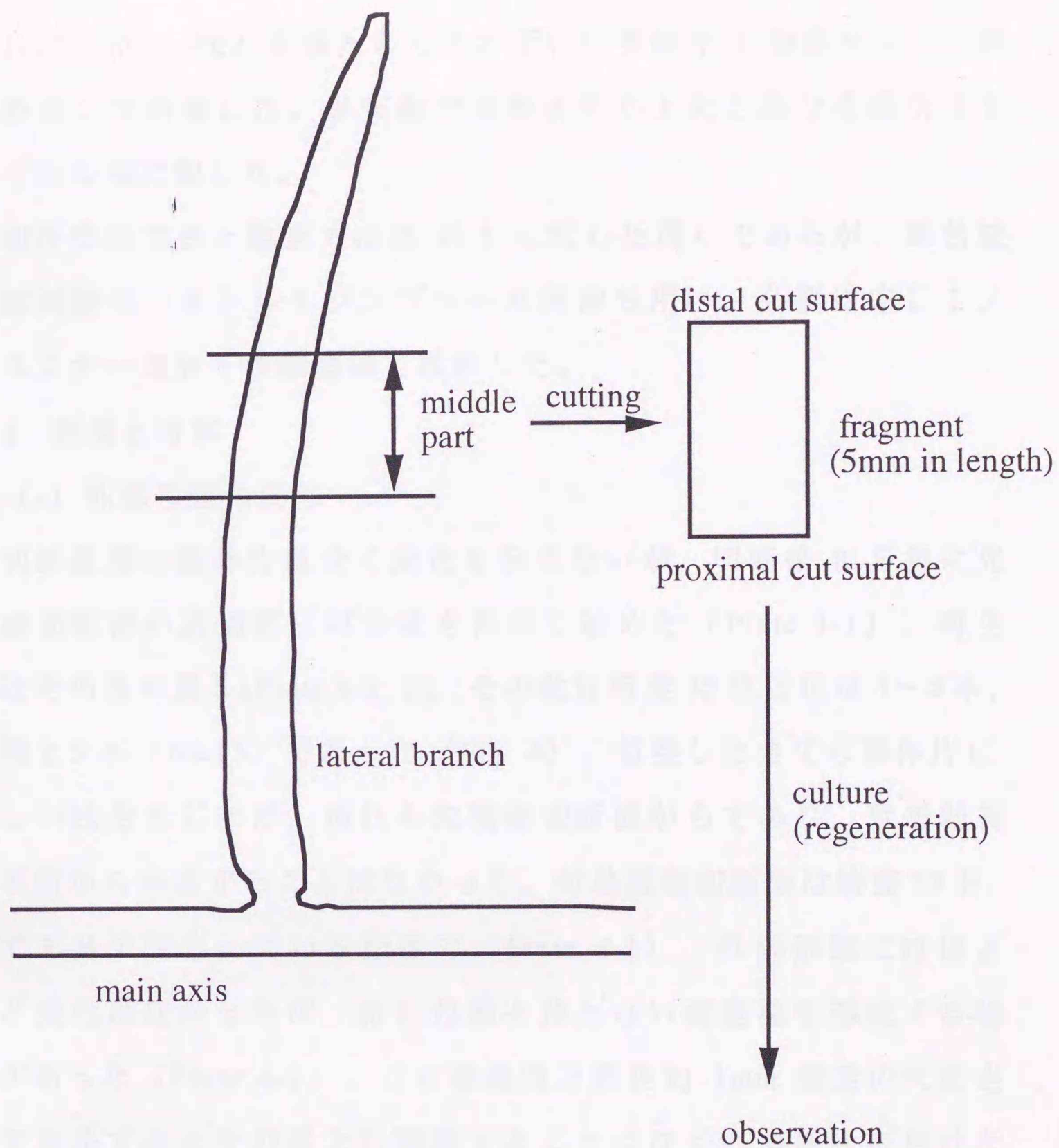


Fig. 3. Diagram showing fragments cut off from a lateral branch of *Gracilaria chorda* for regenerative experiment.

培養は水温 18℃，照度 60 μ E/m²/s，光周期 14L10D の条件下で行った。培養液には Provasoli (1968) の栄養強化海水（以下 PES）を用い，5 日毎に換水した。培養容器には 50ml のガラス瓶を用い，

これに上述の PES を満たしてそれぞれに藻体片 1 個体を入れ、横に静置して培養した。各実験で培養条件が上記と異なる場合はそれぞれの項に記した。

切片作成方法と観察方法は II-1 に記した通りであるが、染色液には同時に 1% トルイジンブルー水溶液も用い、必要に応じてノマルスキー微分干渉顕微鏡で観察した。

2 結果と考察

(a) 外部形態の変化

切断直後の藻体片は全く変化を示さないが、切断後 8 日目に先端側切断面の皮層部に再生枝を形成し始めた (Plate 3-1)。再生枝はその後伸長し (Plate 3-2, 3), その数は培養 35 日目には 1~4 本, 平均 2.5 本 (N=15) であった (Fig. 4)。培養した全ての藻体片に新しい枝を生じたが、何れも先端側切断面からであり、付着器側切断面から形成することはなかった。付着器側切断面は培養 35 日目でも多少膨らんでいる程度で (Plate 4-1), 外部形態にはほとんど変化はなかったが、希に色素を持たない細胞塊を形成する場合があった (Plate 4-2)。この細胞塊は直径約 1mm 程度の大きさまで生長するとそれ以上に発達することはなく、藻体片に付けたままで、あるいは切り取って培養しても特定の組織に分化することとはなかった。なお、藻体片本体 (再生枝を含まない元々の藻体片, 以下同じ) はほとんど伸長しなかった。

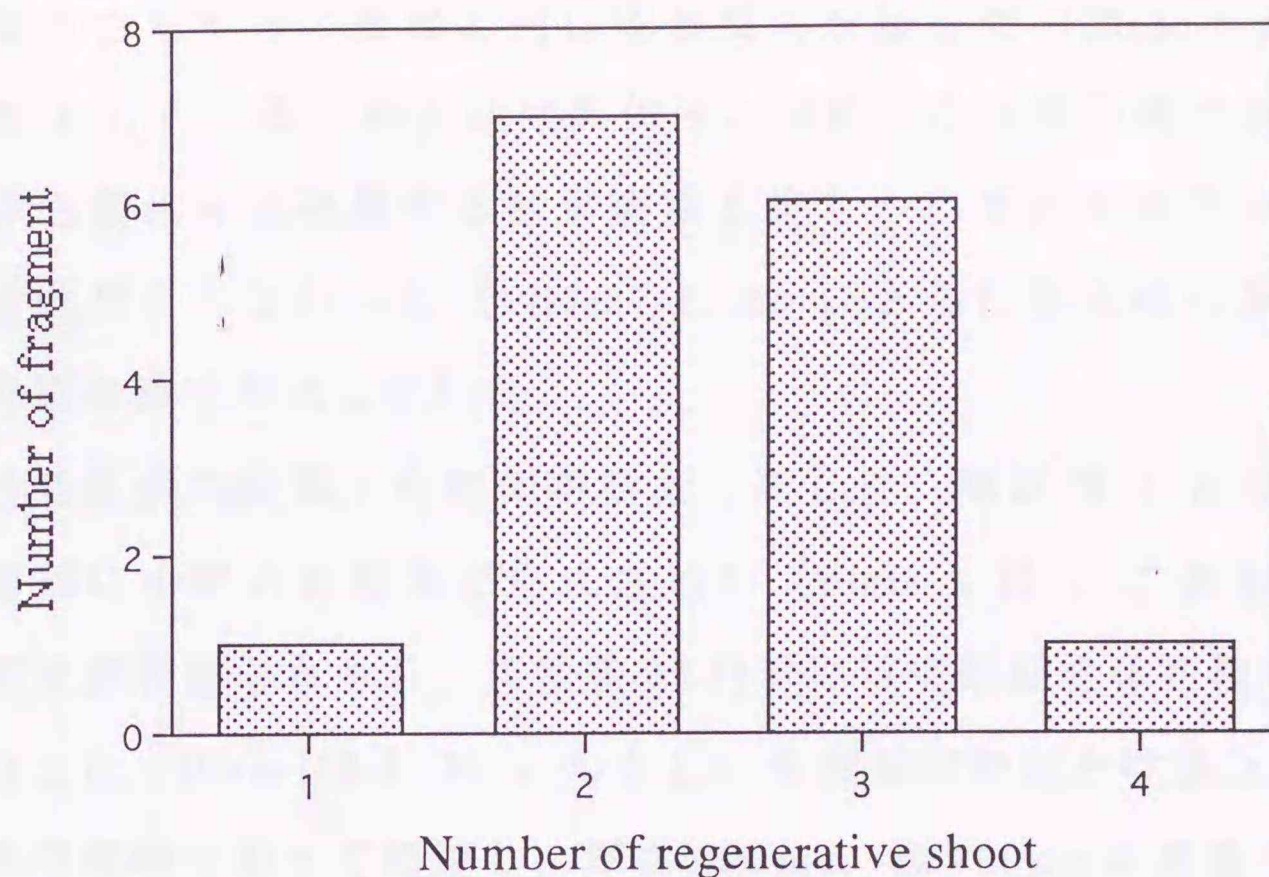


Fig. 4. Number of regenerative shoots issuing from distal cut surface of one fragment in 35 days culture. (N=15)

(b) 内部組織の変化

先端側切断面：切断後 4 日目前後に，小形の新細胞（直径約 $20\mu\text{m}$ ）が切断面の皮層部に形成され始めた（Plate 5-1）。新細胞は切断後 7 日目には髄層部でも認められるようになり（Plate 5-2, 3），切断後 15 日目には切断面全体を覆うまでになった（Plate 6-1）。新細胞による組織は切断後 15 日目前後の形成の初期には 1 層であるが，切断後 24 日目には 3-5 層の傷害組織を形成するまでに発達し，体の皮層組織とほぼ同じ形態を示した（Plate 6-2）。このように形成された傷害組織の最外層細胞は細胞質，および色素に富み，通常の組織の最外層と同じくアニリンブルーで濃染した。さらに，メタクロマジー染色剤であるトルイジンブルーによ

る染色でも本体の皮層と同じ染色反応を呈した (Plate 6-3)。切断後 8 日目以降の再生枝は藻体片と連続する皮層組織で囲まれ、内部も藻体片と連続する髓層細胞を持ち、いずれも境界のような構造は見られなかった (Plate 7-1, 2)。さらに再生枝の頂端部には分裂組織を形成していた。

付着器側切断面：先端側切断面と同じく、切断後 4 日目前後に皮層部に小形の新細胞が形成された (Plate 8-1)。この新細胞はその後髓層部にも生じ、切断後 15 日目には切断面全体を覆うまでになった (Plate 8-2, 3)。しかし、先端側切断面とは異なり、藻体片の縦軸に沿って発達し、厚さ $400\mu\text{m}$ 、幅 $700\mu\text{m}$ の細胞塊を形成した。この細胞塊は色素の少ない細胞で構成され、藻体片の外部に肥大することはなかったが (Plate 9-1, 2)、一般にカルス、もしくはカルス状構造と呼ばれる組織と同じ特徴を示し、最外層の細胞はトルイジンブルーで濃染した。希に藻体片の外側に肉眼で識別できる大きさの、色素を持たない細胞塊を形成する場合もあったが (Plate 10-1)、細胞は縦方向に並んでおり (Plate 10-2, 3)、同じくカルス状構造を示した。

本実験の結果、培養した藻体片は全て再生枝を生じることが分かった。また、先端側と付着器側切断面の間に、組織形成上明瞭に極性が存在することが明らかになった。すなわち、付着器側切断面では藻体片の縦軸に沿った方向に細胞分裂を繰り返して藻体内部に細胞塊を形成し、先端側切断面に生じた組織とは非常に異なった様相を呈した。この極性は従来言われてきたように外部形態形成の際に発現するばかりでなく、組織の内部に形成される傷害組織の形態でも明確に発現した。これまでの海藻の培養による

極性の研究は、いずれも再生枝や仮根様組織など外部形態形成のみを対象にしており、内部の形態形成まで調べることはなかった。したがって、本研究の結果は海藻組織の再生と極性の研究に新たな知見と視点を提供したものである。海藻組織の再生とそれに伴う極性については、Felicini and Perrone (1972) が紅藻 *Petroglossum nicaeense* の藻体片が元の藻体の極性支配を受けることを証明している。また、Perrone-Pesola and Felicini (1981) は紅藻 *Schottera nicaeensis* (= *Petroglossum nicaeense*) の藻体片の先端側と付着器側切断面から、それぞれ異なった形態の再生体が生じたと報告している。今回のツルシラモによる実験でも同じく両切断面で異なる形態形成が起こることを確かめた。しかし、*S. nicaeensis* の付着器側切断面からは円筒形の組織が生じたのに対し、ツルシラモの付着器側切断面では仮根などの外部組織を形成することはほとんどなかった。この違いは両種の付着器を含む体構造の違いに起因するものと考える。*S. nicaeensis* では藻体の側面からも大型の盤状仮根組織を出して基質に付着することが知られており (Felicini and Perrone, 1972)、その際仮根組織を構成する細胞は放射状に素早く分裂する。一方、ツルシラモは孢子からの通常の発生でも小さい盤状の座を形成するのみで、藻体の側面から仮根を形成することはない。このような種特有とみられる仮根組織の形成能力の違いが、付着器側切断面での形態形成の差として現れたものと考ええる。

再生初期の組織を観察した結果、先端側切断面には藻体の皮層組織と非常に似た構造の傷害組織が発達することを確認した。この組織はその構造のみならず、アニリンブルー、およびトルイジ

ンブルーに対する呈色反応も藻体の皮層組織と同じであったため、両者は機能的にも同一であろうと考える。すなわち、本種の藻体片は、本来藻体の内側にあるはずの細胞が切断によって外部環境に曝されるのを防ぐために、切断面に皮層組織を再生させる能力を持つことを明らかにした。海藻のこのような再生能力については幾つかの報告がある。Hales and Fletcher (1992) は褐藻タマハハキモク *Sargassum muticum* の生殖器床の藻体片を培養し、切断面に傷害組織が発達したことを確認した。また、Azanza-Corrales and Dawes (1989) は *Eucheuma alvarezii* var. *tambalang* の葉状部から切り取った藻体片を培養し、21 日以内に藻体片の皮層と連続的な傷害組織が切断面（どちらの切断面か不明）に生じたと報告している。このような傷害組織は常時形成されているもので、天然で傷害を受けた海藻が生存していくために不可欠、かつ普遍的な能力であると推察する。

傷害組織は先端側切断面と同じく付着器側切断面にも形成された。付着器側切断面の外部的膨らみは、内部に細胞塊が形成されたことによる膨圧の結果である。更に、この内部の細胞塊と、付着器側切断面に希に生じた色素を持たない未分化な細胞塊（カルス）とが、共に縦方向に発達するという非常に似た構造を示したことから、両者の形態上の相違にも関わらず機能的に同一であろうと推察する。海藻のカルスについては、Polne-Fuller and Gibor (1987) が緑藻、褐藻、紅藻各種の藻体片を様々な条件で培養し、カルスの形成率を調べている。この実験で用いた紅藻オゴノリ属 *Gracilaria papenfussii* のカルス形成率は、最適条件でも 0.6% という極めて低い値であった。この研究に限らず、一般にカルス、あ

るいはカルス状組織は“藻体の傷害部付近に外部的に形成される未分化な細胞塊”と定義されている。この定義に従うならば、本研究で付着器側切断面に希に形成された未分化な細胞塊をカルス、もしくはカルス状組織と呼ぶことができる。しかし、今回の実験で培養した全ての藻体片で、付着器側切断面の外部に形成された、未分化な細胞塊と同じ構造を持つ細胞塊が内部に形成されたことを考えると、外部観察に基づいたカルスの形成率は真のカルス形成能を示してはいない。本種のように多軸構造を持ち、皮層と髓層に分かれた構造を有する藻体の場合には、真の形成能を見極めるために組織内部に起こる再生組織を合わせて観察することが必要である。

IV 一定の条件を与えた場合の傷害組織の形成と再生

1 切断面を基質に接触させた場合の再生

海藻組織の再生様式は種によって異なる。褐藻タマハハキモク *Sargassum muticum* の生殖器床の切断面からは、生殖器巣を形成するロゼット状の組織を再生した (Hales and Fletcher, 1992)。また、紅藻ミリン属 *Solieria filiformis* では先端側切断面からは主に一本の再生枝が、付着器側切断面からは callus-pad (切断面を覆って生長する、硬く、色素を持った無定形な細胞塊) を再生した (Perrone and Cecere, 1997)。紅藻ムカデノリ属 *Grateloupia filiformis* では藻体片の先端側切断面からは再生枝が、付着器側切断面からはカルスが再生した。さらに、このカルスを藻体片から切り放して培養したところ、完全な藻体を再生した (Yokoya et al., 1993)。紅藻ソゾ属 *Laurencia* sp. の藻体片の培養でも先端側切断面から再生枝を、付着器側切断面からはカルスを形成した。このカルスを単独培養すると枝を形成し、上述の *G. filiformis* と同じ結果を得た (Robaina et al., 1992)。しかし、紅藻 *Schottera nicaeensis* の先端側切断面には再生枝が、付着器側切断面には不定根を再生した (Perrone-Pesola and Felicini, 1981)。このように種により再生の状態が異なっており、特に付着器側切断面での再生に種それぞれの特徴が見られる。ツルシラモでは先端側切断面は常に 1~4 本の再生枝を形成したが、付着器側切断面には極く希に未分化な細胞塊を生じる他は、外部的な器官を形成することとはなかった。しかし、この結果は側枝の中央部から切り取った 5mm の藻体片を一般的な方法で静置培養した結果であり、切断面を基質に接触させるなど、培養条件を変えることにより再生の状態に変化

をもたらすことも考えられる。紅藻ムカデノリ属オオムカデノリ *Grateloupia acuminata* では液体培地中の静置培養で付着器が再生している (Iima et al., 1995)。また、ツルシラモの付着器側切断面の内部に形成された細胞塊も、ある条件下で何らかの組織に分化する可能性もある。そこで本研究ではツルシラモ藻体片の付着器形成と再着生能力の有無を調べるため、切断面を基質に接触させた状態で培養した。

a 材料と方法

実験には主軸、および側枝それぞれの上部、中央部、下部から長さ 8mm の藻体片をそれぞれ 16 個、計 96 個を切り取り、ポリスチレン製 96 穴丸底マイクロプレート (岩城硝子, 特殊表面処理済み) の底に先端側、または付着器側切断面 (各部位毎に 8 個ずつ) を常に接触させた状態で静置培養した (Fig. 5)。また、頂端藻体片 (頂端分裂組織を含む藻体片) も頂端部、または付着器側切断面を接触させて培養した。その他の条件は II-1 に準じた。

光学顕微鏡による観察には、凍結ミクロトームで作成した厚さ 20 μ m の切片、およびスパー樹脂で包埋しウルトラミクロトームで作成した厚さ 1 μ m の切片を用いた。さらに TEM による観察も行ったが、この試料を次のように作製した。藻体片を 3% グルタルアルデヒド, 2% NaCl, 0.1% CaCl₂, 1% 無水カフェインを含む 0.1M カコジル酸緩衝液中で 2 時間固定した。同一緩衝液で洗浄した後, 0.05% フェロシアン化カリウム, および 2% OsO₄ を含む 0.1M カコジル酸緩衝液で後固定し, その後アセトンシリーズで脱水した。QY-1 で置換した後, Spurr 樹脂 (Spurr, 1969) で包埋した。銀または金の切片をフォルムバール支持膜を張った単孔銅グリッドに乗せ, 酢酸

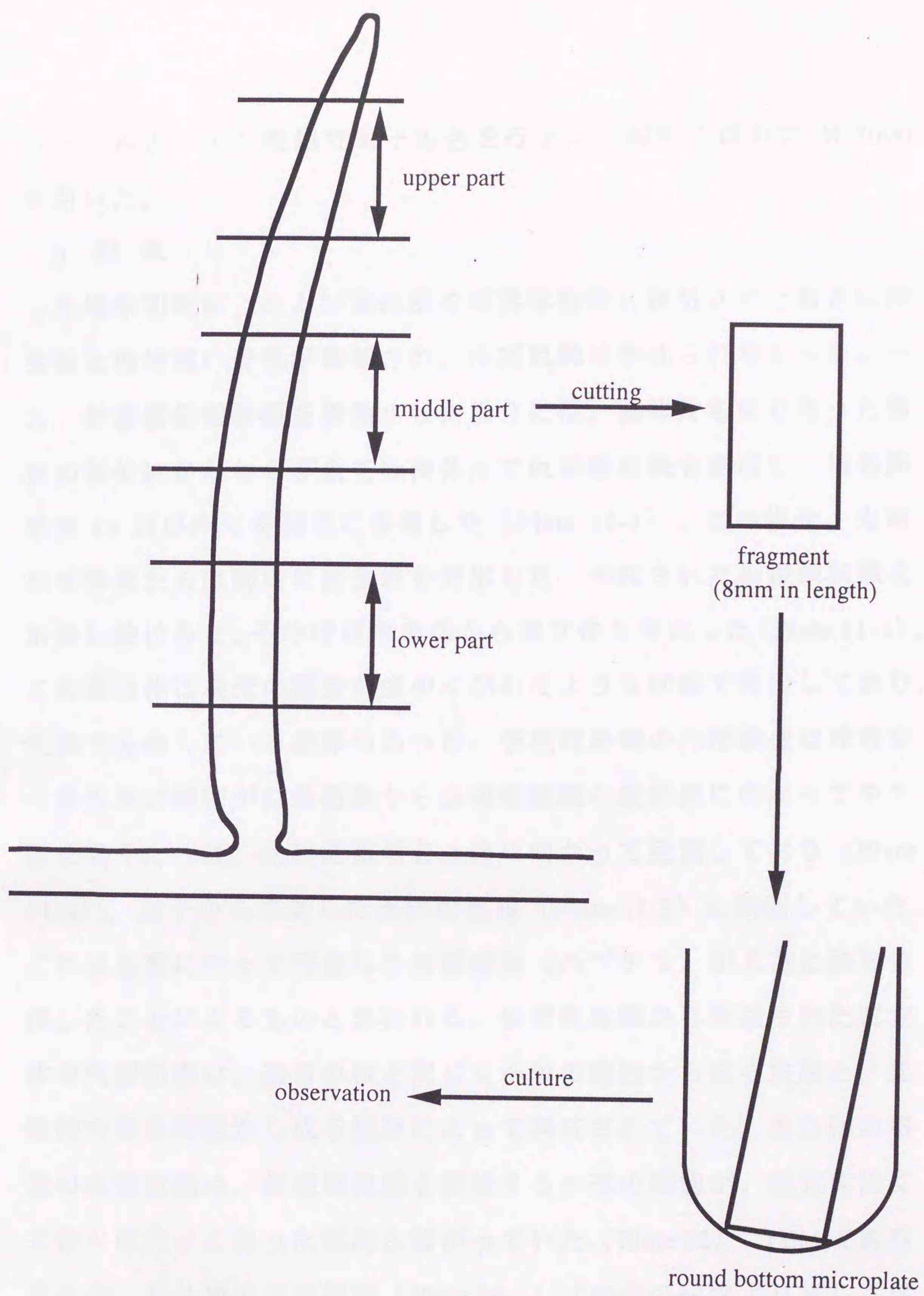


Fig. 5. Diagram showing the method for contact experiment. Distal or proximal cut surfaces of 8-mm fragments were kept contact with the bottom of culture vessel during culture.

ウラニルとクエン酸鉛で電子染色を行った。観察には日立 H-7000 を用いた。

b 結果

先端側切断面、および頂端部を培養容器面に接触させた場合は再生枝と頂端部の伸長が抑制され、外部組織は形成されなかった。一方、付着器側切断面を接触させた場合には、藻体片を切り取った藻体の部位にかかわらず全ての藻体片で仮根様組織を形成し、培養開始後 11 日以内に容器面に固着した (Plate 11-1)。この場合、先端側切断面からは同時に再生枝を発出した。形成された仮根様組織を培養し続けると、そのほぼ中央部から直立体を発出した (Plate 11-1)。この直立体は根元の部分が多少くびれたような状態で発出しており、先端で分岐している個体もあった。仮根様組織の内部構造は球形から長円形の細胞が付着面側から仮根様組織の表面側に向かってやや弧を描くように、比較的整然と上方に向かって発達しており (Plate 11-2)、孢子から培養した藻体の仮根 (Plate 11-3) と類似していた。これは基質に沿って発達した付着細胞 (ハプテラ) が上方に細胞分裂したことによるものと思われる。仮根様組織から形成された直立体の内部組織は、通常の枝と同じく小形の細胞から成る皮層と、比較的大形の細胞から成る髓層によって構成されていた。直立体の根元の内部組織は、仮根様組織を構成する小形の細胞が、直立体近くで徐々に大きくなった細胞と繋がっていた (Plate 12)。TEM で観察すると、最外層の付着細胞 (Plate 13-1) は内側の細胞より著しく厚い細胞壁 (厚さ約 $5\mu\text{m}$) によって囲まれていた (Plate 13-2)。この付着細胞にはチラコイド膜 2-3 枚のみの多数の小形の葉緑体が存在していた。

2 再生枝を切断した後の再生

藻体片を培養すると、先端側切断面からほとんど同時に 1-4 本の再生枝が生じ、伸長し続けた。さらに培養し続けても新たな再生枝を形成することはなかった (Plate 14-1, 2)。しかし、再生枝を形成している切断面を実体顕微鏡で観察すると、いくつかの僅かに盛り上がった組織が見られ、出芽しかけた再生枝が何らかの原因で抑制されているように見える。これは先に形成された再生枝に抑制されている可能性を示している。そこで再生枝を切断した場合、切断された再生枝と抑制されている組織が示す反応を以下の実験で確かめた。

a 材料と方法

側枝中央部から長さ 5mm の藻体片を切り取り、それを II-1 と同じ条件で 30 日間通気培養した。その後、切断面から生じている長さ約 5mm の再生枝をその中央部で切断した。この藻体片をさらに 21 日間培養した後、実体顕微鏡で観察した (Fig. 6)。

b 結 果

藻体片から一本のみ生じている再生枝を切断した場合 (Plate 14-3)、この切断面に傷害組織による修復と、皮層部からの再生が起こると共に、藻体片本体の先端側切断面の皮層部から 1-2 本の新たな枝が再生した (Plate 14-4)。この場合、再生枝の切断面は藻体片本体の先端側切断面と同じく、色素を持つ組織によって覆われた。2 本、および 3 本の再生枝を生じている藻体片でも、全ての再生枝を切断した場合 (Plate 15-1) は 1 本の場合と同じく、全ての切断面で傷害組織の発達と再生が起こった。さらに藻体片本体の先端側切断

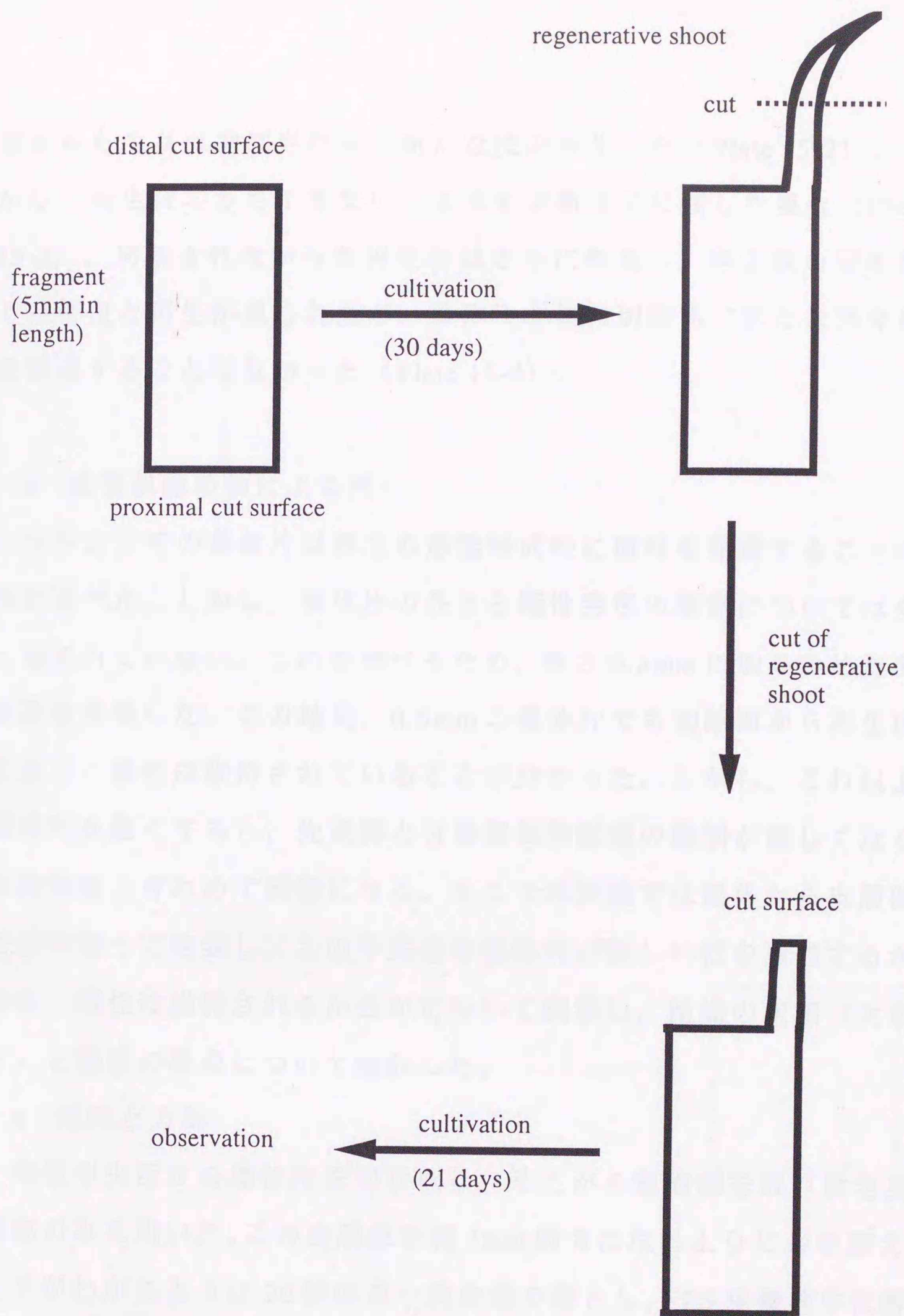


Fig. 6. Diagram showing the method for the cutting experiment of regenerative shoots.

面からも生長は抑制されるが新たな枝が再生した (Plate 15-2) 。しかし、再生枝のうち 1 本ないし 2 本を切断せずに残した場合 (Plate 15-3) , 切断されなかった再生枝はさらに伸長し、再生枝の切断面では修復と再生が見られたが、藻体片本体の切断面に新たな再生枝を形成することはなかった (Plate 15-4) 。

3 皮層組織培養による再生

ツルシラモの藻体片は再生の形態形成時に極性を発現することは先に述べた。しかし、藻体片の長さで極性発現の関係については全く知られていない。これを調べるため、長さ 0.5mm に切りつめた藻体片を培養した。この結果、0.5mm の藻体片でも切断面から再生枝を生じ、極性は維持されていることが分かった。しかし、これ以上藻体片を短くすると、先端側と付着器側切断面の識別が難しくなり実験技術上きわめて困難になる。そこで本実験では藻体から皮層部を切り取って培養し、この不完全な藻体片が新しい枝を形成するかどうか、極性は維持されるかどうかについて観察し、組織の状態 (大きさ) と極性の発現について検討した。

a 材料と方法

側枝中央部から藻体片を切り取り、そこから髓層部を取り除き皮層部のみを用いた。この皮層部を約 1mm 四方になるように形を整え、上下がわかるように 20 個体の一角を切り落とし、PES 培養液中に静置した。1 ヶ月間培養した後、再生状況を観察した (Fig. 7) 。

b 結果

実験のために用意した組織を横切片で観察した結果、この組織は 3-4 層の皮層細胞層のみで、体の中心部を構成する髓層細胞は完全

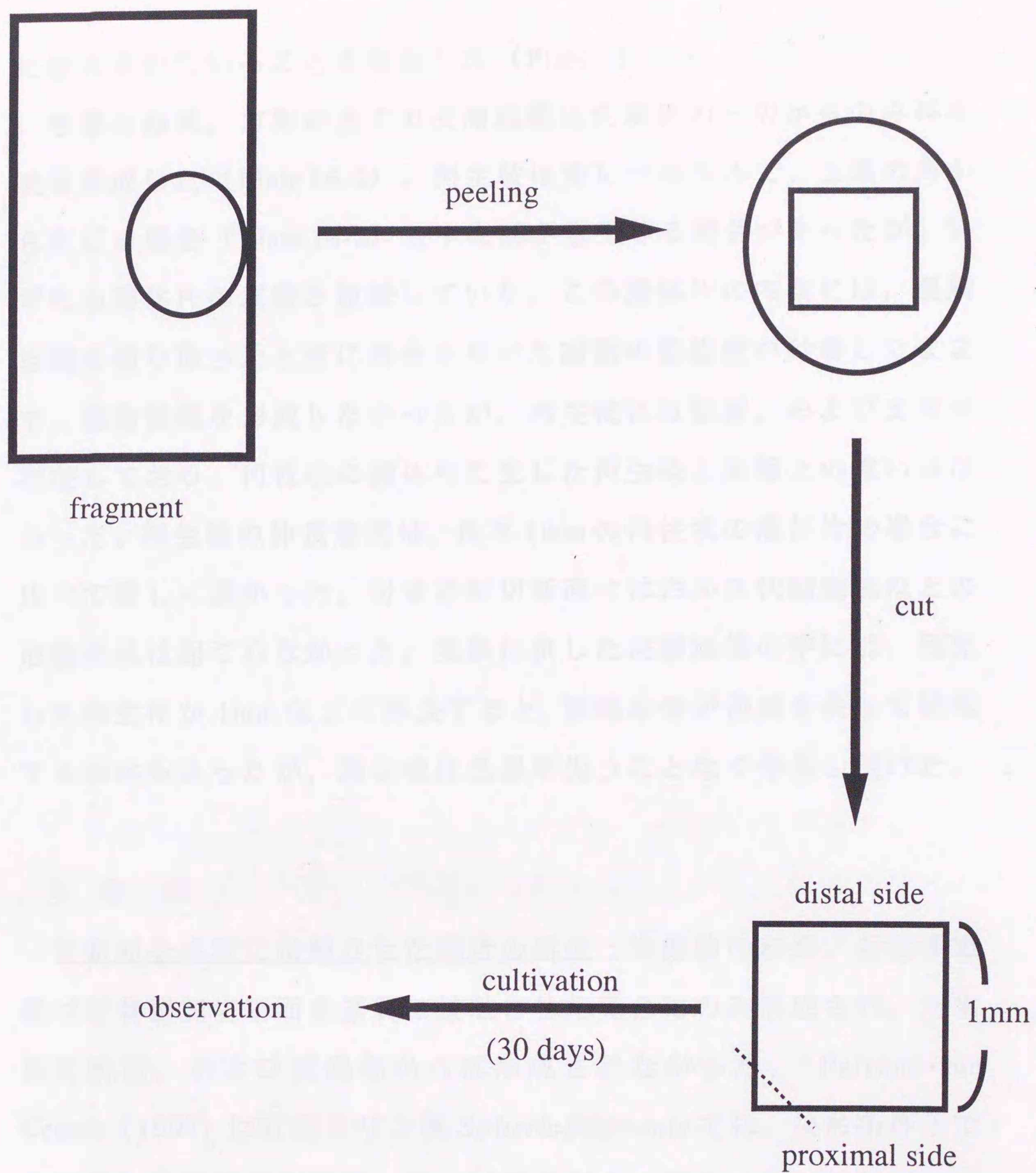


Fig. 7. Diagram showing the method for the culture of cortical tissue.

に除去されていることを確認した (Plate 16-1)。

培養の結果，方形の全ての皮層組織は先端側の一辺からのみ再生枝を形成した (Plate 16-2)。再生枝は常に一本のみで，上辺の角から生じる場合 (Plate 16-2) と中央部から生じる場合があったが，いずれも藻体片の皮層と連続していた。この藻体片の内側には，髓層組織を切り取ったときに傷害を受けた細胞の細胞壁が付着したままで，傷害組織を形成しなかったが，再生枝には髓層，および皮層が存在しており，円柱状の藻体片に生じた再生枝と形態上の違いはなかった。再生枝の伸長速度は，長さ 1mm の円柱状の藻体片の場合に比べて著しく遅かった。付着器側切断面にはカルス状細胞塊などの形態形成は起こらなかった。実験に供した皮層組織の中には，発出した再生枝が 1mm 以上に伸長すると，組織本体が色素を失って枯死する個体もあったが，再生枝は色素を失うことなく伸長し続けた。

4 考 察

切断面を基質に接触させた場合の再生：本実験の結果，仮根様組織は付着器側切断面を基質に接触させた場合にのみ形成され，先端側切断面，および頂端部からは形成されなかった。Perrone and Cecere (1997) は紅藻ミリン属 *Solieria filiformis* では，接触条件下で先端側と付着器側切断面，および頂端部のいずれからも仮根が形成されたと報告しているが，この両者の違いは種間の体構造の違いに起因するものと考える。その一例として，ツルシラモの髓層部が比較的大型の球状細胞で構成されているのに対し，二次付着することが知られている紅藻 *S. filiformis* やオオムカデノリ (Iima et al., 1995)，紅藻 *Gelidium chilense* (Santelices and Varela, 1994) の髓層部

は糸状の細胞から成っており，仮根形成の際にはこの糸状細胞が容易に分裂する。ツルシラモの藻体片では付着器側切断面から仮根様組織を生じ，藻体片本体を支えることができる程に発達するまでの時間は約 11 日間であった。しかし，天然で切断面がこれだけの期間動かずに，基質に接触し続けていることは難しい。従って，ツルシラモの藻体片は潜在的に仮根を形成する能力を持ち，再着生力を有することを確かめることはできたが，この能力が天然で発揮される機会はほとんどないと考えるのが妥当であろう。

付着器側切断面を培養容器へ接触させることによって形成された組織の機能，外形，内部構造などは本来の仮根に極めて類似している。これに似た例では，上述の *S. filiformis* の他，紅藻テングサ属 *Gelidium sesquipedale* の頂端部藻体片が本来の仮根と同じ構造をもつ仮根を形成し，着生した報告がある (Juanes and Puente, 1993)。この研究では，海水を霧状に散布させながら藻体片の側面を基質に接触させた状態で培養し，頂端部藻体片の側面からの仮根の形成を確認している。ツルシラモの藻体片を培養液中に横に静置した実験 (III 参照) では付着器は形成されなかった。しかし，岡村 (1911) は，紅藻テングサ属 *Gelidium amansii* の藻体片が天然で枝端などに付着細胞を形成し，基質に着生したことを観察している。この現象はツルシラモには見られないものである。また，Mairh and Tewari (1994) は紅藻 *Kappaphycus* 属 *Kappaphycus striatum* の体表面に生じた零余子 (むかご；胎芽) が伸長した突起状組織 (proliferations) を摘出して液体培地中で培養し，その基部から付着盤が発達することを観察した。近年，体組織，特に座 (平面に広がった付着組織) を再生させ増養殖に利用する，栄養体からの大量種苗生産方法について研究が

進められている。その一例として、紅藻ムカデノリ属ムカデノリ *Grateroupia filicina* の殻状の付着器を細断して単藻培養することにより、養殖用の種苗を確保することが可能になった（右田，1988）。細断された座は静置培養によって基質に付着する性質を持つため、これを化繊のロープに着生させ、海中で栽培することが可能である。この方法は孢子からの採苗に比べて培養期間が短く、雑藻の混入が少ないなど利点が多い。

ツルシラモは小さな盤状の座を形成するが、座や体の切断片は基質にほとんど着生しないと云われていた（右田，1992）。しかし、切断された藻体片は付着器を形成して基質に着生する潜在能力を持つことが分かった。この再着生能力を増養殖に応用することは可能である。これが実現すれば、藻体をロープに挟み込むための作業を省力化することができるものと考ええる。

Perrone and Cecere（1997）は紅藻 *S. filiformis* の付着細胞は3層からなる厚い粘液鞘に囲まれ、細胞内には色素に代わり多量の紅藻デンプンを持っていると報告している。ツルシラモの場合、付着細胞内の紅藻デンプンは少量で、またTEMによる観察の結果、付着細胞は著しく厚い細胞壁によって囲まれており、*S. filiformis* とは異なっていた。付着細胞の微細構造に関する研究はほとんどないため、2種間の違いが持つ意味あいには不明であるが、少なくとも接触刺激は通常の体細胞と異なる構造の細胞を分化させることが分かった。この結果は再着生能力を利用した、栄養体から大量の種苗を生産する上で有効な基礎的知見である。

再生枝を切断した後の再生：既存の再生枝が新たな再生枝の形成を抑制していることが明らかになった。高等植物では頂芽が側芽の

生長を抑制しており，頂芽を切除すると側芽が生長し始めることが知られている。このような機構をアピカルドミナンス（頂芽優勢）と呼んでいる。Chamberlain ら（1979）は褐藻タマハハキモクでアピカルドミナンス現象を実験的に確かめている。すなわち，①頂端部の影響の程度はそこから離れるほど弱まること，②複数の第一側枝が存在する場合，そのうち一本の先端部を除去しても他の第一側枝の生長に変化はないが，切断した第一側枝から出る第二側枝（第一側枝の側面から出ている側枝）の伸長が促進されること，③インドール酢酸（以下 IAA）を培地へ添加すると藻体片の伸長は抑制されることを明らかにした。ツルシラモの場合，切断前の再生枝頂端部のアピカルドミナンスが新たな枝の形成を抑制しているが，切断によるアピカルドミナンスの解除が新たな再生枝の形成を促したと考えられる。再生枝を形成している切断面に形成された僅かに盛り上がった組織は，先行して形成された再生枝のアピカルドミナンスによって，発達が抑制されている再生枝の芽であることが分かった。

今回の実験で，2本の再生枝のうち1本だけを切断した場合に，藻体片本体の先端側切断面から新たな枝を形成することはなかった。しかし，再生枝の切断面からは新たな再生枝を形成したことは，切断されずに残った再生枝の頂端部が藻体片本体からの再生枝の形成を抑制するが，切断された再生枝からの再生を抑制しないことを示している。これは，藻体片の切断面と再生枝の切断面の位置関係によるものと考えられる。すなわち，切断された再生枝と無傷の再生枝は同一の切断面から生じているので，再生枝の切断面と切断されていない再生枝の頂端部とは同等の位置関係にあり，上述のタマハハキモクの第一側枝の場合と同じく，互いにアピカルドミナンスによる

影響を及ぼさなかったのであろう。また、側枝を付けたままの藻体片 (Plate 17-1) を培養したところ、先端側切断面に再生枝を形成した (Plate 17-2)。この結果は本種のアピカルドミナンスの影響力は高等植物ほど強くないことを示している。海藻の場合、細胞間の物質輸送機構が未発達であることによるものと考ええる。高等植物でのアピカルドミナンスは IAA によって引き起こされることが知られているが、ほとんどの海藻で IAA の存在は未だ確認されていない。しかし、今回確かめた現象は何らかの化学物質により誘起されていると推察する。今後は IAA など植物ホルモンを培地に添加するなどの方法によって、アピカルドミナンスを支配している物質を特定し、さらにその作用と機構を解明する必要がある。

皮層組織培養による再生：本種の極性は上下に切断面を持った円柱状の藻体片だけではなく、皮層部組織のみの状態でも維持されていることが明らかになった。海藻の組織培養による極性の研究は、ほぼ例外なく皮層と髄層を含む、上下に切断面を持つ藻体片を用いて行われてきたが (Perrone and Cecere, 1997; Perrone-Pesola and Felicini, 1981), 本実験の結果は個々の分化した組織に極性が維持されていることを明らかにし、さらに組織を構成する個々の細胞にも極性が存在していることを示唆している。単一細胞の極性については、Ducreux ら (1988) が褐藻クロガシラ属 *Sphacelaria cirrosa* から単離した副頂端細胞が元の藻体の極性にしたがって再生したことを報告している。ツルシラモは *S. cirrosa* の頂端部のように単列ではなく多軸組織なので、直接実験で確かめることはきわめて困難であるが、ツルシラモを構成する個々の細胞にも極性が存在する可能性はある。個々の細胞が極性を持つか否かを知ることは、極性の機構

を解明する上できわめて重要である。

単細胞の極性と形態形成の関係については、褐藻ヒバマタの受精卵で研究されている。この受精卵は受精直後は極性を示さない。しかし、受精後 18 時間くらいになると接合子は極性を持つようになり、非対称的に分裂を始め、小形の基底細胞は基質に固着する構造に分化し、大形の頂端細胞は光合成を行う葉状体へと分化する。初期の受精卵が極性を獲得するきっかけは、細胞内に流れる微小電流である。この電流は重力に対して下側に当たる受精卵の基底部での受動的な Ca^{2+} の流入と、他の個所での Ca^{2+} の能動的な排出によって生じるもので、おそらく Ca^{2+} チャネルと Ca^{2+} ポンプが細胞膜中に非対称的に分布しているために生じたものである。こうして卵細胞中にイオンの流れができると、多価の電荷を持った細胞内分子は電気泳動的に移動できる。この分極作用の結果、細胞基底部に分泌小胞が集まり、さらにその部分の細胞壁に硫酸基を持つ特殊な多糖が沈着することが分かっている (Kropf et al., 1988)。これは単細胞であり組織ではないが、基質に接触させたツルシラモの組織で同じような現象が起こっている可能性はある。さらに、同じ接触刺激を与えた先端側切断面には、付着器側切断面のような形態形成は起こらなかった。これは接触刺激を直接受けた個々の細胞が極性を持っていることを示唆している。

V ツルシラモの再生に伴う生物量の変動

海藻の再生現象は主として形態形成の現象面から研究されてきた。しかし、海藻の再生には個体の生物量を増大させるという側面もある。右田ら（1993）は有明海の熊本沿岸でツルシラモが大繁殖しているのは、四分胞子体の体再生によって毎年栄養繁殖を繰り返した結果であると報告している。また、McCook and Chapman (1992) は流氷によって葉状部を失った褐藻ヒバマタ属二種 *Fucus evanescens*, *F. vesiculosus* の再生状態を調査し、付着器からの再生が葉状部の回復と生物量の増大に極めて重要な役割を果たしていることを指摘した。このように、海藻の再生は個体群を維持する上でも非常に重要な意味を持っている。したがって、海藻を増養殖する際には、この再生力を個体数、および生物量を増加させる有効な手段として利用しているが、再生量と環境条件の相互関係について詳細な研究はない。本研究ではツルシラモの藻体片の長さや採取部位を変えて様々な条件で培養をし、再生に伴う生物量の変動を基に、再生量を左右する要因について考察した。

1 藻体片の長さによる再生量の変動

再生は栄養生長の一形態である。藻体が生長する時、その元になる藻体が大きいほど生長量が大きくなることは予想できる。しかし、藻体片を大きくする程、“種苗”としての経済効果が低下し、再生力を利用する意味がなくなる。したがって、適正な藻体片の大きさを確定することが必要である。ツルシラモを切断した場合、先端側切断面から数本の再生枝が伸長することは既に述べ

た。このような藻体の一部からの生長にも，元の藻体片の生物量が再生枝の数，生長，再生様式に影響を与えることは充分考えられる。本実験では，藻体片の生物量（長さ）の違いによる再生様式，および再生量を確認するため，様々な長さの藻体片を培養し，再生様式と生長に伴う生物量の変動を調べた。

a 材料と方法

藻体の側枝の中央部から長さ 1, 5, 10, 30mm の藻体片をそれぞれ 18 個ずつ切り取り，II-1 と同じ条件で通気培養を行った。培養開始から 0, 14, 22, 29, 36, 43, 50, 57 日後に再生枝を含めた各藻体片の全湿重量を測定し，最終日の 57 日目には再生枝と再生側枝を除いた藻体片本体の湿・乾重量，長さ，再生枝と再生側枝の湿・乾重量，本数，長さを測定した。湿重量はペーパータオルで藻体表面の海水を拭き取った後，乾重量は 80℃で一昼夜乾燥した後，電子分析天秤（ザルトリウス 2004 MP6）で測定した（以下同じ）。

b 結果

再生枝の形成と伸長は全ての藻体片で見られた。再生側枝は主に 10mm と 30mm の長い藻体片で形成されたが，特に 30mm の藻体片では一藻体片当たり平均 4.9 本と数が多く，また著しく伸長し，一藻体片当たりの全長は平均 22.5cm に達した（Plate 18-1, 2）。藻体片本体は全藻体片でほとんど伸長しなかった。

藻体片が 1-30mm の範囲内では長いほど，すなわち生物量が大きいくほど，増加した総重量が大きく，特に 30mm の藻体片では培養 57 日目の湿重量増加が平均 186.7mg と他の藻体片に比べて著しく高い値を示した（Fig. 8）。

再生枝の数は藻体片が長いほど多くなる傾向を示し、30mmの藻体片では平均3.4本と他の藻体片より高い値を示した（Fig. 9）。しかし、全再生枝の平均湿重量は、1mmの藻体片で平均31.8mgであるのに対して、5mmで平均87.2mg、10mmで平均82.4mg、30mmで平均90.2mgであり、1mmと5mm以上の藻体片との間に明確な違いが見られた。5、10、30mmの藻体片間に有意差（危険率5%）はなかった（Fig. 10）。

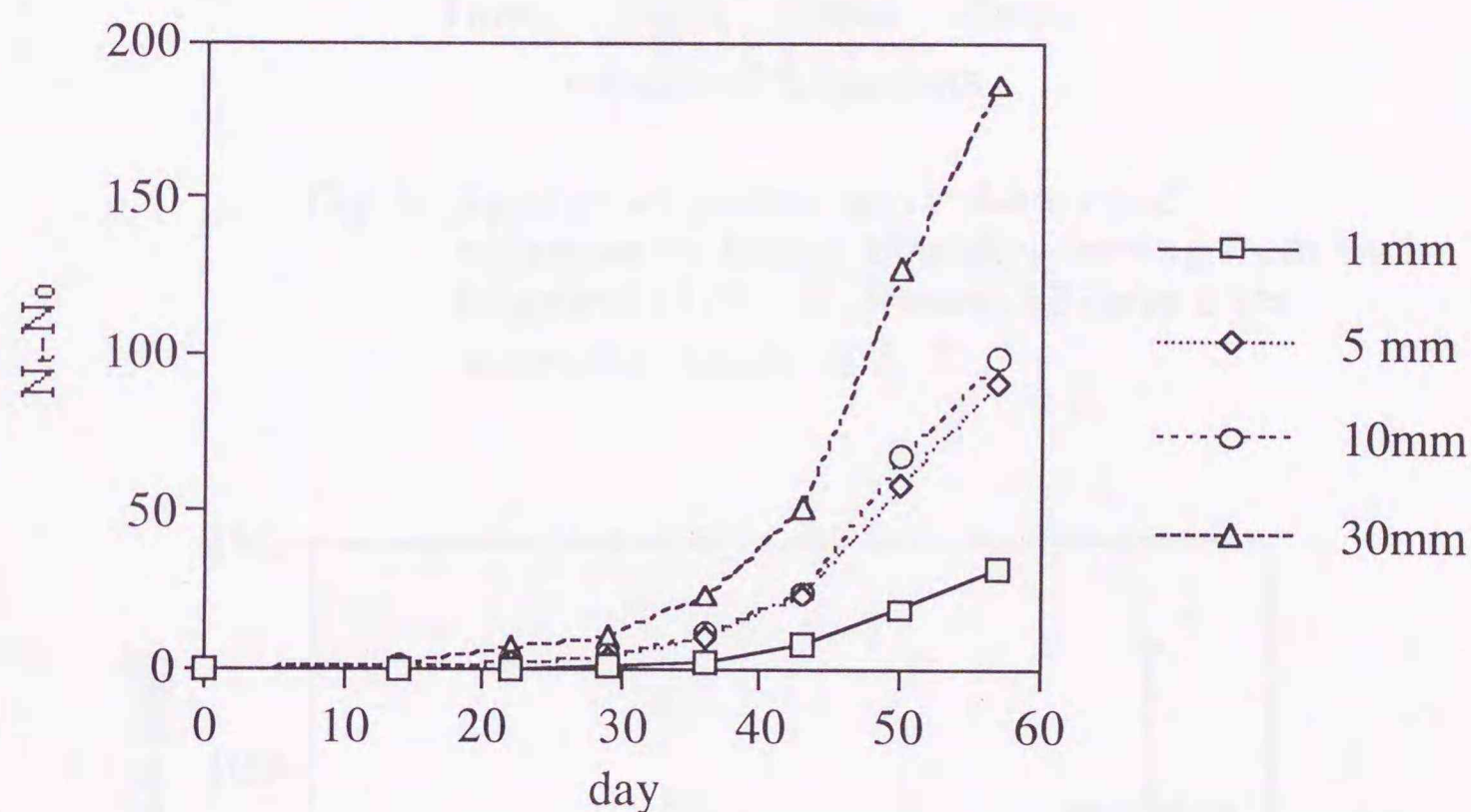


Fig. 8. Change of wet weight of fragments, including regenerative shoots and lateral branches, depending on length of fragments. $N_t - N_0$
 N_t : Mean wet weight (mg) in t days after culture.
 N_0 : Mean wet weight (mg) at the beginning of culture.

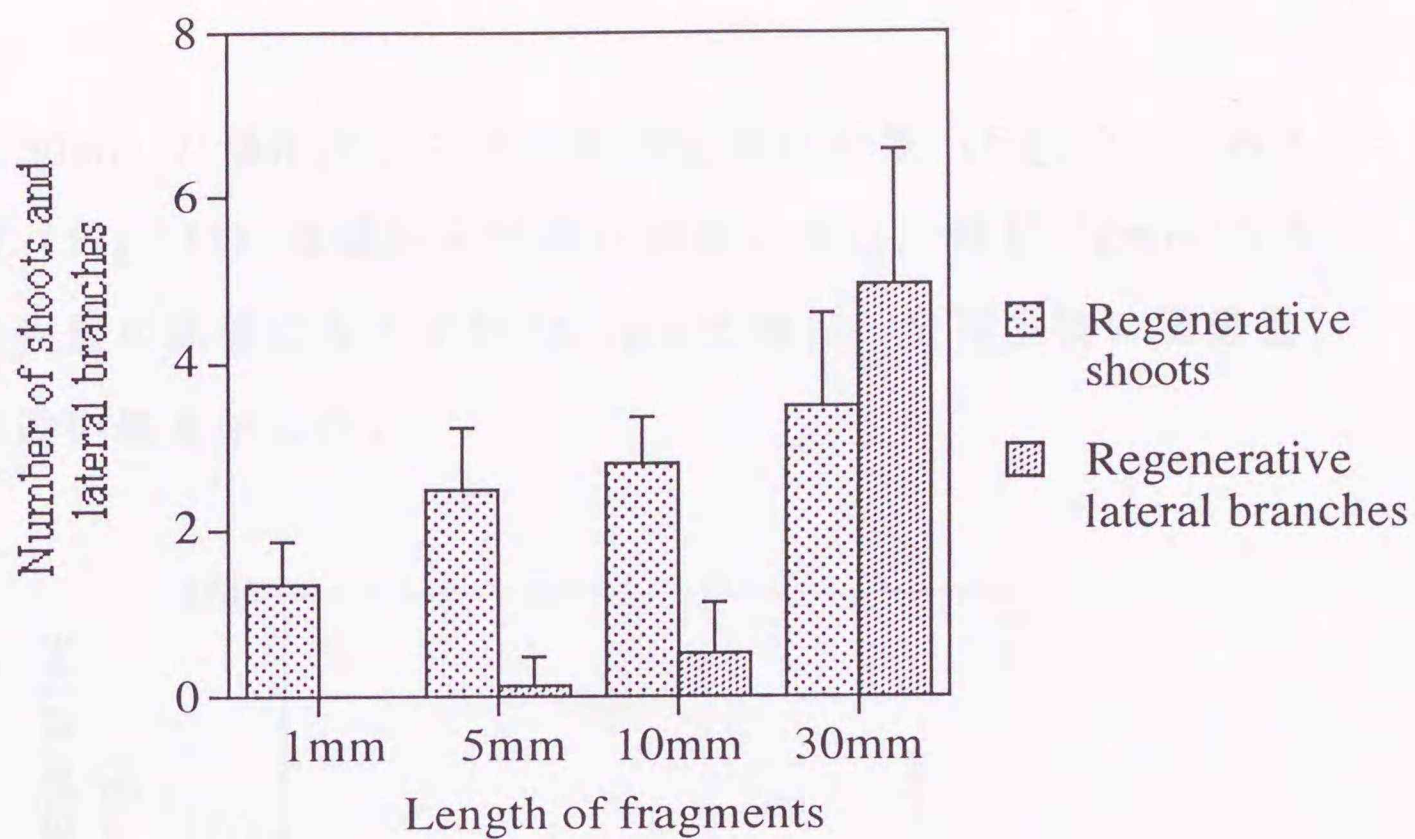


Fig. 9. Number of regenerative shoots and regenerative lateral branches issuing from each fragment (1, 5, 10, 30mm) 57 days after wounding. Mean $\pm$ S. D..

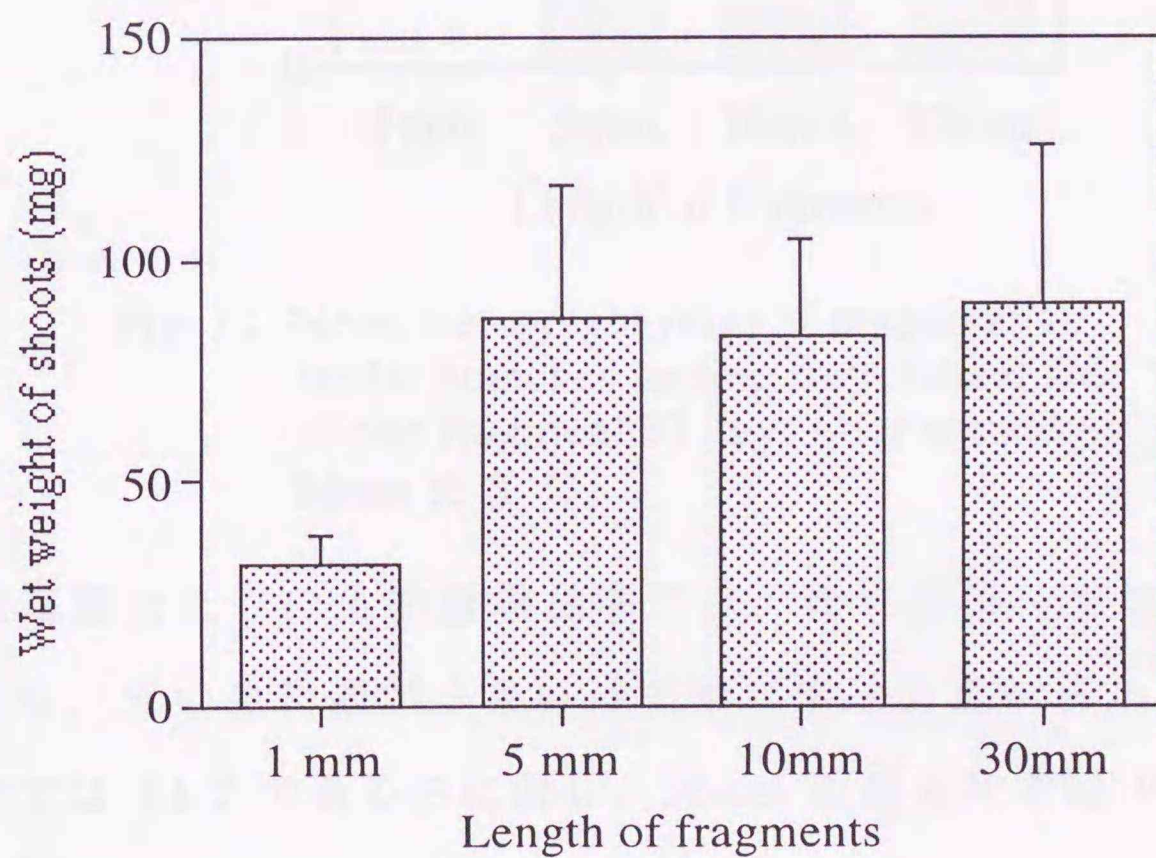


Fig. 10. Mean wet weight (mg) of regenerative shoots issuing from distal cut surface of one fragment 57 days after wounding. Mean $\pm$ S. D..

5, 10, 30mm の藻体片から生じた再生側枝の数 (Fig. 9) , および生物量 (Fig. 11) は藻体片が長い程多くなり, 特に 30mm のものでは生物量が顕著に多く平均 82.9mg に達し, 全再生枝の湿重量平均値に近い値を示した。

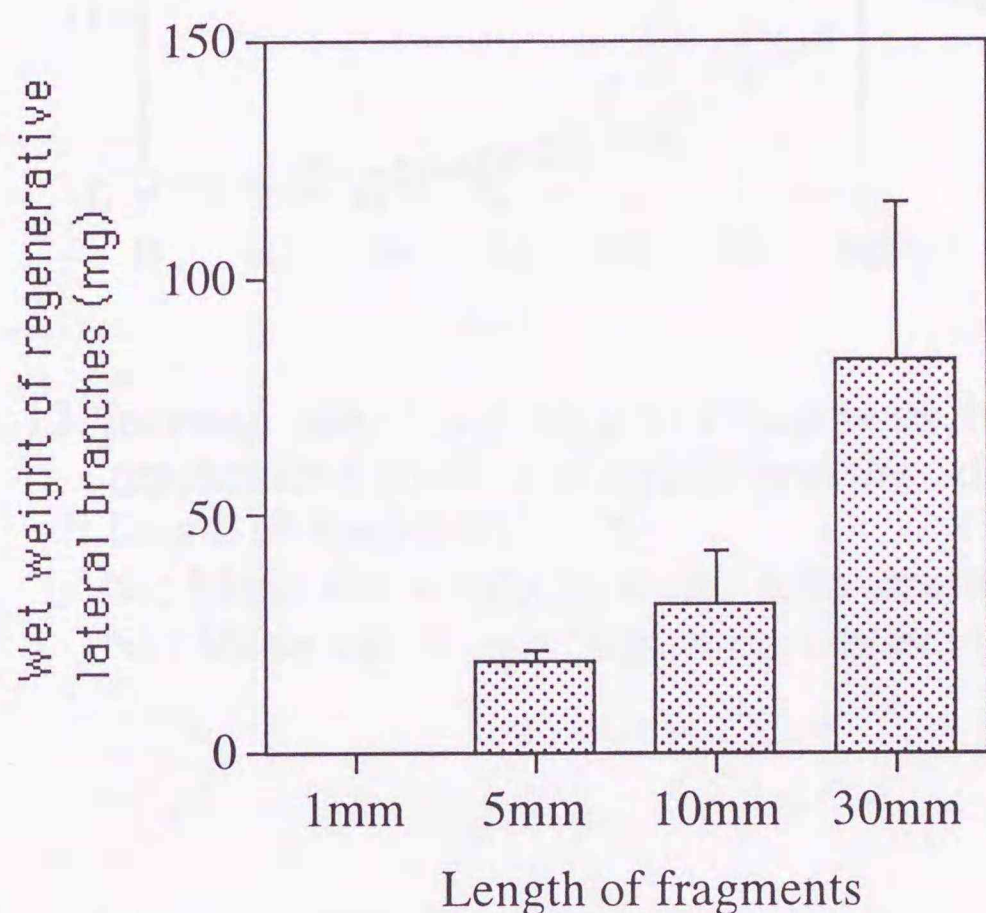


Fig. 11. Mean wet weight (mg) of regenerative lateral branches issuing from lateral side of one fragment 57 days after wounding. Mean $\pm$ S. D..

単位重量当たりの生物量増加率では, 逆に藻体片が短いほど, すなわち, 元の生物量が小さいほど増加率は大きかった。1mm の藻体片では 34.7 であるのに対し, 30mm の藻体片では 9.0 と大きな開きがあった (Fig. 12) 。

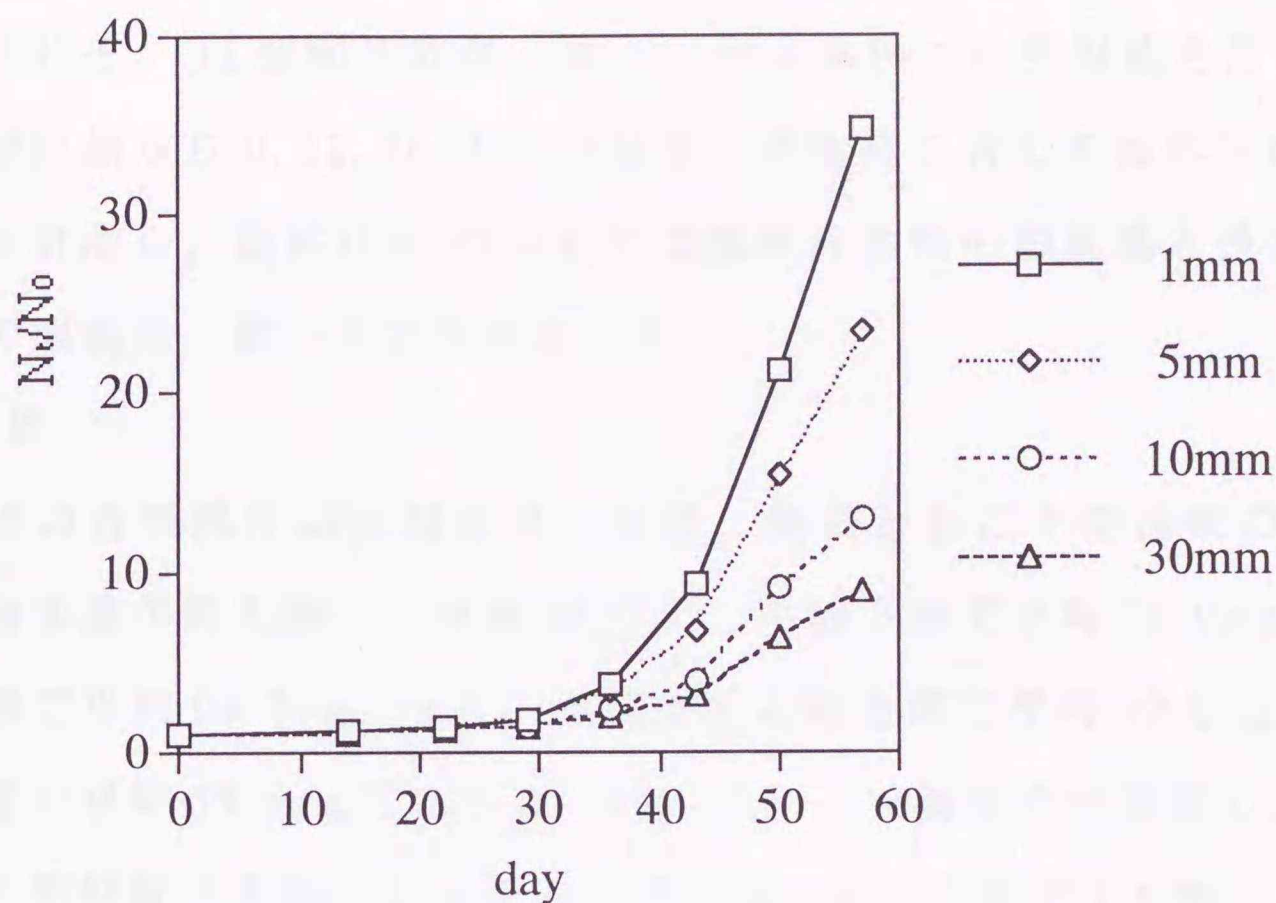


Fig. 12. Increase rate of wet weight of fragments, including regenerative shoots and lateral branches, depending on length of fragments. N_t/N_0

N_t : Mean wet weight (mg) in t days inculture.

N_0 : Mean wet weight (mg) at the beginning of culture.

2 藻体の部位による藻体片の再生量の変動

これまでの実験で用いた藻体片は 10cm 以上に生長した側枝の中央部から切り取ったものである。しかし、ツルシラモの藻体は 1m 以上に生長する主軸と、そこから生じる側枝から成っており、部位によって細胞年齢に大きな違いがある。そこで本研究では藻体の部位の違いが再生に及ぼす影響について調べた。

a 材料と方法

体の主軸、および側枝それぞれの上部（先端側）、中央部、下部（付着器側、または主軸側）（Fig. 5 参照）から長さ 5mm の藻

体片をそれぞれ 18 個切り取り，II-1 と同じ条件で通気培養を行った。培養開始から 0, 12, 26, 35, 49 日後に再生枝を含む各藻体片の湿重量を計測し，最終日の 49 日目には藻体片本体の湿重量と長さ，再生枝の湿重量，数，長さを測定した。

b 結果

培養後の各藻体片の全湿重量は主軸，側枝ともに下部由来の藻体片の増加量が最も高く，培養 49 日目，主軸下部で平均 76.9mg，側枝下部で平均 91.2mg，一方，上部では主軸上部で平均 19.0mg，側枝上部で平均 59.6mg であった (Fig. 13)。一藻体片が形成した再生枝の平均数は主軸の中央部と下部で 2.6 本，上部で 1.6 本，側枝でも下部で 3.2 本，上部で 1.8 本と，主軸と側枝ともに下部由来の藻体片が多く，上部で少なかった (Fig. 14)。再生枝の平均湿重量も主軸下部で 73.7mg，上部で 15.3mg，側枝下部で 88.2mg，側枝上部で 54.6mg であった (Fig. 15)。さらに再生枝の平均全長でも主軸下部で 15.3cm，上部で 5.2cm，側枝下部で 21.3cm，上部で 11.8cm (Fig. 16) となり，下部で大きく，上部ほど小さい値を示した。しかし，藻体片本体の湿重量増加率については主軸下部で 2.5，上部で 4.3，側枝下部で 2.3，上部で 6.2 (Fig. 17) と，逆に上部で高い値を示した。藻体片本体の平均長でも主軸下部で 0.7cm，上部で 1.0cm，側枝下部で 0.7cm，上部で 1.2cm (Fig. 18) と，上部で大きく，下部では小さな値を示した。

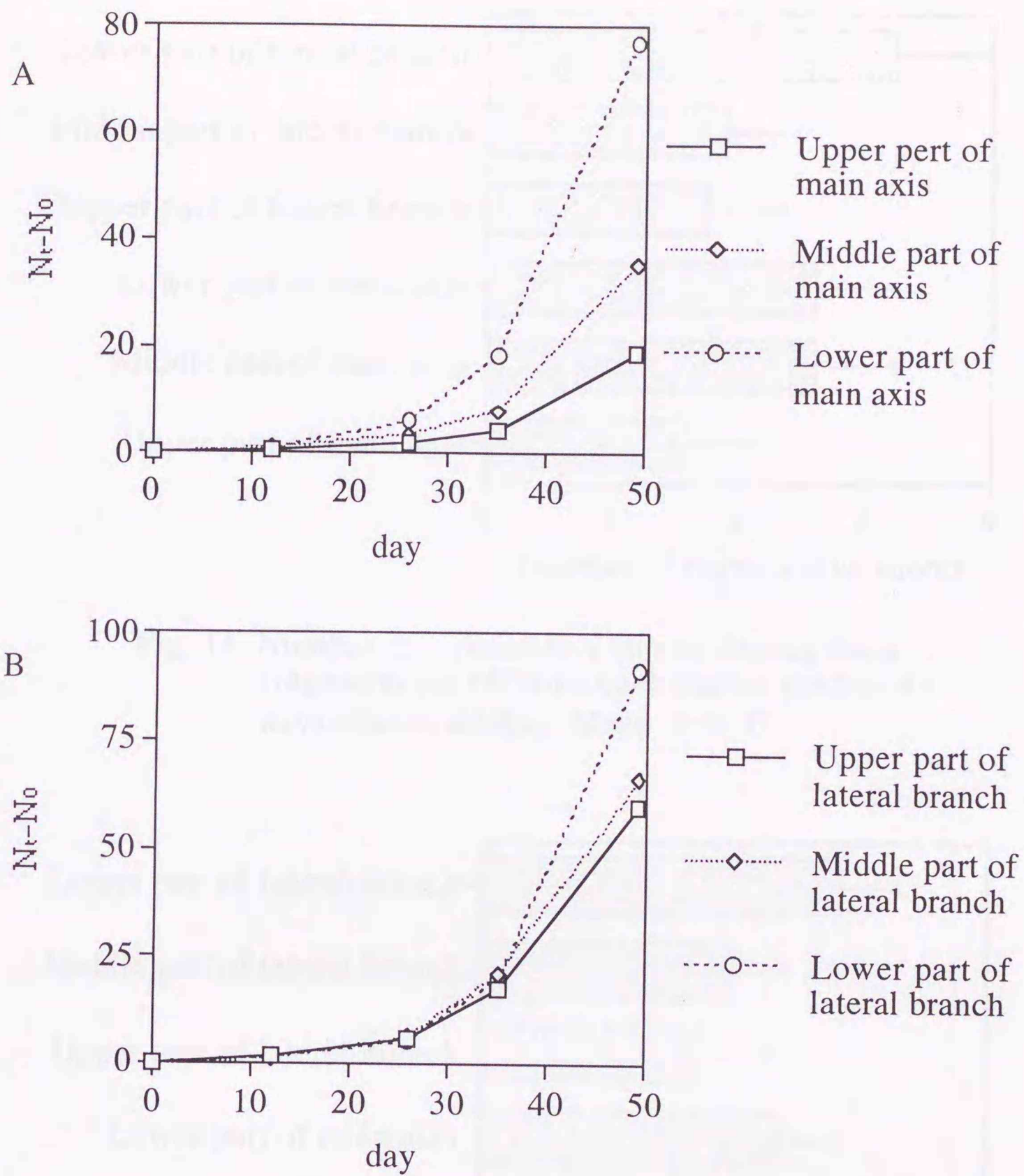


Fig. 13. Change of wet weight of fragments, including regenerative shoots, depending on thallus portion.
 A : Fragments from main axis.
 B : Fragments from lateral branch.
 $N_t - N_0$
 N_t : Mean wet weight (mg) in t days after culture.
 N_0 : Mean wet weight (mg) at the beginning of culture.

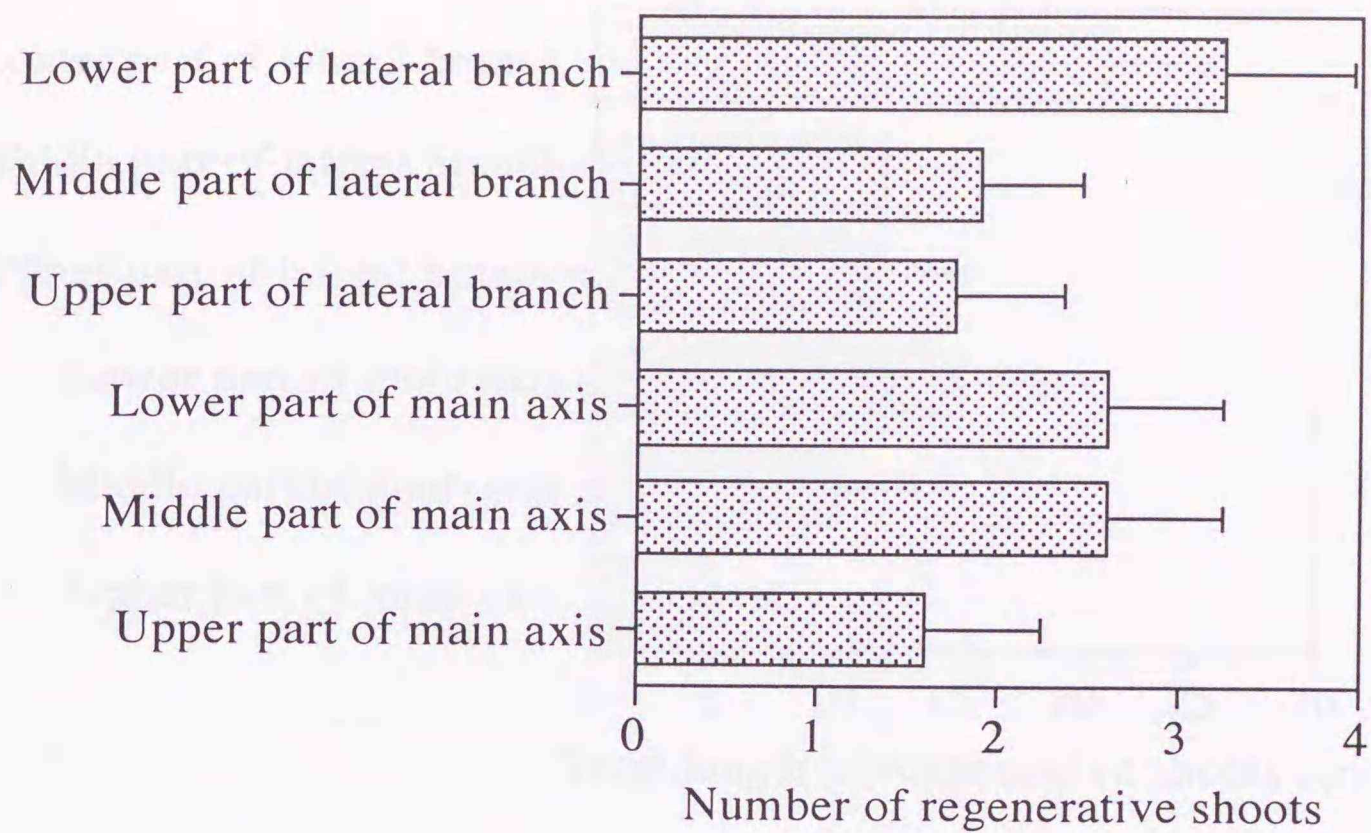


Fig. 14. Number of regenerative shoots issuing from fragments cut off from each thallus portion 49 days after wounding. Mean $\pm$ S. D..

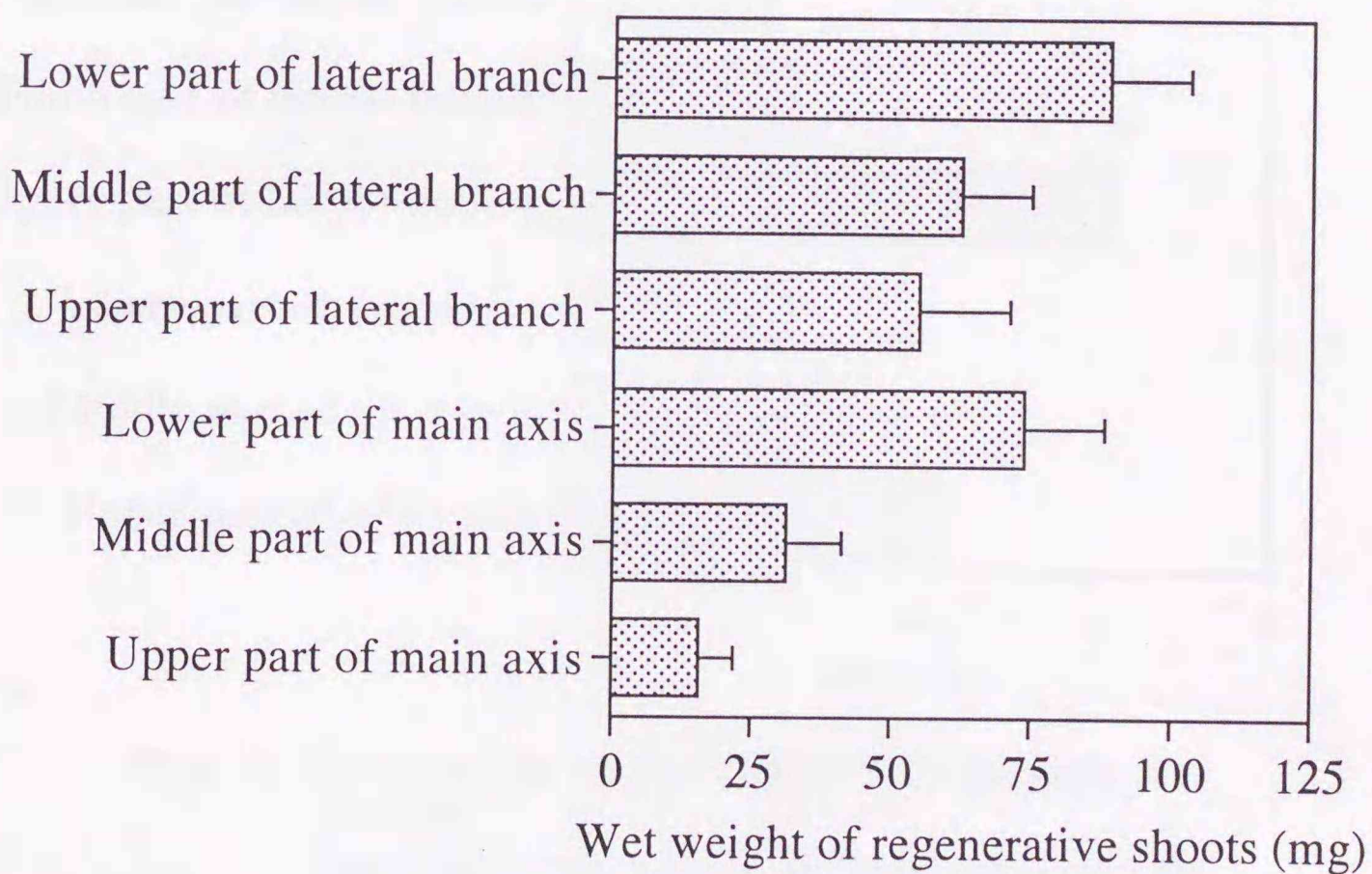


Fig. 15. Mean wet weight (mg) of regenerative shoots issuing from distal cut surface of one fragment 49 days after wounding. Mean $\pm$ S. D..

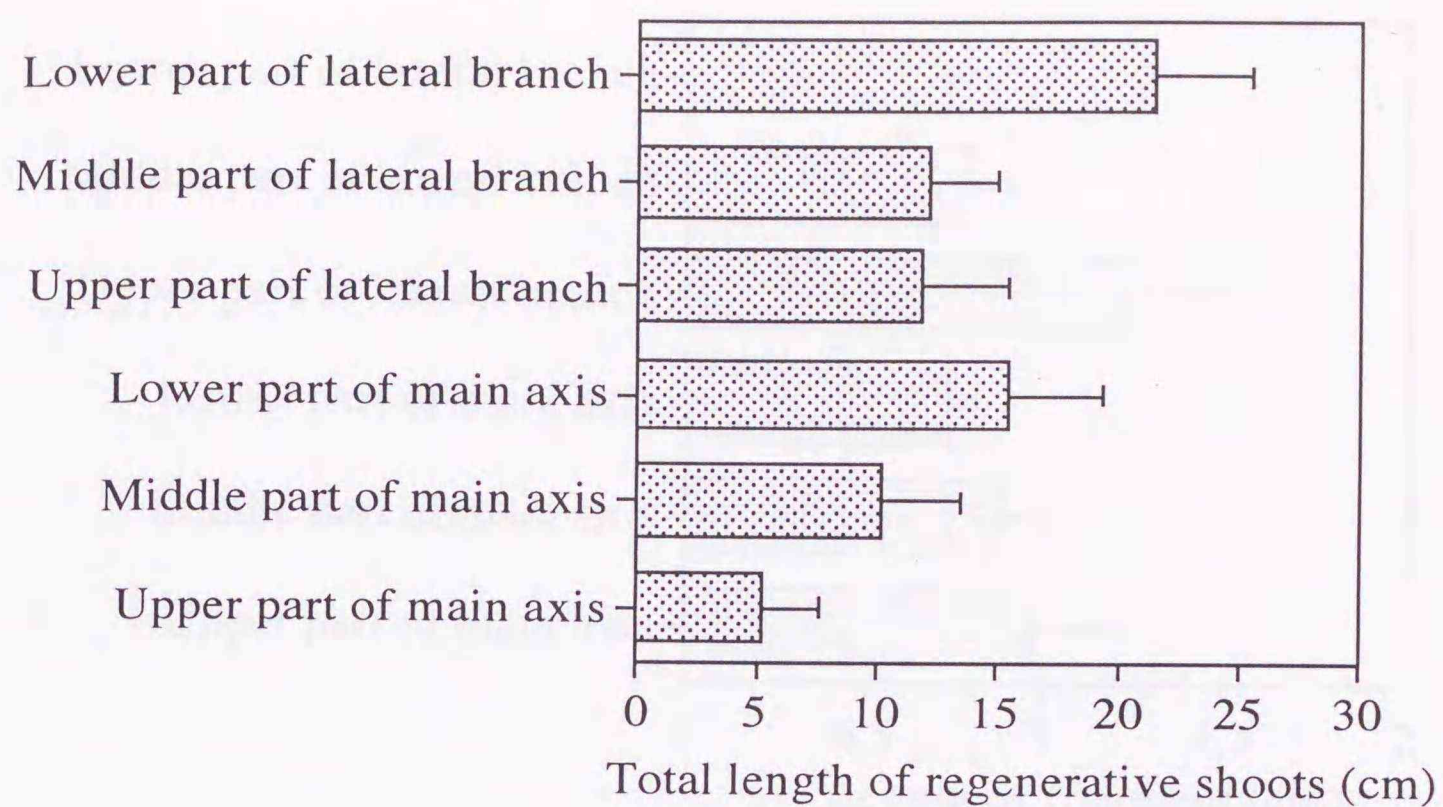


Fig. 16. Mean total length (cm) of regenerative shoots issuing from distal cut surface of one fragment 49 days after wounding. Mean S. D..

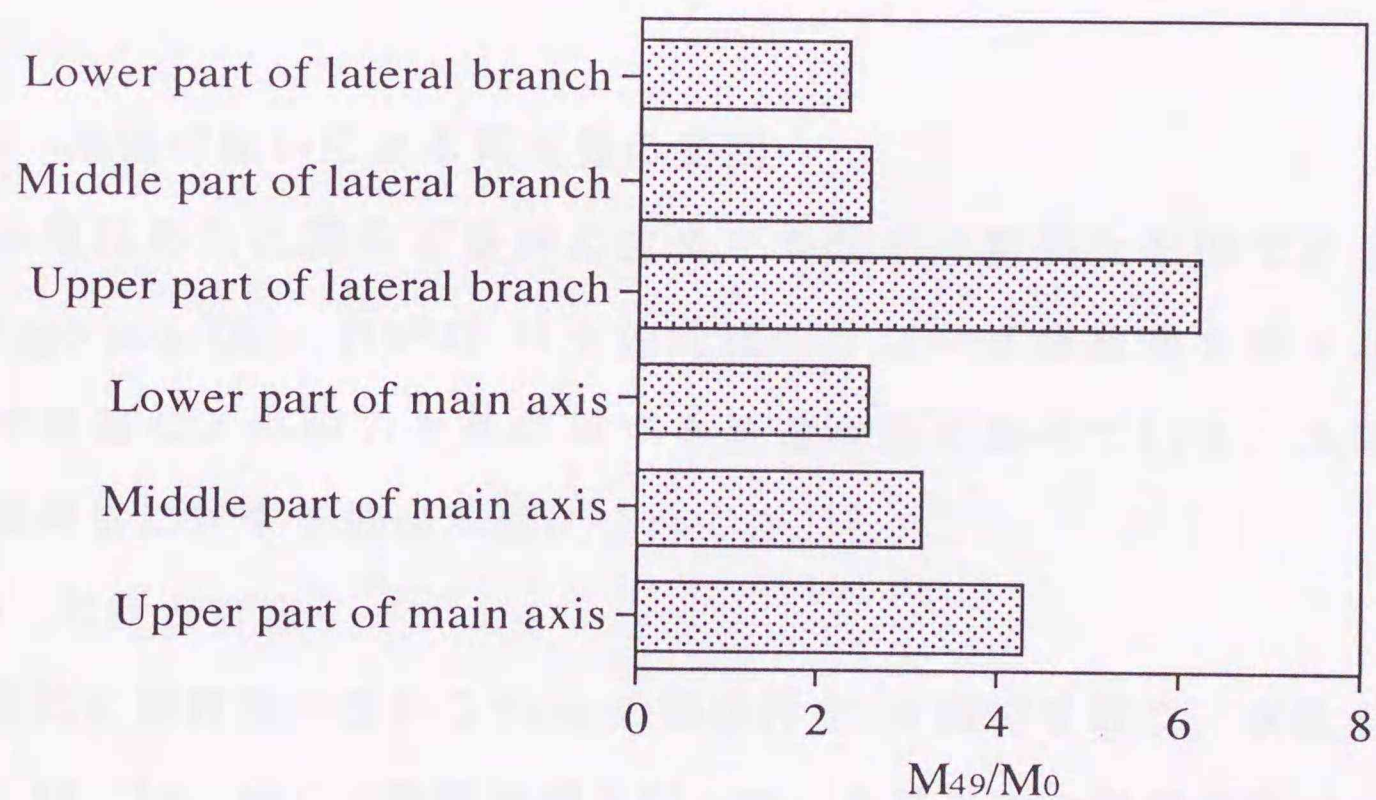


Fig. 17. Increase rate of wet weight of fragments.
 M_{49}/M_0
 M_{49} : Mean wet weight of fragments (mg) 49 days after wounding.
 M_0 : Mean wet weight of fragments (mg) at the beginning of culture.

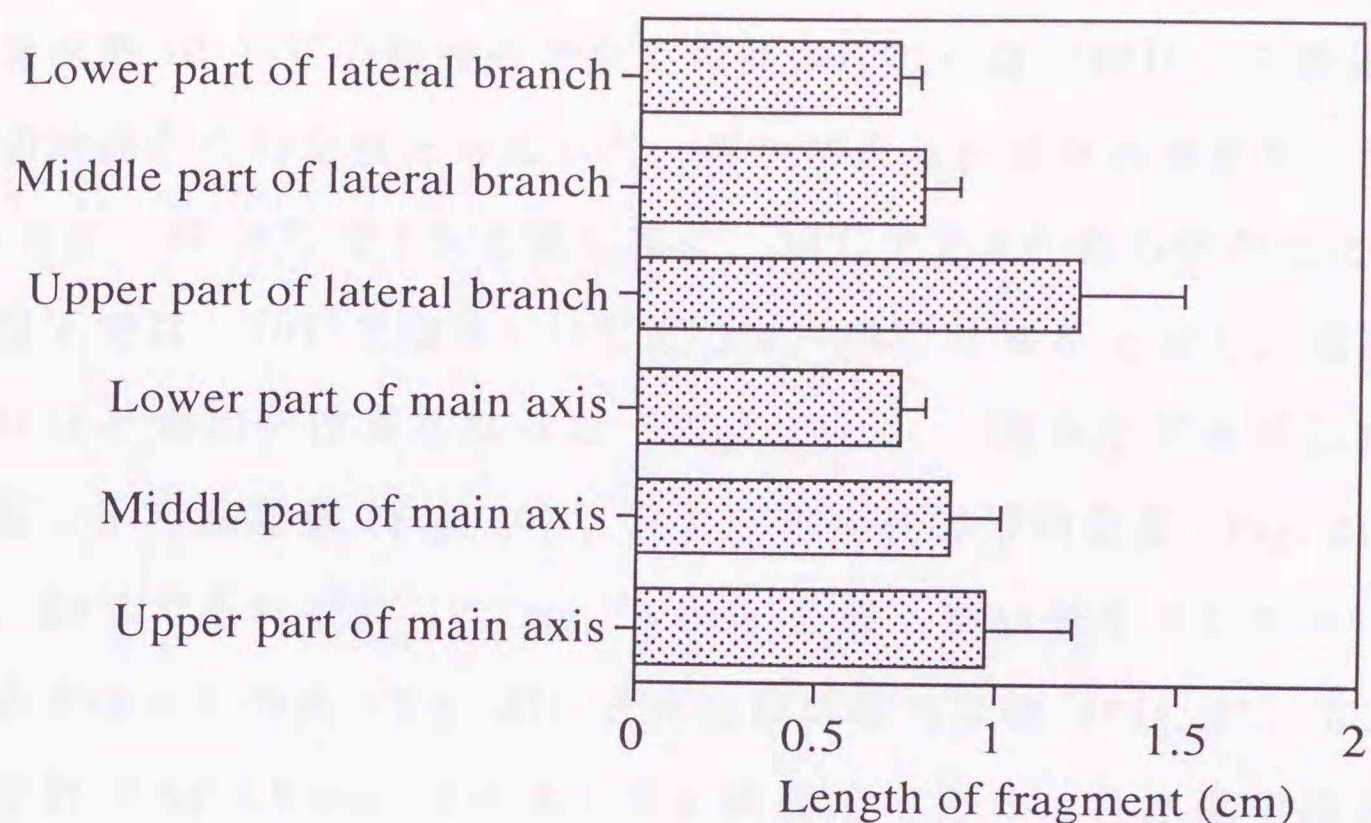


Fig. 18. Mean length of fragments (cm) 49 days after wounding. Mean $\pm$ S. D..

3 水温の違いによる再生量の変動

水温は再生に限らず藻体の生長を支配する重要な要因である。Orosco and Ohno (1992) は土佐湾産のオゴノリ属数種を様々な水温で培養し、各種の生長に対する最適水温を調べている。本実験では再生に対する最適水温について検討した。

a 材料と方法

藻体の側枝中央部から 5mm の藻体片を 18 個切り取り、水温 10, 15, 18, 20, 24℃ で静置培養を行った。水温以外の培養条件は II-1 に準じた。培養 0, 18, 32, 46, 60, 74, 88 日目に各藻体片の再生枝を含む湿重量を計測し、最終日の 88 日目には藻体片本体の湿・乾重量と長さ、再生枝の湿・乾重量、本数と長さを測定した。

b 結果

培養水温 10-24℃ の範囲内で全ての藻体片は生存し続け、全藻体片が切断面から再生枝を形成した。再生による湿重量の増加率（培養 88 日目）は 20℃ で 5.5 と最も高く、24℃ で 2.4 と最も低かった。18℃ 以下では、10℃ で 2.9、15℃ で 3.4、18℃ で 4.6 となり、温度が高いほど増加率は高くなった（Fig. 19）。一藻体片が形成した再生枝の平均湿重量（Fig. 20）、および再生枝の平均全長（Fig. 21）でも、20℃ でそれぞれ 12.7mg、4.0cm と最も高い値を示したが、藻体片本体の平均長（Fig. 22）と再生枝の平均本数（Fig. 23）は、それぞれ 0.55-0.56cm、2.0-2.6 本の範囲内であり、各水温で顕著な違いはなかった。

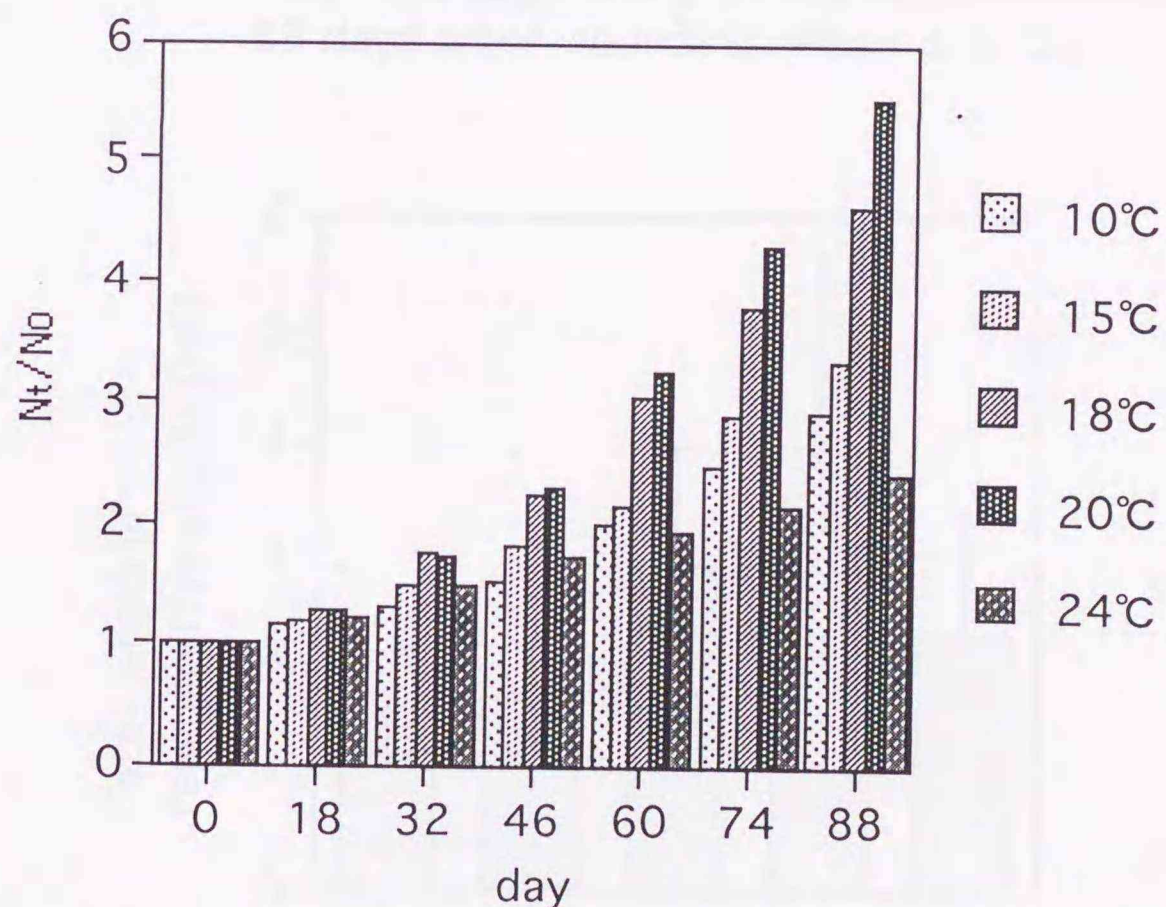


Fig. 19. Increase rate of wet weight of fragments, including regenerative shoots, depending on seawater temperature. N_t/N_0
 N_t : Mean wet weight (mg) in t days in culture.
 N_0 : Mean wet weight (mg) at the beginning of culture.

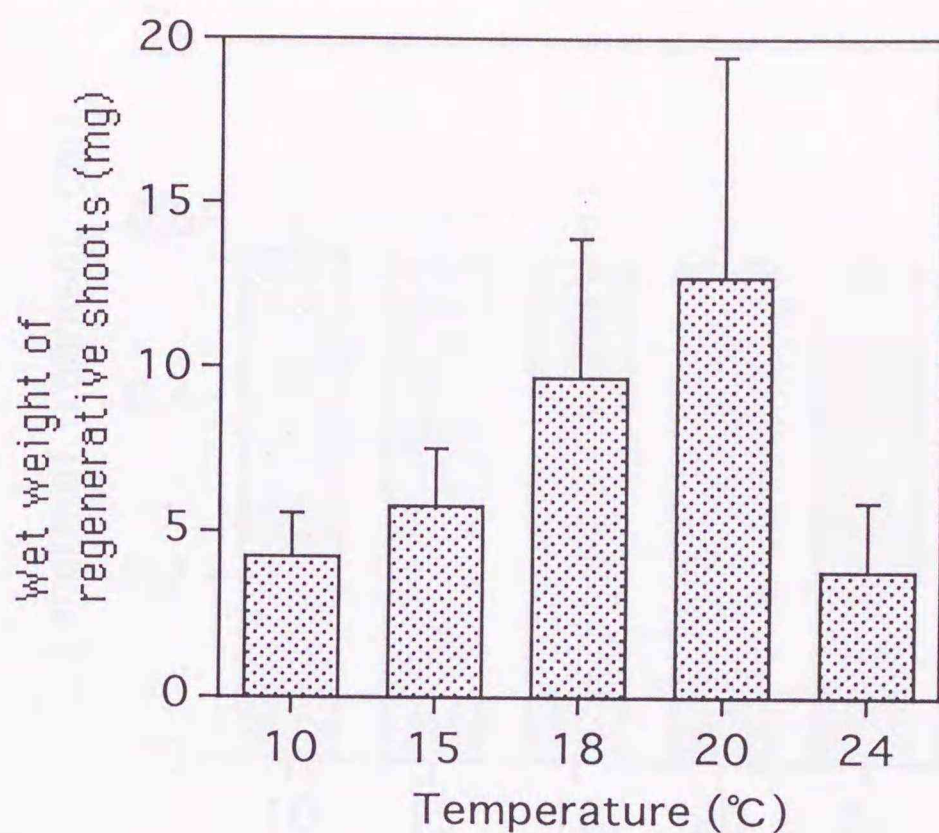


Fig. 20. Mean wet weight (mg) of regenerative shoots issuing from distal cut surface of one fragment depending on seawater temperature 88 days after wounding. Mean $\pm$ S. D..

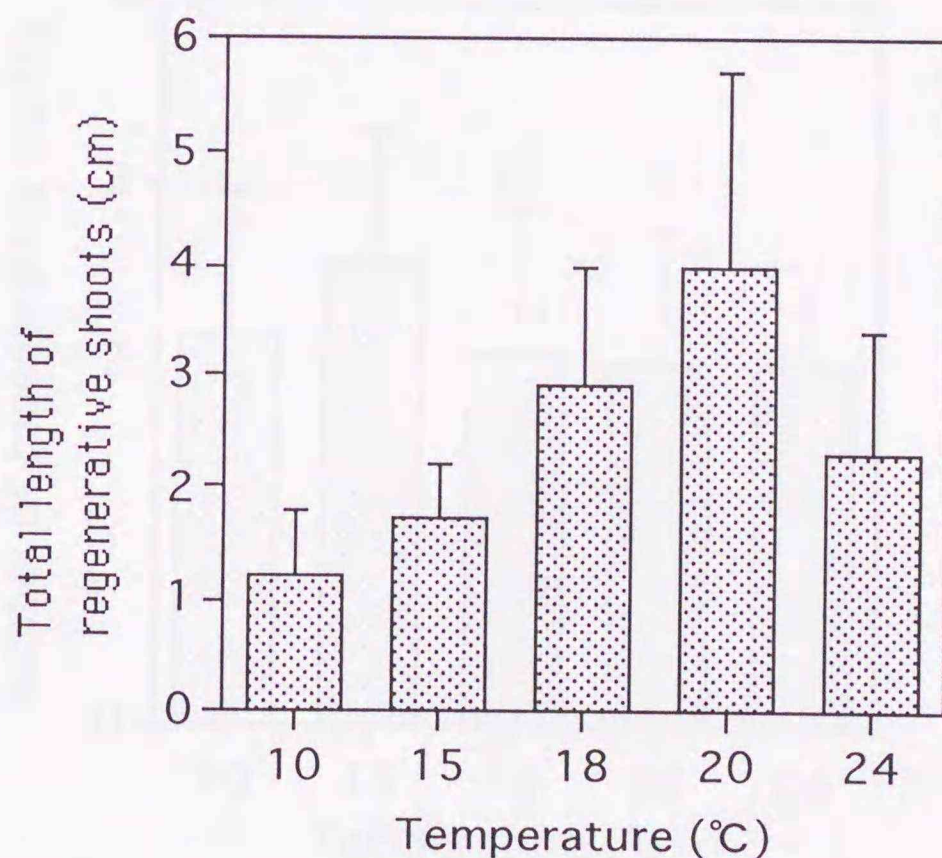


Fig. 21. Mean total length (cm) of regenerative shoots issuing from distal cut surface of one fragment depending on seawater temperature 88 days after wounding. Mean $\pm$ S. D..

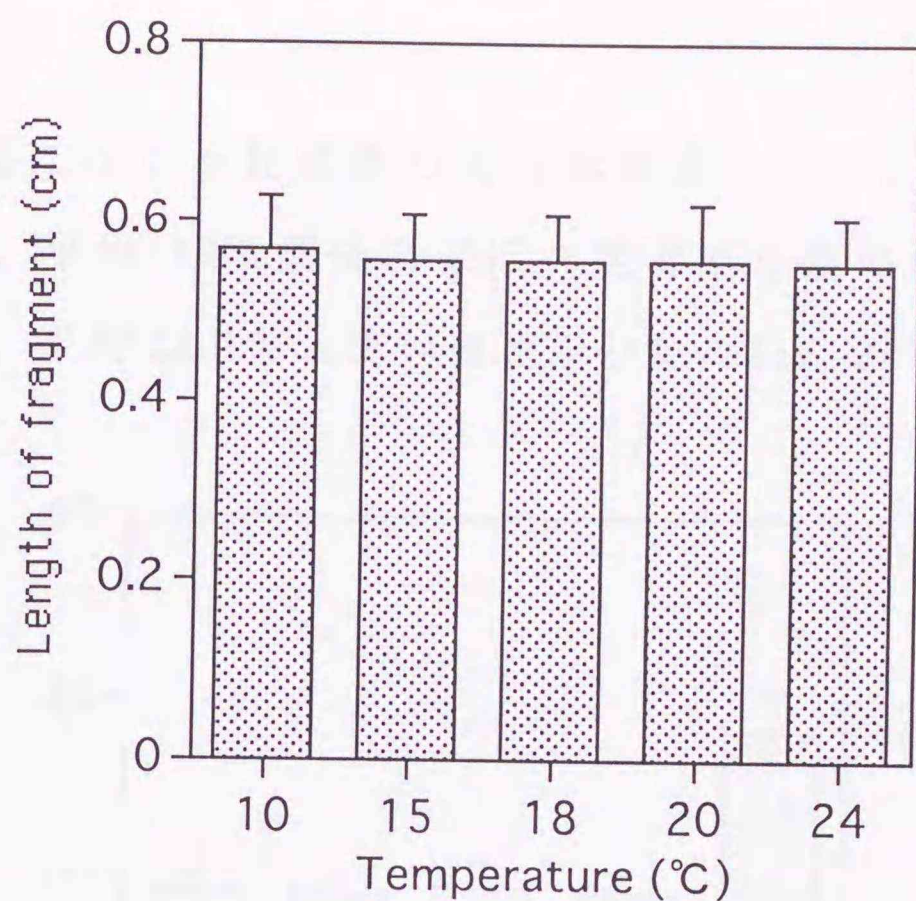


Fig. 22. Mean length of fragments (cm) 88 days after wounding. Mean $\pm$ S. D..

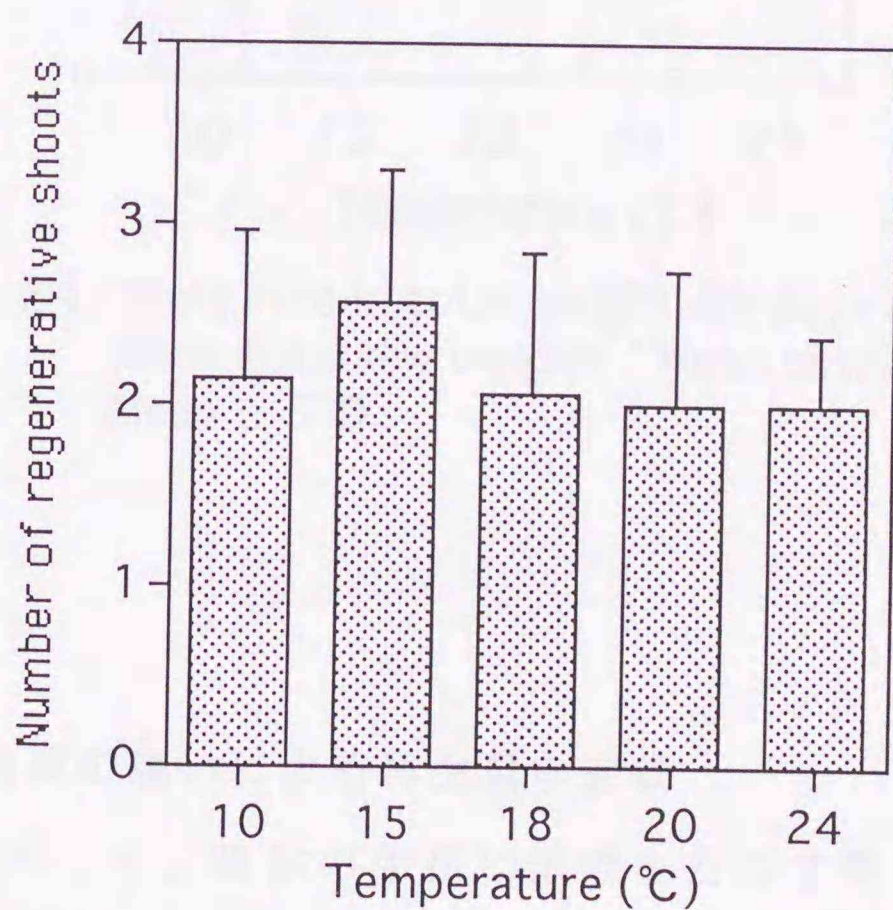


Fig. 23. Number of regenerative shoots issuing from distal cut surface depending on seawater temperature 88 days after wounding. Mean $\pm$ S. D..

湿重量に対する乾重量の比（歩留まり）は，10-20℃の範囲で18-21%，平均19%前後とほぼ一定であったのに対し，24℃では25-35%，平均28.1%と高い値を示した（Fig. 24）。

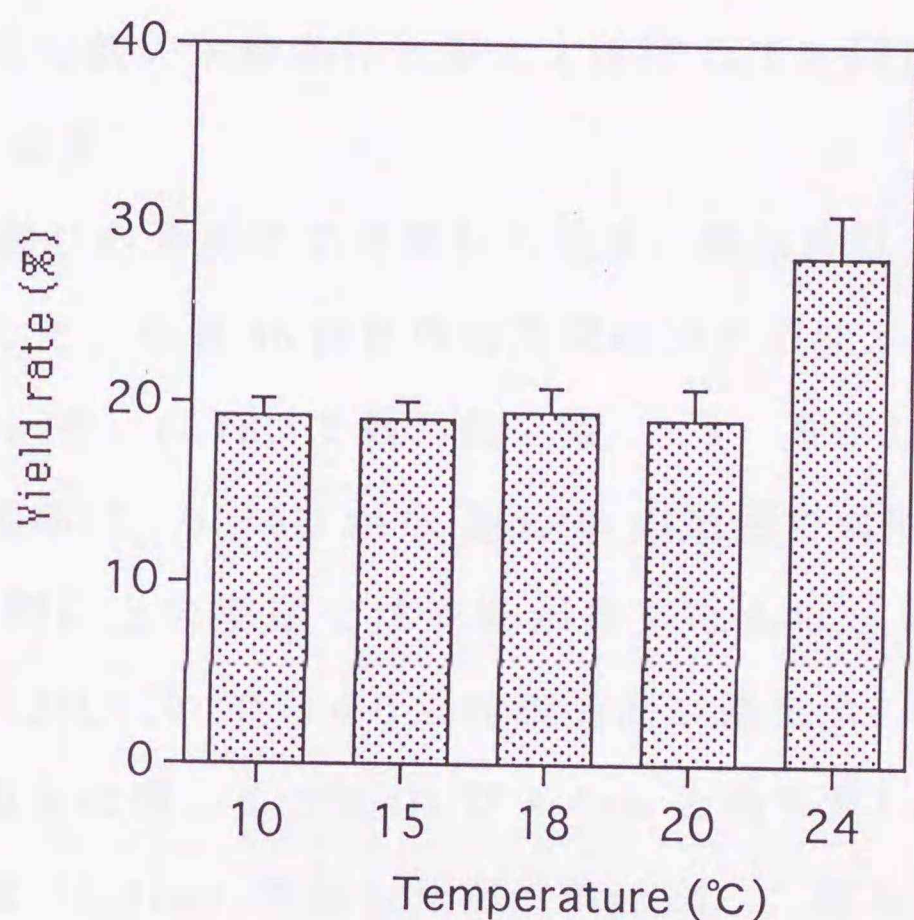


Fig. 24. Yield rate in total weight 88 days after wounding.
Mean total dry weight / Mean total wet weight x 100
Mean $\pm$ S. D..

4 光周期の違いによる再生量の変動

水温と同じく，藻体の生長に影響を及ぼす環境要因として光周期を挙げることができる。Edelstein ら（1976）は紅藻オゴノリ属植物の藻体を様々な光周期で培養し，生長に最適な条件を検討している。本実験でも再生に及ぼす光周期の影響を調べるため，様々

な光周期で藻体片を培養した。

a 材料と方法

藻体の側枝中央部から長さ 5mm の藻体片を切り取り，6L18D，8L16D，10L14D，12L12D，14L10D，16L8D，18L6D，20L4D，22L2D，24L0D の計 10 通りの光周期で，それぞれ 18 藻体片を静置培養した。その他の培養条件と測定方法は II-1 に同じである。

b 結果

10 通りの光周期で培養した結果，藻体片は全条件下で再生枝を形成した。培養 88 日目の湿重量増加率では，20L4D で最も高い値（5.0）を，6L18D で最も低い値（1.8）を示した（Fig. 25）。湿重量増加率は，6L18D から 20L4D の範囲では明期が長いほど高く，20 時間以上の明期では明期が長くなるほど逆に低下したが，全明期（24L0D）でも 4.0 と比較的高い値を示した。形成された再生枝の長さは同じく 20L4D で 4.4cm と最も高い値を，6L18D で最も低い値（1.5cm）を示したが（Fig. 26），藻体片本体の長さ（Fig. 27），および再生枝の本数（Fig. 28）はそれぞれ 0.5-0.6cm，2.1-3.3 本であり，各光周期による顕著な違いはなかった。

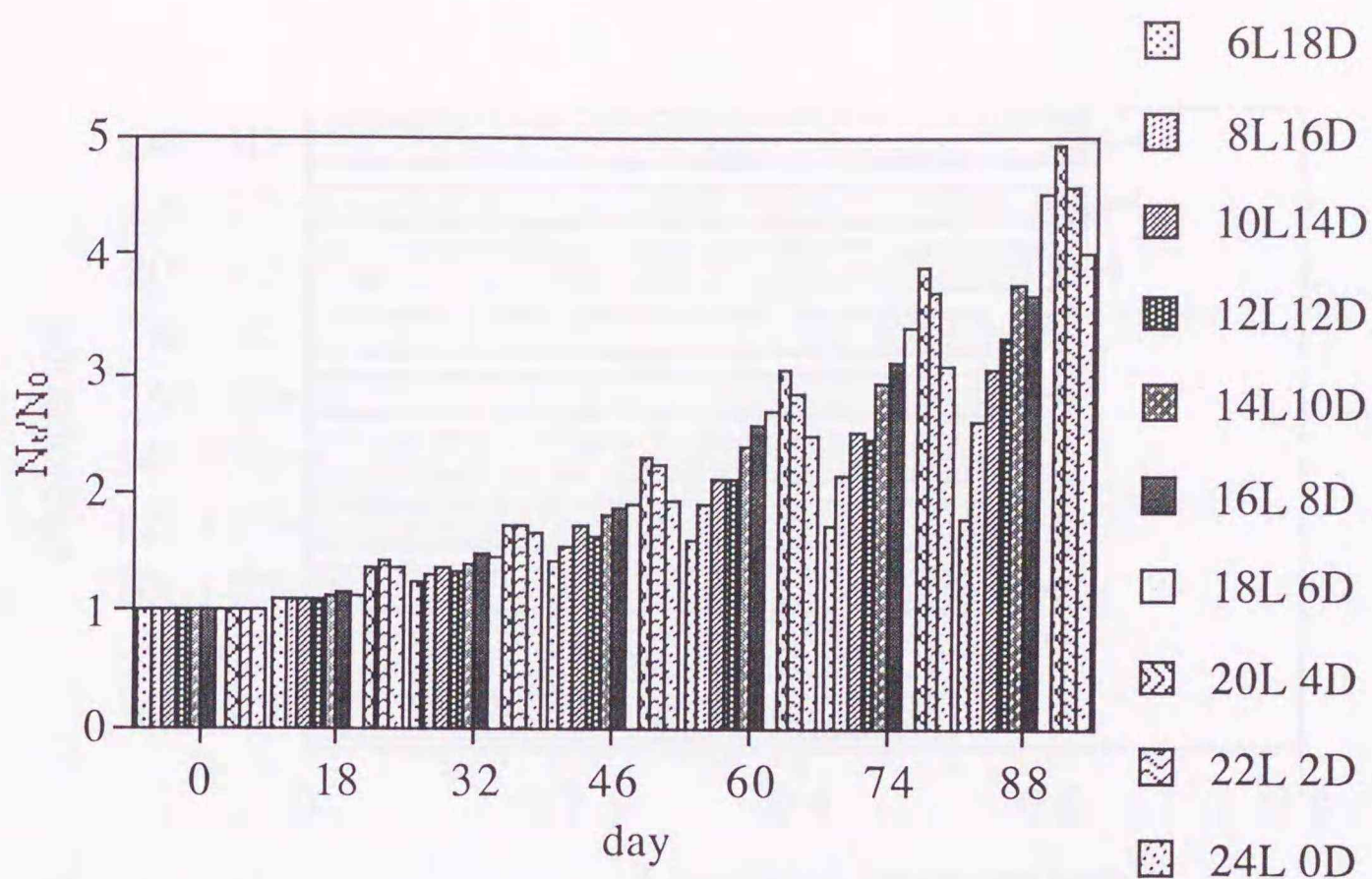


Fig. 25. Increase rate of total wet weight of fragments, including regenerative shoots, depending on photoperiod.

N_t / N_0

N_t : Mean of wet weight (mg) in t days in culture.

N_0 : Mean of wet weight (mg) at the beginning of culture.

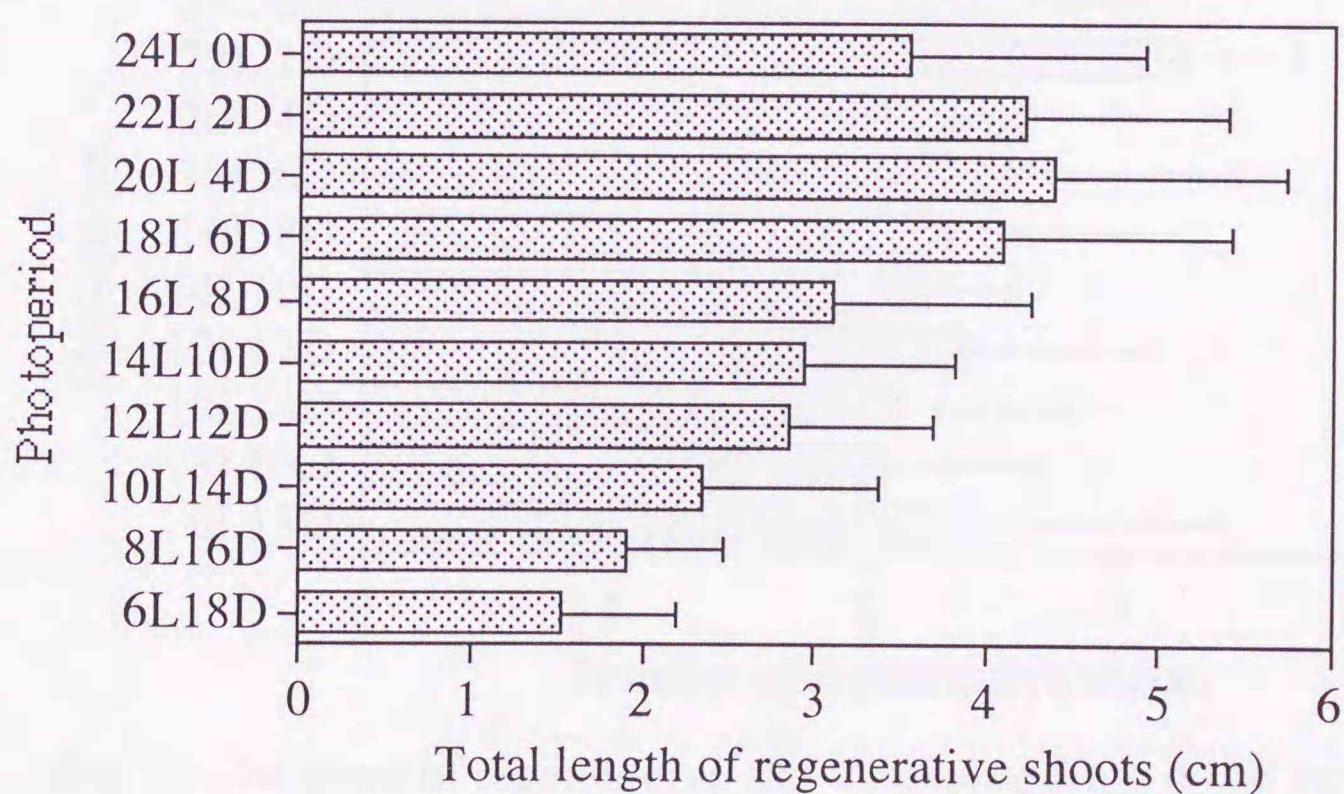


Fig. 26. Mean of total length (cm) of regenerative shoots issuing from distal cut surface of one fragment depending on photoperiod 88 days after wounding. Mean $\pm$ S. D..

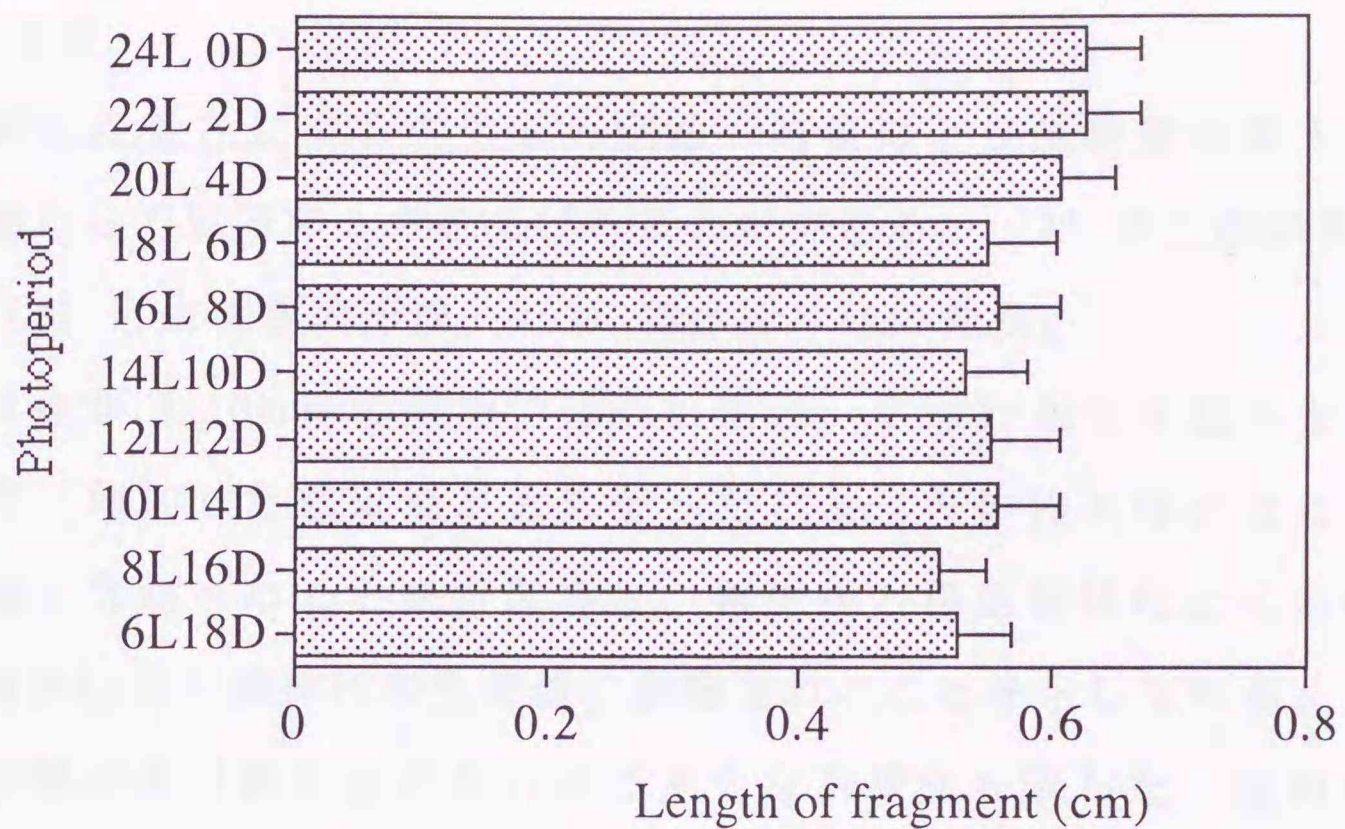


Fig. 27. Mean length of fragments (cm) 88 days after wounding. Mean $\pm$ S. D..

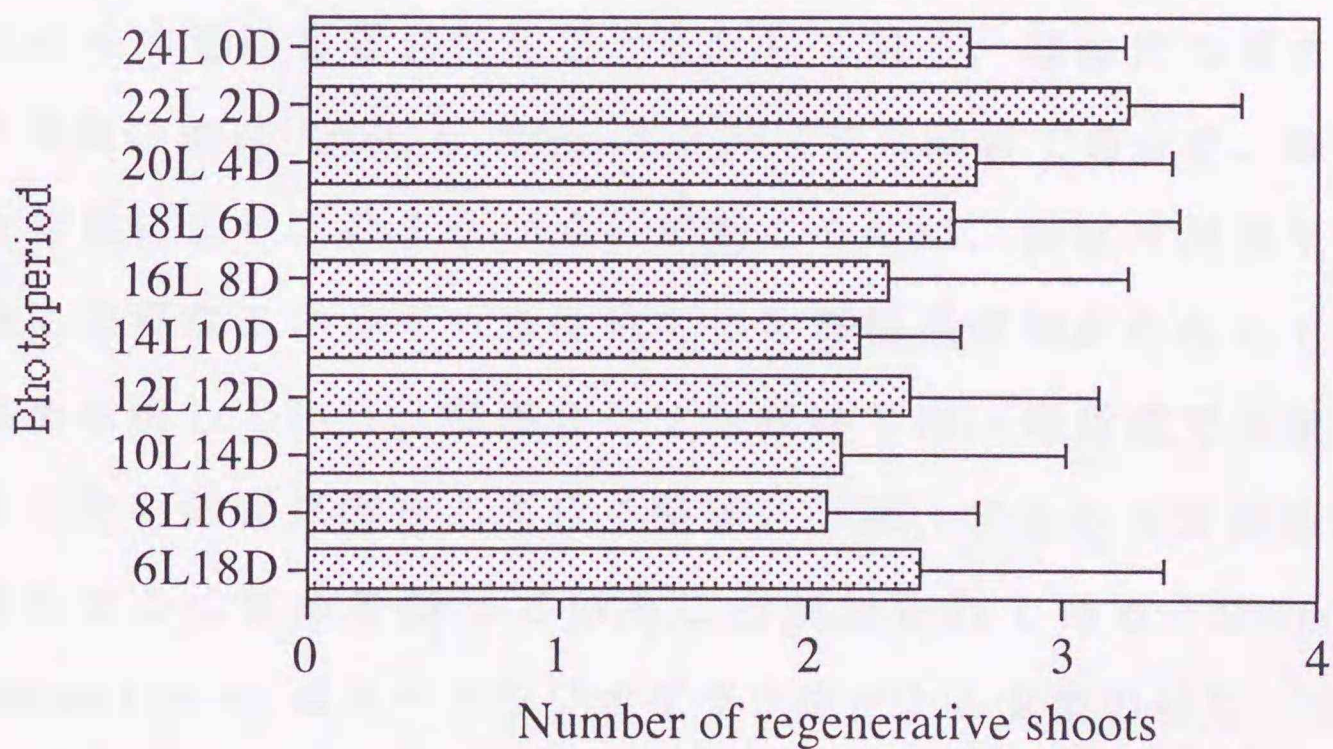


Fig. 28. Number of regenerative shoots issuing from distal cut surface depending on photoperiod 88 days after wounding. Mean $\pm$ S. D..

5 考察

藻体片の長さによる再生量の変動：培養により生物量が増大する要因として以下の3点をあげることができる：(1) 再生枝の形成，(2) 再生側枝の形成，(3) 藻体片本体の伸長。

藻体片が 1-30mm の範囲では長いほど，すなわち生物量が多いほど，増加した総重量が大きかったこと，藻体片本体がほとんど生長しなかったことを考えると，再生枝と再生側枝による生物量の増加は元の藻体片の生物量に影響されることを示している。

再生枝の数は藻体片が長いほど多くなる傾向を示した。全再生枝の平均湿重量では，1mm と 5mm 以上の藻体片との間に明確な違いが見られたが，5, 10, 30mm の藻体片間に有意差はなかった（危険率 5%）。この結果は再生枝の数や生物量も再生枝を形成する藻体片の生物量に影響されることを示しており，藻体片の長さによる再生量の差は 1mm と 5mm との間で特に顕著であった。藻体片の生物量によりこのような違いが起こるのは，藻体片が再生枝の生長に必要なエネルギーを供給する物質輸送機構が存在していることを示唆している。褐藻コンブ目植物では，光合成で生産した炭水化物を維管束植物と同じく藻体の下部，すなわち分裂組織に転流させる仕組みを持っていることが知られている。Schmitz and Lobban (1976) はオートラジオグラフ法による実験の結果，コンブの光合成産物が 1 時間に 50-780cm という維管束植物と変わらない速さで転流することを確認した。しかし，ツルシラモのように組織がほとんど分化していない海藻では物質の移動はごく少ないものと推察されていたが，本実験の結果は物質が流動している

可能性を示した。

再生枝による生物量の増大が 5mm 以上の藻体片でほぼ一定になっていること、再生側枝の形成が長い藻体片で顕著であったことは、先端側切断面という限られた部位からの再生のみでは生物量を増加させる手段としては限界があることを示している。藻体片本体の生物量が大きい場合には、再生枝による増加以上に生物量を増大させる手段として再生側枝を生じるのではないかと推察する。また、再生枝と再生側枝の生物量についての結果は藻体片内の物質輸送の距離的な限界を示唆している。すなわち、藻体片本体が持つエネルギーを離れている再生枝へ転流するより、より近い再生側枝へ供給していることを示している。10mm 以上、特に 30mm の藻体片で多数の再生側枝が形成されたが、これは再生枝のアピカルドミナンスは藻体片がある程度の長さを越えると、再生側枝の形成を完全には抑制できないことを示しており、アピカルドミナンスの距離的な限界を示唆した。

一藻体片当たりの生物量の増加は藻体片が長いほど、すなわち、元の生物量が大きいほど増加量も大きくなることが明らかになった。これは、5mm 以上の藻体片では再生枝による生物量の増加がほぼ一定になっているにもかかわらず、再生側枝が形成されるためである。一方、単位重量当たりの生物量増加率では、逆に藻体片が短いほど、すなわち、元の生物量が小さいほど増加率は大きくなった。培養によって藻体の生物量を増加させようとする場合、本実験で用いた藻体片の長さの範囲内では、藻体を短く切断するほど生物量をより増加させることが可能になる。海藻の生長の特性から見ると、再生枝、あるいは再生側枝はある程度の大きさに

なると元の藻体片の大きさにかかわらず生長するため、形成される再生枝と再生側枝の数がその後の生物量を左右する基本的条件になる。本属植物の増養殖では藻体片の再生力を利用していることを考えると、この結果は増養殖を行うに際し、より効率よく収穫量をあげるための基礎的な知見を提供するものである。Santelices and Varela (1995) はオゴノリ属 *Gracilaria chilensis* の再生について研究し、培養藻体の全長と総重量の増加は実験開始時の藻体片の長さ（生物量の大きさ）に影響され、藻体片が長いほど増加することを明らかにしている。本研究の結果はこれを裏付けるものである。しかし、藻体片を長くするほど、一藻体片当たりの収穫を多くすることができるとは、一方多くの種苗用藻体が必要になる。このため、実際の増養殖では、種苗として使う藻体片と、それによって見込める収穫量との兼ね合いを考えることが必要である。

藻体の部位による藻体片の再生量の変動：各部位の藻体片の再生による重量の増加は主軸、側枝ともに下部由来の藻体片で大きく、上部由来のもので小さかった。これは褐藻タマハハキモクの葉状体での実験や (Fletcher and Fletcher 1975), *Fucus vesiculosus* (Moss, 1964), および *Enteromorpha* (Eaton et al., 1966)での結果と一致する。しかし、Hales and Fletcher (1992)によるタマハハキモクの生殖器床の再生実験では、逆に先端側の藻体片でより早い再生が見られている。彼らは、この正反対の結果は栄養組織と生殖組織の体内ホルモン機構の違いに起因するものと推察している。本研究で見られた部位による差は、各々の組織を構成する細胞の生理状態に起因している可能性が強い。すなわち、頂端生長を行

う本種では藻体下部を構成する細胞ほど細胞年齢が高く，細胞自身の生長や葉緑体の活性がより安定した状態になっている。このため，傷害に対して素早く反応し，傷害組織の形成と再生生長を促すことが可能であったと考える。一方，細胞年齢が比較的若い上部の細胞はそれ自身の生長・成熟が未だ不十分であるため，傷害後も円滑に再生することができなかったと推察する。上部由来の藻体片本体の重量増加と伸長率が高い (Figs. 17, 18 参照) ことは，この仮説を支持している。この伸長は上部の組織を構成する未熟な細胞それぞれが生長した結果であろう。

再生枝の数が下部由来の藻体片で多く，上部のもので少なかった原因については，藻体片を構成する細胞の生理状態の差異に加えて，切断面の面積の違いを挙げることができる。再生枝が発出する場所は切断面の皮層部に限られているため，切断面の面積（皮層部の円周）が再生枝の数を制限する要因になっている。側枝（長さ 12cm）の上部と下部の太さを比べると，上部の面積は 0.21mm^2 (円周 1.63mm)，下部の面積は 0.34mm^2 (円周 2.07mm) と明らかな差を示し，形成する再生枝数と切断面の面積にある程度の相関があることを示している。

水温の違いによる再生量の変動：水温 10-24℃ の範囲での実験の結果，再生による湿重量の増加率は 20℃ で最大を示した。この結果は土佐湾産ツルシラモの体生長速度が 15℃ で最大であったことと異なる (Orosco and Ohno 1992)。これは再生と体生長の間の最適条件の違いと見ることもできる。しかし，予備実験で行った生長点を含む藻体片の培養でも同じく 20℃ で最大生長を示したことで，再生枝の伸長と一般の体生長との類似性を合わせて考えると，生

育地の水温の違い，および継代培養による馴化に影響されている可能性が強い。

10-20℃と 24℃との間で乾重量/湿重量（歩どまり）に大きな差がみられ，24℃では藻体の水分含量が特に低いことを示した。また，湿重量の増加率を生長率と定義した場合，24℃が最低生長率を示したが，乾重量での増加率は 20℃，18℃に次いで高かった。すなわち，生長率に対する最適水温は，10-24℃の範囲内では 20℃であるが，実入りの最適水温は 24℃であった。これは湿重量の増加（水分を含む生物量増加）に対する最適水温が，水分以外の成分（光合成産物など）の増加にとって必ずしも最適水温ではないこと，様々な条件で生長量を比較する実験の場合，何を生長の基準にするかによって結果が異なることを示している。今回見られた水分含量の差異は，生長と実入りに対する最適水温が異なることによるものと考える。ツルシラモが生育する地域の水温は，生長期の 4-5 月で 20℃前後，実入り期に当たる生育期後半の 6-8 月では 25℃を越えている。したがって，生長条件と実入り条件を明確に区別しなければならない。

光周期の違いによる再生量の変動：Edelstein ら（1976）は紅藻オゴノリ属植物の完全な藻体を光周期 12L12D, 18L6D, 24L0D の 3 通りで培養し，生長による湿重量の増大は 18L6D で最も大きいという結果を得た。今回の実験では，再生による湿重量の増加率は 20L4D で最も高く，Edelstein らの結果と比較的近いものであった。本属植物の藻体，あるいは藻体片の通常の培養に採用している光周期は 12L12D（Friedlander et al., 1993; Orosco and Ohno, 1992），16L8D（Kaczyna and Megnet 1993），8L16D（Destombe et al. 1993）

など様々である。今回明らかになった本種の再生生長に対する最適光周期は 20L4D で、一般に採用している条件に比べて明期が長い。藻体の培養で水温と光周期が生長速度、成熟、藻体内の生理状態などにもたらす影響は極めて大きい。Gargiulo ら (1994) は、紅藻アマノリ属 *Porphyra leucosticta* を様々な温度と光周期で培養した結果、殻胞子の形成には短日条件 (9L16D) と 15-18℃ の温度が、殻胞子の放出には短日条件と 18℃ が必要であることを明らかにした。また、Brodie ら (1994) は紅藻ツノマタ属 *Chondrus giganteus* f. *flabellatus* で、光周期が生活史に及ぼす影響を観察し、四分胞子形成と精子器形成は明期 12 時間以下で、嚢果形成は明期 10 時間以下で誘導されることを確かめた。藻体の培養実験に際しては、実験目的に適した温度、および光周期を採用することが必要である。

VI 傷害組織の形成とそれに伴う微細構造の変化

1 細胞分裂に伴う微細構造の変化

藻体の切断面に傷害組織が形成されることはいくつかの海藻で知られている。Hales and Fletcher (1992) は褐藻タマハハキモク *Sargassum muticum* の生殖器床を切断すると、切断面直下にある無傷の細胞が分裂して傷害組織を形成し、その後に生殖器床を再生することを報告した。また、Azanza-Corrales and Dawes (1989) は紅藻キリンサイ属 *Eucheuma alvarezii* var. *tambalang* で傷害回復の過程を詳細に研究し、切断面に隣接する無傷の細胞がその壁孔連絡部位から新細胞を伸長させ、その新細胞が分裂して傷害組織を形成することを観察した。さらに Bird ら (1977) が室内で培養した紅藻オゴノリ属 *Gracilaria* sp. の切断面に傷害組織が発達し、再生枝がその皮層部から生じることを確認した。このように藻体の一部が傷害を受けた場合、その部分に傷害組織（または新しい皮層）を形成する再生力は、食害や波などによる傷害に常に曝されている藻類にとって普遍的な能力である。

ツルシラモの天然藻体でも傷害を受けた部分に傷害組織を形成していることを確認している（II 参照）。また、藻体片を培養した場合、先端側切断面では皮層状、付着器側切断面では細胞塊状と、両切断面で異なったタイプの傷害組織を形成することを光学顕微鏡で明らかにした（III 参照）。しかし、光学顕微鏡では傷害組織の形成過程や細胞の内部構造を明らかにすることは困難である。

本研究では主として透過型電子顕微鏡（以下 TEM）により、傷

害組織を形成する際に見られる細胞内の微細構造の変化を経時的に観察した。

a 材料と方法

本実験で使用したツルシラモは鹿児島県喜入で採集し、実験室内で継代培養した未成熟四分孢子体である。藻体の側枝中央部から長さ 5mm の藻体片を藻体軸に対して垂直に切り取り、PES 培養液（ビタミン無添加）中で静置培養した。培養条件は光量 $60\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 、光周期 14L10D、水温 18°C 、換水は 5 日に一度行った。切断した藻体片を培養後 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10 日目に固定し、TEM（日立 H-7000）観察用に処理した。試料作成方法は IV-1-a に準じた。

b 結果

通常の葉状体の組織

ツルシラモの葉状体は皮層と髓層の 2 層で構成されている（Fig. 29）。外側を粘液層で覆われている皮層は細胞質が充満した直径約 $5\text{-}10\mu\text{m}$ の球形の細胞から成っており、それぞれの細胞は第一次壁孔連絡によってのみ繋がっている（山本，1973）。

体の中央部を構成する髓層は最大直径 $1000\mu\text{m}$ に達する大型の細胞から成っている。細胞の内部には液胞が発達し、隣接する細胞とは第一次壁孔連絡、および多数の第二次壁孔連絡によって繋がっている。細胞分裂は二次生長を行う皮層細胞で頻繁に起こるが、髓層細胞ではほとんど見られない。

ツルシラモの組織を構成する細胞は通常複数の核（直径 $2.25\text{-}3.5\mu\text{m}$ ）を有し、それぞれの核は電子密度の高い仁（直径 $1.5\text{-}1.75\mu\text{m}$ ）を一個持っている。葉緑体は一般に楕円形を呈し、長径が $1\text{-}4.5\mu\text{m}$ と幅があるが、いずれも内部に 2-8 枚のチラコイド膜を持つ。一般

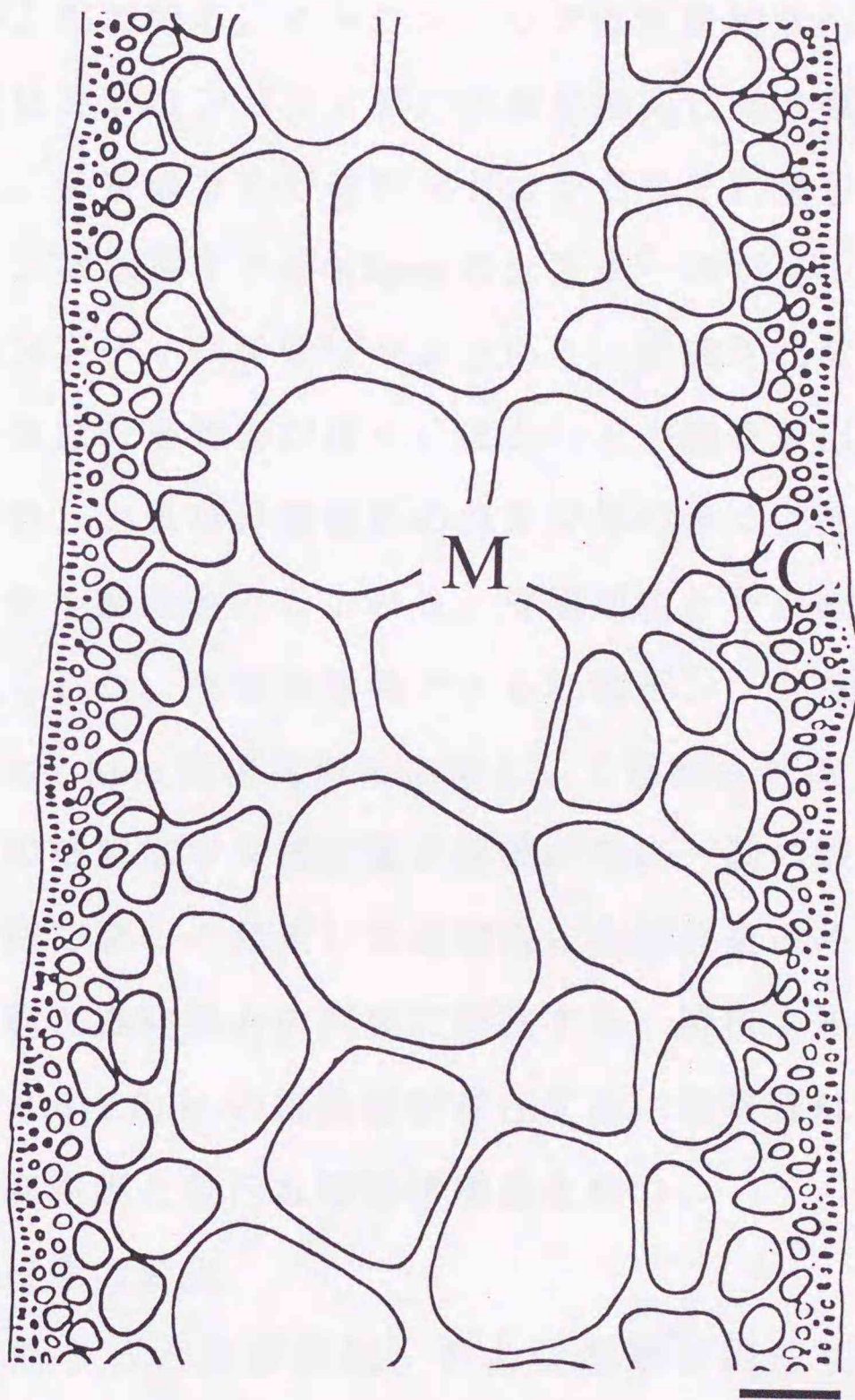


Fig. 29. Diagram of longitudinal section of *Gracilaria chorda*, showing cortex (C) and medulla (M). Bar : 100 μ m.

に長径が短いもののほどチラコイド膜の数は少ない。チラコイド膜は積み重ならず、ほぼ等間隔に平行に並んでいる。葉緑体はそれ自身の分裂によって数を増す。長径が短い、すなわちチラコイド膜の少ない葉緑体は、分裂細胞や最外層細胞内に多数存在するため、分裂直後のものと思われる。ミトコンドリアは直径約 $0.4\mu\text{m}$ の球形を呈し、内部にはミトコンドリア膜の内膜が陥入した多数のクリステを持っている。多数のゴルジ体がミトコンドリアに接した状態で存在する。ゴルジ体は長さ $0.6\text{-}0.8\mu\text{m}$ のシスターネが $4\text{-}5$ 枚積み重なって（この部分をディクチオゾームという）構成されている。髄層細胞のゴルジ体は分泌活動が低く、ほとんど小胞を放出しない。しかし、皮層細胞、および分裂細胞のゴルジ体の多くは外側面のシスターネから分泌小胞を放出している。皮層細胞と分裂細胞には多数の多胞体が見られた。光合成産物である紅藻デンプンは電子密度の低い、長径 $1.2\text{-}1.5\mu\text{m}$ の楕円形の小体として観察される。

ほとんどの細胞は中央部に電子密度が低い一個の液胞を持つ。液胞は髄層細胞で著しく発達して細胞内の大部分を占めるため、核と細胞質は液胞と細胞膜との間隙に局在する。隣接する細胞の細胞膜間には厚さ $0.6\text{-}2.0\mu\text{m}$ の細胞壁が存在する。細胞壁は比較的電子密度が低く、細胞膜と並行な繊維状構造を持つ。

切断後の組織の変化

藻体を切断すると皮層細胞、および髄層細胞は切断され (Fig. 30-1), 細胞質は流失する。しかし、切断された細胞の内側に直接接する無傷の細胞（以下隣接細胞と呼ぶ）では細胞の中央部を液胞が占め、その周辺には細胞質、および核が存在しており、通常の状態と変わらないように見える (Fig. 30-2, Plate 19)。

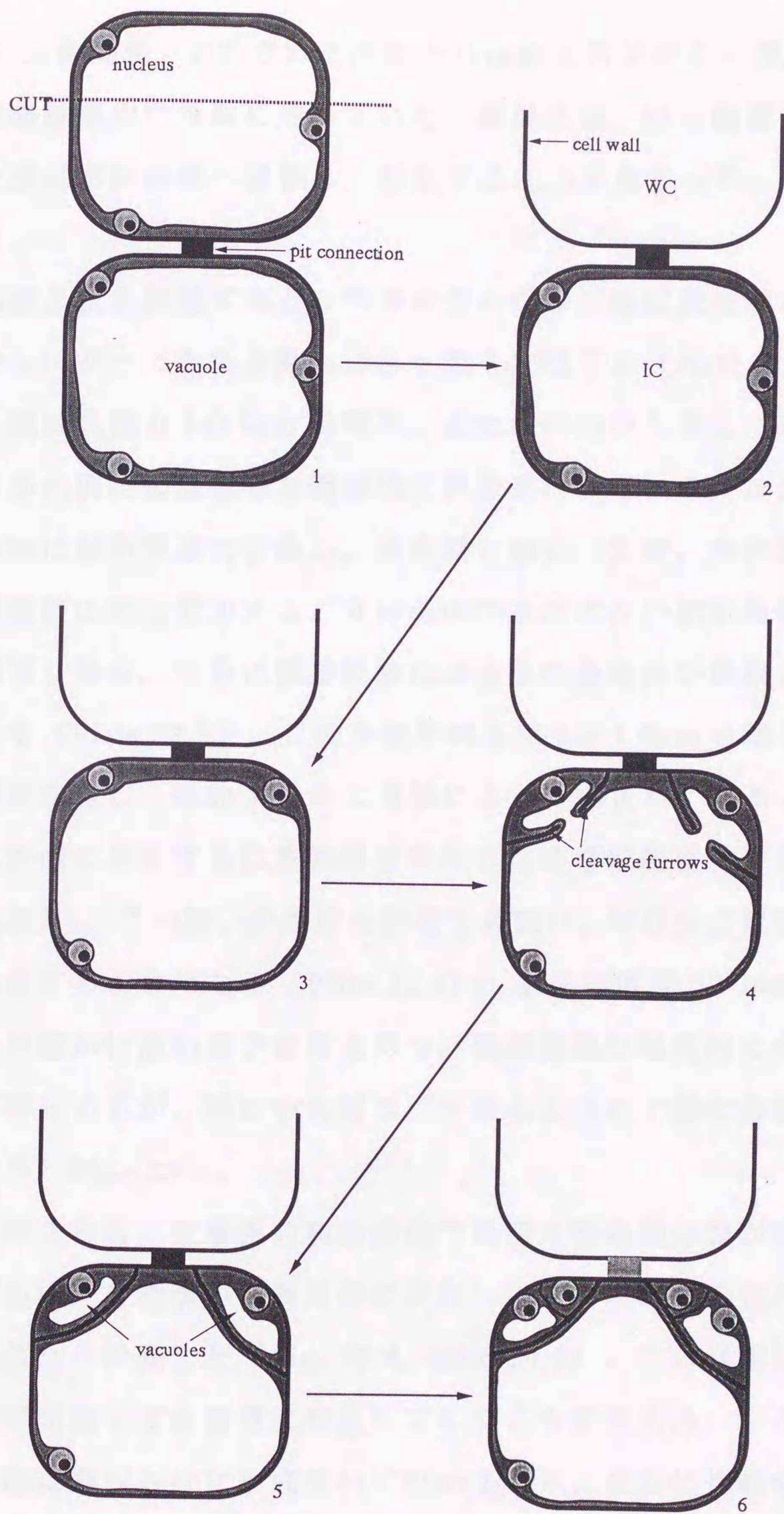


Fig. 30. Diagram of process in formation of new cells.

切断 24 時間後，切断された細胞からは細胞質が完全に流失し，細胞壁は隣接細胞の外側に残っている。隣接細胞，特に髄層細胞の細胞質と核は切断面側へ移動し，局在するようになる (Fig. 30-3, Plate 20)。

切断 2 日を経過すると，隣接細胞のゴルジ体は数を増し，細胞壁側のシスターネから多数の分泌小胞を放出する (Plate 21)。この分泌小胞は長径 $0.3-0.5\mu\text{m}$ の球形，または楕円形を呈し，電子密度は低いが内部にはまばらな繊維状の構造を持っている。放出された分泌小胞は細胞表面に移動し，細胞膜と融合した後，内容物を細胞膜と細胞壁の間に放出する。分泌小胞の放出に伴い切断面側の細胞壁は肥厚し始め，さらに隣接細胞には多数の多胞体が観察されるようになる (Plate 22-1)。この多胞体は長径 $0.6-1.0\mu\text{m}$ の球形，または楕円形を呈し，幅約 5nm の二重膜によって囲まれている。多胞体はその内側に存在する二重膜構造を持つ胞体を細胞壁内に放出する場合があります，この際，多胞体を囲む二重膜は，同じく二重膜の細胞膜と連続するようになる (Plate 22-2)。胞体は直径 $50-340\text{nm}$ で，周囲より僅かに高い電子密度を持つ。隣接細胞には同時に多数の葉緑体も存在するが，時に中央部でくびれるように 2 個に分裂する場合があります (Plate 23)。

切断 2 日目，皮層部の隣接細胞で最初の細胞質分裂が起こった。はじめに，分裂溝が切断面側に局在している細胞質を包み込むように両側から伸長した (Fig. 30-4, Plate 24-1)。この状態は既存の細胞壁が変形して分裂溝に伸長していくように見える。しかし，分裂溝は時に飛び石状に形成され (Plate 24-2)，さらに比較的電子密度が低く，電子密度の高い既存の細胞壁と構造上の相違を見せた (Plate

25-1)。新細胞を形成しつつある分裂溝は常に厚さ約 $0.2\mu\text{m}$ の細胞質に囲まれている (Fig. 30-4, Plate 25-2)。両側から伸長した分裂溝が中央で結合した結果、隣接細胞の切断面側に新細胞、すなわち隣接細胞の娘細胞が形成される。分裂溝は切断面とほとんど平行に伸長するため、長径 $10\text{-}30\mu\text{m}$ の新細胞は切断面に沿うように形成され (Plate 26)、分裂直後のため未だ cap membrane を形成していない第一次壁孔連絡 (Plate 27-2) で母細胞と結ばれている (Plate 27-1)。この新細胞は母細胞より細胞質に富み、その細胞質はほとんどの新細胞で切断面側に局在する。分裂溝を囲む細胞膜は、この第一次壁孔連絡を構成する plug core と分裂溝の間を通っている (Plate 27-2)。多胞体はその内容物を分裂溝内に放出するため、分裂溝内には二重膜の構造物が存在している (Plate 28)。伸長する分裂溝は時にその先端に紅藻デンプンを伴っている (Plate 29)。

切断後 3 日を経過すると、体の髓層部の細胞でも分裂溝が伸長し始め、細胞質分裂が起こった (Plate 30)。新細胞は皮層細胞の場合と同じく、切断面側に局在している細胞質を切り取るように形成されるため、母細胞に比べてはるかに小形であり、扁平で細胞質で満たされている。一個の細胞から複数の新細胞を形成する場合が多く見られた (Fig. 30-5, Plate 31)。

切断 5-7 日後、皮層部と髓層部の隣接細胞から形成された新細胞は切断面を覆うようになり、更に分裂して 2-3 層からなる連続的な傷害組織を形成する (Plate 32)。傷害組織の内側の細胞はより大きく、細胞の大部分を占める程に発達した液胞を含んでいる。一方、最外層の細胞は小さく、チラコイド膜が 2-3 枚のみで小形の (長径 $1\text{-}2\mu\text{m}$)、多数の葉緑体を持っており、液胞はそれほど発達してい

ない。この細胞は電子染色により比較的濃く染色される。切断された細胞と隣接細胞との間に存在する細胞壁は著しく肥厚し、厚さ約 $8\mu\text{m}$ に達する。この肥厚に伴い、両細胞をつないでいた壁孔連絡は隣接細胞から切り放されるが (Fig. 30-6), 切断された細胞の細胞壁は傷害組織が完成するまで残っていた。

傷害組織の最外層細胞はさらに分裂を繰り返し、細胞質に富む小形の細胞から成る組織を完成させる。

切断 24 日後、皮層状の傷害組織が完成する (Plate 33)。この傷害組織は隣接細胞の形状に沿って形成されるため、直線に並んではない。しかし、この細胞の大きさは直径 $5-10\mu\text{m}$ で、色素、および細胞質に富み、液胞はほとんど無いなど、体の皮層細胞と同じ特徴が見られた。この傷害組織はトルイジンブルーによる染色でも皮層と同じ呈色反応を示した。

2 新細胞の核数

TEM による観察の結果、切断によって露出した隣接細胞は、それぞれの切断面側に新細胞を形成することが明らかになった。すなわち、隣接細胞の切断面側で細胞の両側から分裂溝が伸長し、ここに局在している核、および細胞質を包み込むように分裂することも既に述べた。このようにして形成された新細胞は多量の細胞質と細胞小器官を持つが、常に単核であった。しかし、TEM による観察には 50nm 前後のきわめて薄い切片を用いるため、その細胞は単核であると断定することはできない。そこで本実験では、押しつぶし法により新細胞の核数を数えるとともに、新細胞の形成過程を制御する要因について詳細に検討した。

a 材料と方法

側枝中央部から長さ 5mm の藻体片を切り取り通常の条件 (II-1 参照) で培養し、培養 0, 1, 2, 3 日目に酢酸：エタノール=1：3 の固定液で固定した。固定後、組織片から切断面部分のみを切り取り、酢酸鉄ヘマトキシリン抱水クロラル染色液 (Wittmann, 1965) で染色後、押しつぶし法で観察した。

b 結 果

体細胞の核は直径 2-3 μ m の小体として認められる。培養 2 日目の藻体片で、隣接細胞から多数の新細胞が形成されつつあったが、分裂溝は隣接細胞が持つ複数の核のうち一個を取り込むように伸長した (Plate 34-1, 2)。分裂溝が中央部で結合して形成された新細胞は完成した直後では常に単核であった (Plate 34-3)。

3 考 察

細胞分裂に伴う微細構造の変化：ツルシラモの藻体が傷害を受けた際、直接切断された細胞だけが細胞質を失った。この点でタマハハキモクの生殖器床の場合と共通している (Hales and Fletcher, 1992)。彼らは切断された細胞と隣接細胞とを結ぶ原形質連絡が急速に崩壊する様子を観察しているが、ツルシラモの場合は両細胞間をつなぐ壁孔連絡の構造に急激な変化は起こらなかった。傷害反応に伴い Sealing mechanism が存在することは既に知られている。切断された細胞のみが細胞質を失った *Eucheuma alvarezii* var. *tambalang* では、傷害部位に隣接した 1～2 層の表層、および髄層細胞の壁孔連絡付近で蛋白質とフェノール物質が集積することが確認されている (Azanza-Corrales and Dawes, 1989)。このような化学物質は傷害部を

細菌などから保護するために形成され则认为られている。同じように隣接細胞から細胞質の流失が見られなかったツルシラモにも、保護物質の集積機構が存在する可能性はある。

タマハハキモクの生殖器床、および付着器では隣接細胞内の細胞小器官の数が増加することが明らかになっている (Hales and Fletcher, 1992; Givernaud et al., 1990)。ツルシラモでも同じ現象が起こり、特にゴルジ体は数を増すと同時に多数の分泌小胞を放出していた。この現象は隣接細胞の活性が高まっていることを示しており、傷害に対する藻体の最初の反応とみなすことができる。また、ゴルジ体が放出する分泌小胞は細胞壁構築に寄与することが一般に知られている。この放出現象はその後に起こる分裂溝の形成、および隣接細胞の細胞壁の肥厚に強く関与しているものと推察する。タマハハキモクでは切断後24時間以内に、露出した篩板の内側に細胞質の小繊維成分を凝縮しはじめ、その厚さは平均約 $0.9\mu\text{m}$ に達するという報告がある (Hales and Fletcher, 1992)。本研究では細胞壁の内側にそのような凝縮を確認することはできなかったが、それに代わる密閉機構として隣接細胞の細胞壁の肥厚が起こった。さらに、2個に分裂している多数の葉緑体を確認したが、これは後に傷害組織の最外層細胞に見られる多数の未成熟な葉緑体であろう。

隣接細胞、特に液胞が発達している髓層部の隣接細胞で、細胞質、および核が切断面側に移動する現象が見られた。新細胞は頂端分裂細胞、あるいは皮層細胞と同じく液胞を持たず、分裂能力を有する細胞へと分化し、傷害組織と再生枝を形成する。隣接細胞(母細胞)の核を含む内容物が切断面側へ移動し、局在することが新細胞(娘細胞)の形成を可能にしている。したがって、この核と細胞質の移

動は新細胞の形成と再生にとって不可欠な現象である。核、および細胞質の移動は原形質流動によって起こるものと考えられている。紅藻の原形質流動はカザシグサ属 *Griffithsia pacifica* で確認されている (Pueschel, 1990) が、ツルシラモで見られた核と細胞質の移動はこの存在を示唆した。

切断 2 日目に、隣接細胞で分裂溝が伸長し切断面側に新たな細胞を形成した。切断から最初の新細胞が形成されるまでの期間は、褐藻ホンダワラ属 *Sargassum filipendula* の茎状部で 3 日目 (Fagerberg and Dawes, 1976) , タマハハキモクの生殖器床で 3 日目 (Hales and Fletcher, 1992) , ヒバマタ属 *Fucus* sp. の葉状部の皮層で 2 週間目、髓層で 3 週間目であり (Fulcher and McCully, 1971) , いずれもツルシラモの場合より長い時間を要している。オゴノリ属植物の大部分の体細胞は多核であるため、新細胞を形成する際に核分裂を伴う必要はなく、複数の核の一個を取り込んで新細胞を形成することができる。したがって、他の単核細胞を持つ種よりも短期間で新細胞を形成することが可能であろう。一個の髓層細胞が複数の新細胞を形成したのは、新細胞が複数の核のそれぞれを取り込んだ結果であり、その後の傷害組織の迅速な形成に寄与しているものと推察する。新細胞の形成様式について、Azanza-Corrales and Dawes (1989) は *Eucheuma alvarezii* var. *tambalang* で隣接細胞の壁孔連絡から細胞自体が伸長して新細胞を形成し、その新細胞の分裂によって傷害組織を形成すると述べている。しかし、ツルシラモの新細胞の形成様式は母細胞自体の分裂であり、明らかに異なっている。タマハハキモクでは最初の有糸分裂は切断 3 日後に起こったが、切断面に直接隣接する細胞に起こるのではなく、さらに内側の 2 細胞目の細胞で見ら

れた(Hales and Fletcher, 1992)。Klepacki ら(1995) はツルシラモが属するスギノリ目 *Agardhiella subulata* の頂端細胞の分裂では細胞の両側から分裂溝が伸長し、細胞をほぼ二等分する過程を観察している。本種でも初期発芽体の頂端部で同じ分裂様式を観察している (Plate 35-1, 2)。ツルシラモの傷害に対する新細胞形成の分裂様式はこれに類似しているが、娘細胞は母細胞に比較して小形であった。特に髓層細胞では著しく小さい不等割分裂であった (Plate 30)。従来、オゴノリ属植物では髓層細胞が分裂することは知られていなかったが、髓層細胞も潜在的に分裂能力を有することを確認した。さらに、新細胞を形成するために伸長する分裂溝は、既存の細胞壁が変形して伸長しているかのように見えるが、分裂溝は時に不連続に形成されること、隣接細胞の既存の細胞壁と構造が異なっていること、さらに伸長する分裂溝は常に細胞質に囲まれていることから、周辺に存在する細胞質が細胞壁物質を沈積させ、分裂溝を新たに構築するものと考えられる。伸長する分裂溝の先端に紅藻デンプンが存在していることから、分裂溝の構築にはこの物質が関与しているものと推察する。

Delivopoulos and Tsekos (1986) は紅藻オゴノリ *G. verrucosa* の果胞子の形成過程を詳細に観察し、多胞体がその内容物を果胞子の外側に放出した後、果胞子を取りまく細胞壁が著しく肥厚することを報告している。ツルシラモでも隣接細胞に多数の多胞体が出現し、その内容物を切断面側の細胞壁内、および分裂溝内に放出している現象を確認した。このような現象から、多胞体も隣接細胞の細胞壁の肥厚、および分裂溝の形成に関与しているものと推察する。

両側から伸長する分裂溝は切断面側に局在する核と細胞質を包み

込むようにして新細胞を形成した。母細胞と新細胞をつなぐ壁孔連絡は、新細胞の形成直後に周辺の細胞質より多少電子密度の高い構造体として認められるが、この時点では cap membrane を持っていない。しかしその後、傷害組織を構成する細胞は通常の体細胞に見られるような cap membrane を持つ壁孔連絡で繋がるようになることから、前述の cap membrane を持たない壁孔連絡は形成過程初期の構造である。

分裂溝は切断面とほぼ平行に伸長したため、新細胞は個々の隣接細胞から切断面に沿うような形で形成され、あたかも皮層細胞の観を呈する。この新細胞はさらに分裂を繰り返して傷害組織を造っていくが、その過程で切断された細胞と接触している新細胞の切断面側の細胞壁は、細胞壁物質の沈積により著しく肥厚する。このため切断された細胞と隣接した新細胞とをつないでいた壁孔連絡は、新細胞から細胞壁物質によって隔てられる。壁孔連絡の中心部分は sulfate と carboxyl 群を含む acid polysaccharide-protein からなり、能動輸送に関与していると言われている（千原，1997）。もし、壁孔連絡が細胞間の輸送を担う器官であるなら、今回観察した壁孔連絡の分離は、隣接細胞の細胞質などが壁孔連絡を通して流失するのを防ぐ反応と見ることができる。壁孔連絡の機能は、紅藻の細胞間連絡機構の有無にも関係する重要な事項であり、今回見られた壁孔連絡が新細胞から隔離される現象は、非常に興味深い。

細胞壁の肥厚は比較的長い時間を要する反応である。Hales and Fletcher (1992) はタマハハキモクの生殖器床で、切断後 1 日以内に隣接細胞の既存の細胞壁の内側に、後に新細胞壁になる小繊維成分が凝集したことを報告している。彼らはこのような急激な細胞壁物

質の沈積は、外界に露出した既存の細胞壁が3日以内に変質するために不可欠なものであると述べている。ツルシラモでは隣接細胞の細胞壁がこのような急激に構築されることはなかったが、細胞質は流失することなく細胞内に留まっていた。この理由は、切断された細胞の細胞壁が最後まで切断面に残っており、これが密閉機能を果たしていることによるものと推察する。 Azanza-Corrales and Dawes (1989)は、*Eucheuma alvarezii* var. *tambalang* の切断された細胞の細胞壁は傷害組織が1～2層になるまで（切断後12日まで）保持されていたと報告している。本研究、および彼らの実験では静置培養を行い、天然で起こるような海水の動きを与えなかった。従って、天然で藻体に対する傷害が起こった場合、切断された細胞壁が長時間残存するような状態が続くとは限らない。今後は水の動きを与えた実験を行うことも必要である。

新細胞が分裂して形成する傷害組織は構造上通常の皮層と変わらない。*Eucheuma alvarezii* var. *tambalang* の傷害組織は5層からなっているが、組織化学的方法によって通常の皮層と生理的に同じであることを確かめている (Azanza-Corrales and Dawes 1989)。本実験でも藻体の皮層と傷害組織が類似したトルイジンブルー呈色反応を示すことを確かめた。これは、傷害組織を構成する細胞が形態的にも機能的にも通常の皮層細胞と同一であることを示している。したがって切断によって露出することになった皮層、および髄層部の細胞は、この傷害組織の完成によって元の藻体の皮層と同じ組織で囲まれ保護されたことになる。この時点で切断という急激な環境変化に対する組織の一連の防御反応を完了する。

新細胞の核数：紅藻の細胞質分裂については、特に頂端分裂細胞

について研究されている。Klepacki ら(1995)はスギノリ目 *Agardhiella subulata* で頂端細胞の分裂を観察した際、核分裂後 2 個の核を持つ頂端分裂細胞が単核の 2 細胞に均等分割されることを報告している。今回の研究では複数の核を持つ隣接細胞が新細胞を形成する過程を観察し、この新細胞は常に単核であることを確かめた。新細胞の形成からある程度の時間を経ていると予想される切断 3 日後の組織では、希に 2 核の細胞も見られたが、これは形成当初は単核であったが、その後の細胞分裂に備えて核分裂を行った結果であろう。すなわち、切断により隣接細胞から形成される新細胞は常に単核であり、新細胞は母細胞中の複数の核のうち一核のみを取り込むことを確認した。これは第二次壁孔連絡の形成過程で *conjunctor cell* を生じる際の分裂様式と共通している。

新細胞が常に単核であるのは、切断という環境変化に対し隣接細胞内の複数の核それぞれが独自に分裂溝を形成した結果である。TEM による観察で、一個の隣接細胞が複数の新細胞を形成することを確認することができた。前述の通り、新細胞形成までに要する時間は他種よりかなり速い。これは隣接細胞に複数の核が存在するので、単核細胞より短時間での細胞分裂（新細胞形成）が可能なのである。これがまた、傷害組織を迅速に形成し、効率良く傷害を修復することに繋がっている。

VII 総合考察

本研究はツルシラモ藻体の一部を培養し、そこに見られる再生現象を観察したものである。海藻の組織培養の研究は、Chen and Taylor (1978) が紅藻ツノマタ属トチャカ *Chondrus crispus* の葉状部の髄層部切片を液体培地で無菌培養し、その色素体を持たない無色の組織片から藻体を再生させることに成功したのが始まりである。その後、主として褐藻の多数の種で組織培養が試みられてきた。紅藻では、アガロース、カラゲナンなどの有用多糖類源として重要なツノマタ類やスギノリ類 (Sylvester and Waaland, 1983)、食用として重要なアマノリ類 (Polne et al., 1984) などで組織培養が行われている。オゴノリ属では Kaczyna and Megnet (1993) がオゴノリ *Gracilaria verrucosa* の組織片の生長に対するグリセロール、および植物ホルモンの濃度の影響について行った研究がある。海藻組織培養の初期の研究では、偶然に生じたカルス様組織を海藻用の一般培地で培養するという初歩的なものであったが、その後の組織培養専用の培地や簡便な無菌培養法の開発により、高度な研究へと進んでいる。本研究の培養には通常の培地である PES を用い、藻体片を単藻培養する簡便な方法を採用した。この培養方法でも再生は起き、本研究の目的には充分であったが、さらに知見を深めるためには髄層部、カルス、単一細胞の無菌培養や特定物質が再生に与える影響などを調べる必要がある。

再生とは傷害などの理由で失われた部分を修復する機構であるが、維管束植物では枝の基部側切断面に起こる不定根の形成や、茎にくさび状の切れ込みをいれた際の維管束細胞の分化などがそれに当た

る。本研究では、藻体に切断という機械的傷害を与えることによって傷害組織（新皮層）や再生枝、仮根様組織といった代替器官が生じることを確かめた。この組織と形態を形成する能力についてみると、ツルシラモの組織はきわめて高度に組織化された再生機構を持つことを示した。しかし、高等植物では傷害に対する反応は器官と組織の形成反応だけではなく、生化学的反応も存在することが明らかになっている。高等植物体の表皮外側の細胞壁には脂肪性高分子のクチン、あるいはスベリンが沈積しており、これが保護的役割を果たしている。このような組織体が切断傷害を受けて内部の細胞が露出すると、その細胞はスベリンを形成する。従って、スベリン化は傷害に対処する保護物質形成の基本的初期過程と考えられている（今関，1991）。海藻については高等植物ほどの詳細な知見はないが、紅藻キリンサイ属 *Eucheuma alvarezii* var. *tambalang* の傷害回復過程で、傷害面に隣接する細胞の壁孔連絡（pit connection）にタンパク質、およびフェノール類が凝集することが知られている（Azanza-Corrales and Dawes, 1989）。今後再生に関する研究を一層深めるためには、外部的、内部的形態形成のみならず、このような生化学的反応、さらにはこの反応を引き起こす傷害応答誘導因子を検討しなければならない。

極性（polarity）とは細胞、細胞集団、組織または個体が上下、左右、前後などの相対的位置関係で、形態的または物質の局在などによる生理的な差を示すことをいう。形態形成の場合、構造や機能に方向性が認められる場合に多く用いられる。例えばプラナリアの切片が再生する場合に、前方に向いた切断面からは頭部、後方に向いた切断面からは尾部を生じるが、この場合、これを説明する要因と

して極性という概念が用いられる。高等植物では全く異なった構造と機能を持つ茎頂と根端の生長点によって伸長し、その2点間を結ぶ軸上には明らかな構造的、生理的方向性がある。19世紀後期に Vöchting (1878) はヤナギの枝の一部を切り取り、天地を逆に配置した場合でも根端側からは根が、茎頂側からは芽を出すことを確かめた。彼はこの生理的な方向性に対して極性という用語を当て、植物生理学に新しい概念を導入した。彼はまた組織や器官に見られる極性が非常に安定しているのは、個々の細胞が極性を持ち、それを発現するためであろうと考えた。

しかし、多細胞の組織を使って個々の細胞の極性を研究することはきわめて難しい。そのため今までに行われてきた極性の研究では、ほとんどが単細胞である胞子や接合子の発芽期、およびその初期発芽体の細胞が一行に並んだ段階を利用してきた。この細胞は培養が簡単であり、他の組織で囲まれていないため外部からの処理や顕微鏡による観察も容易だからである（和田，1991）。

卵の極性は後に形成される胚の体軸の方向と密接な関係がある。褐藻ヒバマタの卵については過去多くの研究が行われている。この種では一度に多数の卵細胞を得ることができ、かつ受精を人為的に制御し、発生時期をずらすことができること、接合子は球形で外部環境による極性軸の誘導方向が任意に設定できること、誘導後接合子は同調的に発達することなど、極性の研究材料として有利な特性を持っている。

ヒバマタ卵についてのこれまでの研究の結果、極性を誘導しうる外部環境要因は多数知られるようになった。光、電流、イオン濃度、水流、温度差など、また他の個体との位置関係や精子の進入位置も

極性軸の決定に関係している (Jaffe, 1968)。このような要因を制御することにより、極性のない卵細胞に極性軸を誘導することが可能にはなったが、これだけで極性を完全に理解できたとは言えない。極性が既に確立している細胞をもう一度脱極性化したり、極性軸を逆転（極性反転）できるようになれば、極性を制御している生理的機構を更に深く理解することができる。

この極性反転は下等な動物でいくつか報告例がある。例えば2匹のヒドラの上端を切り落とし、切り口を向かい合わせて一直線になるように結合し、次いで結合面の近くで一方のヒドラの大部分を切り落とし再生を起こさせると、後者は極性を反転して本来の基部へ向かって触手を再生する。再生しつつある組織がこれに接する、より強力な組織の影響を受け本来の極性を転換する現象と見られる。しかし植物の場合、遠心処理をはじめ、サイトカラシンやコルヒチンなど細胞骨格の破壊剤、重合阻害剤による処理などの試みにも拘わらず、わずかの例外を除き極性を逆転することには成功していない。多核嚢状体である緑藻ハネモ *Bryopsis* は極性を逆転できる例外の一つである。両端を切断したハネモの管状細胞片をコルヒチンで処理し微小管を脱重合させた後、この細胞片にコルヒチン無処理の細胞片をいろいろな方向の組み合わせで接ぎ木し、その後の葉状体と仮根の再生を調べている。コルヒチン無処理細胞片の端にコルヒチン処理細胞片の端を向き合わせて接ぎ木すると、処理細胞片では無処理細胞と同じ方向の極性が誘導され極性は逆転する。この時、処理細胞片の微小管の＋一端の配向は元々の方向とは逆転している。しかし、無処理細胞片の仮根端側に処理細胞を接ぎ木した場合には、極性の転換は見られない (津布楽・和田, 1989)。このような単細

胞，あるいは嚢状性藻類の極性に関するいくつかの知見は，構造の複雑な多細胞体制の植物の極性を理解する上での足がかりにはなりうる。しかし，高等植物ではインドール酢酸（IAA）の基部に向かう極性移動など，単細胞段階には見られない独特の極性現象が知られている。したがって，ツルシラモのような多細胞藻類の極性を解明しようとするならば，ヒバマタの卵やハネモで得られた知見を基に，組織を構成する細胞間の構造的，生理的連絡を見極めることが必要と考える。

紅藻の微細構造の研究は比較的古くから行われている。その結果，葉緑体の積み重ならないチラコイド膜，フィコビルン色素顆粒，壁孔連絡，紅藻デンプン粒など，紅藻に特有な細胞構造が確認されている（Pueschel, 1990）。紅藻の微細構造的研究の重要性が認識され，今日に至るまでの研究で多くの知見を得ている。

紅藻のゴルジ体（ディクチオソーム）は，一般に扁平嚢（シスターネ）が4-15枚積み重なっている。ゴルジ体は活発な栄養細胞に存在するが，孢子形成の際は特に顕著に見られるとの報告がある（Delivopoulos and Tsekos, 1986）。本研究では隣接細胞内部，特にその切断面側に多数のゴルジ体が存在し，多数の分泌小胞を放出していることを確認した。分泌小胞の内容物は主としてペクチン合成に関与する前駆物質や酵素で，細胞壁の表面積の増加に役立つとされている（植田，1979）。最外細胞壁の肥厚を伴う孢子細胞や，同じく細胞壁を肥厚させ，細胞質分裂を行う隣接細胞で多数のゴルジ体が形成されるのは必然的な現象である。また，ゴルジ体に接してミトコンドリアが存在していたが（Plate 21），両者の結合は紅藻では一般的である（Pueschel, 1990）。さらに，隣接細胞には多数の多胞

体も確認された。多胞体はゴルジ体が放出した小胞を取り込んだ構造体と言われているため（植田，1979），ゴルジ体の活性の増加に伴って形成されたものと推察する。同時に，多胞体が内容物を細胞壁や分裂溝内へ放出している現象も観察した。多胞体は加水分解酵素を多量に含んでおり，その周囲の細胞質を取り込んで分解していると言われている（植田，1979），放出された内容物も分解された細胞質構成物と推察する。紅藻オゴノリ *G. verrucosa* の果胞子の形成過程で，多胞体はその内容物を果胞子の外側に放出した後，果胞子を取りまく細胞壁が著しく肥厚したという報告がある（Delivopoulos and Tsekos, 1986）。これは放出された多胞体内容物が細胞壁，または分裂溝の構築の材料に使用されていることを示唆しているが，更なる知見の蓄積が必要であろう。

紅藻の単核性細胞の分裂は，核分裂前期に初期の分裂溝が現れ，細胞質分裂と核分裂が同時に進行するが，ツルシラモのような多核細胞の場合，細胞質分裂と核分裂は直接的に関連しない。本研究でも TEM による観察の結果，隣接細胞での新細胞の形成は既存の核を取り込むようにして起こり，核分裂像は新細胞を形成する過程ではなく，新細胞に取り込まれた後の核で確認されている。すなわち，本種が多核であることが核分裂を伴わない新細胞の形成（細胞質分裂）を可能にしている。一方，一核の新細胞の分裂は核分裂と細胞質分裂が並行して起こる，一般的な細胞分裂である。分裂溝の伸長は隣接細胞の両側から求心的に起こったが，これは紅藻では一般に見られる分裂様式である。Klepacki ら（1995）はツルシラモが属するスギノリ目植物 *Agardhiella subulata* の頂端細胞の細胞分裂を初めて詳細に観察し，分裂溝の求心的な伸長を報告している。

分裂溝が結合した部分に壁孔連絡が観察された。真正紅藻亜綱では、細胞間を形成しない完全な細胞分裂が起こるのは、四分胞子の形成時のみであり、隣接する体細胞は壁孔連絡 (pit connection) と呼ばれる構造で繋がっている。しかし、この壁孔連絡の中心部には plug core という構造が存在し、細胞質の連続性を阻んでいる。壁孔連絡はその形成過程によって第一次壁孔連絡と第二次壁孔連絡の二種類に大別することができる。第一次壁孔連絡 (primary pit connection) は通常の細胞質分裂に伴ってできた壁孔連絡であり、母細胞と娘細胞とを繋いでいる。ツルシラモを含めてほとんどの紅藻は頂端生長なので、一個の細胞は2個の第一次壁孔連絡を持つことになる。第二次壁孔連絡 (secondary pit connection) は既存の細胞間に形成される器官である。この形成過程をみると、はじめに互いに隣接する細胞の1個が、核分裂を伴う不等割分裂により単核の小さな細胞 (conjuncter cell) を形成する。この小さな細胞が一方の細胞へ核を移入し、融合する。すなわち、この小さな細胞を介して隣接する細胞間に形成される連絡孔であり、核を受け取った細胞は少なくとも2核を有することになる。完成した第一次と第二次壁孔連絡は構造上全く同じであり、両者を形態的に判別することは不可能である (Pueschel, 1990)。したがって、本研究で新細胞に見られた壁孔連絡 (Plate 27-2) が第一次、第二次のいずれであるかを厳密に断言することはできない。しかし、隣接する細胞が存在しておらず、さらにこの新細胞が切断に対する反応として形成された単核細胞であることから、形成直後の第一次壁孔連絡であることは間違いない。

壁孔連絡は cap membrane や cap layer の有無などで6型に大別され、その構造の違いは分類学上目 (もく) の形質として利用されている。

ツルシラモが属するスギノリ目は cap membrane のみが plug core を包むタイプの壁孔連絡を持つが、実際本種で観察した壁孔連絡は例外なくこのタイプであった。前述した新細胞の壁孔連絡では cap membrane を確認することはできず、plug core のみで構成されているように見える。しかし、形成後の時間経過から考えて、これは形成後間もない壁孔連絡であり、この後時間と共に cap membrane を持つ通常の形態に分化するものと考ええる。

分裂溝が伸長する際、先端部に紅藻デンプンを伴っていた。紅藻デンプンは、細胞質内に遊離した状態で存在し、 α -1,4 グルカンが主体である。一般に可溶性混合物を含む炭水化合物の可視的な貯蔵体といわれている (Pueschel, 1990)。この分解や利用についての知見は少ないが、Wiencke and Läuchli (1980) は紅藻アマノリ属 *Porphyra umbilicalis* の細胞が浸透圧ストレスを被った場合に、多量の紅藻デンプンが顕著に減少したことを報告している。彼らは、この紅藻デンプンは浸透圧調節に役立つような（浸透圧的にアクティブな）単量体に変化すると推察している。現在のところ、紅藻デンプンが分解されて細胞壁、または分裂溝の構築に寄与するといった知見はないが、Ramus (1972) は単細胞性紅藻 *Porphyridium aerugineum* で、紅藻デンプンから被膜に包まれた小繊維多糖類が形成され、細胞膜の外側に移動する現象を確認している。紅藻デンプンがいつ、どのように利用されるかについては更なる研究が必要である。

VIII 摘 要

本研究は寒天原藻として重要な紅藻オゴノリ属植物の一種ツルシラモ (*Gracilaria chorda*) の再生現象を，外部，および内部形態学的に調べたものであり，以下の知見を得た。

1. 天然藻体を観察した結果，傷害を受けた部位には傷害組織と再生枝が形成されていることを確認した。
2. 母藻体から切り取った 5mm の藻体片を培養すると，先端側切断面の皮層部から 1-4 本の再生枝が形成された。しかし，付着器側切断面には通常何も形成されず，本種の藻体片には外部形態形成で明瞭な極性がみられた。
3. 傷害組織は先端側，付着器側の両切断面に形成された。先端側切断面の傷害組織は 3-4 層の薄い皮層状であった。しかし，付着器側切断面の傷害組織は，縦方向の分裂により藻体片の組織内で細胞塊にまで発達し，内部形態形成でも極性が存在することを示した。
4. 先端側，または付着器側切断面を常に基質に接触させた状態で培養すると，付着器側切断面からのみ仮根様組織が発達して基質に着生した。接触刺激に対する形態形成の反応でも，両切断面に極性が存在することを示した。その仮根様組織からは直立体が発出した。

5. 培養によって再生した再生枝を全て切断すると、藻体片本体の先端側切断面から新たな再生枝を形成した。また、再生枝を全て切り取らずに 1-2 本を残した場合、新たな再生枝を形成することはなかった。したがって、本種の再生枝形成がアピカルドミナンス（頂芽優勢）の支配を受けていることを示唆した。しかし、10mm 以上、特に 30mm の藻体片では、先端側切断面から生じた再生枝のアピカルドミナンスにも関わらず多数の再生側枝を生じ、アピカルドミナンスの距離的な限界を示した。

6. 藻体から皮層組織だけを切り取って培養した場合でも、先端側の一辺から再生枝を形成し、極性を示した。

7. 総生物量の増加は藻体片が長いほど大きかった。特に 30mm の藻体片は再生枝と多数の再生側枝を形成し、生物量の増加に寄与していた。一方、単位重量当たりの増加率は藻体片が短いほど大きかった。

8. 藻体の様々な部位から切り取った藻体片では、主軸、側枝ともに下部由来の藻体片で増加率が大きく、上部ほど小さかった。一方、藻体片本体の重量増加率は上部由来の藻体片で大きく、中央部、下部のものでは小さい値を示した。

9. 水温 10-24℃ で培養した場合、20℃ が最も高い生長率を示した。

10. 光周期 6L18D-24L0D で培養した場合、20L4D で最も高い生長率を示した。

11. 傷害組織の形成過程を TEM で観察した結果、切断された細胞に直接接する細胞（隣接細胞）の細胞質、および核が切断面側に移動した。さらにゴルジ体の分泌小胞の放出や葉緑体の分裂などの構造変化が起こった後に、それぞれの隣接細胞が両側から分裂溝を伸長させ、核を一個含む新細胞を形成した。

12. ツルシラモの細胞は多核であるため、新細胞の形成（細胞質分裂）には核分裂を伴わず、一個の隣接細胞が複数の新細胞を形成した。新細胞はさらに分裂をくり返し、切断面を覆う傷害組織を形成した。

IX 謝 辞

本研究を進めるに際し終始御指導を頂き、本論文の校閲の労を取られた北海道大学水産学部、山本弘敏教授に深甚なる謝意を表するとともに、本校の取り纏めに際して有益な御教示を頂いた北海道大学水産学部、山崎文雄教授、中尾繁教授、安井肇助教授に厚く御礼を申し上げます。水田浩之博士には本研究を遂行する上で種々御指導を頂いた。感謝の意を表する。また、TEMの実験に際し、技術的な助言を頂いた北海道大学理学部附属海藻研究施設、本村泰三博士に御礼を申し上げます。更に、実験遂行に当たり御協力と励ましを頂いた育種培養学講座の寺田竜太君をはじめ、当講座の卒業生、大学院生、学生諸氏、立島幸枝さんに感謝する。

X 参考文献

- Azanza-Corrales, R. and Dawes, C. J. (1989). Wound healing in cultured *Eucheuma alvarezii* var. *tambalang* Doty. Bot. Mar., 32: 229-234.
- Bird, N., McLachlan, J. and Grund, D. (1977). Studies on *Gracilaria*. 5. In vitro life history of *Gracilaria* sp. from the Maritime Provinces. Can. J. Bot., 55: 1282-1290.
- Brodie, J., Masuda, M. and Guiry, M. D. (1994). Life history and photoperiodic responses in *Chondrus giganteus* forma *flabellatus* (Gigartinales, Rhodophyta) from Japan. Eur. J. Phycol., 29: 159-164.
- Chamberlain, A. H. L., Gorham, J., Kane, D. F. and Lewey, S. A. (1979). Laboratory growth studies on *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. II. Apical dominance. Bot. Mar., 22: 11-19.
- Chen, L. C.-M. and Taylor, A. R. A. (1978). Medullary tissue culture of the red alga *Chondrus crispus*. Can. J. Bot., 56: 883-886.
- 千原光雄 (1997). 紅色植物門. 藻類多様性の生物学 (pp. 49-71). 内田老鶴圃.
- Critchley, A. T. (1993). *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) : An economically important agarophyte. Seaweed cultivation and marine ranching. Ohno, M. and Critchley, A. T. (eds.). pp. 89-112, JICA Press, Yokosuka.
- Delivopoulos, S. G. and Tsekos, I. (1986). Ultrastructure of carposporogenesis in the red alga *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Gracilariaceae). Bot. Mar., 29: 27-35.
- Destombe, C., Godin, J., Nocher, M., Richerd, S. and Valero, M. (1993). Differences in response between haploid and diploid isomorphic

phases of *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta: Gigartinales) exposed to artificial environmental conditions. *Hydrobiologia*, 260/261: 131-137.

Doty, M. S. (1987). The production and use of *Eucheuma*. Case studies of seven commercial seaweed resources. Doty, M. S., Caddy, J. F. and Santelices, B. (eds.). pp. 123-161, FAO Press, Rome.

Ducreux, G., Maillard, P. and Sihachakr, D. (1988). Patterns of differentiation and regeneration in single cells and protoplasts of *Sphacelaria* (Phaeophyceae). *Algal biotechnology*. Stadler, T., Mollion, J., Verdus, M., Karamanos, Y., Morvan, H. and Christiaen, D. (eds.). pp. 129-137, Elsevier Applied Science Press, London and New York.

Eaton, J. W., Brown, J. G. and Round, F. E. (1966). Some observations on polarity and regeneration in *Enteromorpha*. *Br. Phycol. Bull.*, 3: 53-62.

Edelstein, T., Bird, C. J. and McLachlan, J. (1976). Studies on *Gracilaria*. 2. Growth under greenhouse conditions. *Can. J. Bot.*, 54: 2275-2290.

Fagerberg, W. R. and Dawes, C. J. (1976). Studies on *Sargassum*. I. A light microscopic examination of the wound regeneration process in mature stipes of *S. filipendula*. *Amer. J. Bot.*, 63: 110-119.

Felicini, G. P. and Perrone, C. (1972). Le rôle des proliférations de la fronde dans le cycle biologique de *Petroglossum nicaeense* (Duby) Schotter (Rhodophycées, Gigartinales). *Phycologia*, 11: 197-205.

Fletcher, R. L. and Fletcher, S. M. (1975). Studies on the recently introduced brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt II. Regenerative ability. *Bot. Mar.*, 18: 157-162.

Friedlander, M., Dawes, C. and Levy, I. (1993). Exposure of *Gracilaria* to

- various environmental conditions. I. The effect on growth. Bot. Mar., 36: 283-288.
- Fulcher, R. G. and McCully, M. E. (1971). Histological studies on the genus *Fucus*. V. An autoradiographic and electron microscopic study of the early stages of regeneration. Can. J. Bot., 49: 161-165.
- Gargiulo, G. M., Masi, F. D., Genovese, G. and Tripodi, G. (1994). Karyology and effects of temperature and photoperiod on the life-cycle of *Porphyra leucosticta* Thuret in Le Jolis (Bangiales, Rhodophyta) from the Mediterranean Sea. Jpn. J. Phycol., 42: 271-280.
- Givernaud, T., Cosson, J. and Givernaud-Mouradi, A. (1990). Régénération de la Phéophycée *Sargassum muticum* (Phéophycée, Fucale). Cryptogamie, Algol., 11: 293-304.
- Goldstein, M. E. (1973). Regeneration and vegetative propagation of the agarophyte *Gracilaria debilis* (Forsskål) Børgesen (Rhodophyceae). Bot. Mar., 16: 226-228.
- Hales, J. M. and Fletcher, R. L. (1992). Receptacle regeneration in *Sargassum muticum* (Phaeophyta). Phycologia, 31: 591-601.
- Iima, M., Kinoshita, T., Kawaguchi, S. and Migita, S. (1995). Cultivation of *Grateloupia acuminata* (Halymeniaceae, Rhodophyta) by regeneration from cut fragments of basal crusts and upright thalli. J. appl. Phycol., 7: 583-588.
- 今関英雅 (1991). 傷害. 新免輝男編, 環境応答 (pp. 158-176). 朝倉書店.
- Jaffe, L. F. (1968). Localization in the developing *Fucus* egg and the general role of localizing currents. Adv. in Morphogenesis, 7: 295-328.

- Juanes, J. A. and Puente, A. (1993). Differential reattachment capacity of isomorphic life history phases of *Gelidium sesquipedale*. *Hydrobiologia*, 260/261: 139-144.
- Kaczyna, F. and Megnet, R. (1993). The effects of glycerol and plant growth regulators on *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Rhodophyceae). *Hydrobiologia*, 268: 57-64.
- Klepacki, K. J., Scott, J. L. and Broadwater, S. T. (1995). Ultrastructure of cell division in *Agardhiella subulata* (Gigartinales, Rhodophyta). *Eur. J. Phycol.*, 30: 159-167.
- Kropf, D. L., Kloareg, B. and Quatrano, R. S. (1988). Cell wall is required for fixation of the embryonic axis in *Fucus* zygotes. *Science*, 239 : 187-190.
- Mairh, O. P. and Tewari, A. (1994). Studies on a new asexual propagule of *Kappaphycus striatum* (Solieriaceae, Rhodophyta). *Phycologia*, 33: 62-64.
- McCook, L. J. and Chapman, A. R. O. (1992). Vegetative regeneration of *Fucus* rockweed canopy as a mechanism of secondary succession on an exposed rocky shore. *Bot. Mar.*, 35: 35-46.
- McLachlan, J. (1985). Macroalgae (seaweeds) : industrial resources and their utilization. *Pl. Soil.*, 89: 137-157.
- 右田清治 (1988). 座の再生による紅藻ムカデノリの養殖. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54: 1923-1927.
- 右田清治 (1992). 座の再生による紅藻ムカデノリ養殖. 三浦昭雄編, 食用藻類の栽培 (pp. 106-111). 恒星社厚生閣.

右田清治, 中島信次, 林江崑, 玉置昭夫 (1993). 紅藻ツルシラモの有明海熊本沿岸での大繁殖. 水産増殖, 41: 149-154.

Moss, B. L. (1964). Wound healing and regeneration in *Fucus vesiculosus*. Proceedings of the Fourth International Seaweed Symposium. de Virville, A. D. and Feldmann J. (eds.). pp. 117-122, Pergamon Press, Oxford.

Nelson, S. G., Yang, S. -S., Wang, C. -Y. and Chiang, Y. -M. (1983). Yield and quality of agar from species of *Gracilaria* (Rhodophyta) collected from Taiwan and Micronesia. Bot. Mar., 26: 361-366.

岡村金太郎 (1911). てんぐさノ蕃殖力ニ就テ. 植物學雜誌, 25, 373-378.

Orosco, C. A. and Ohno, M. (1992). Growth rates of *Gracilaria* species (Gracilariales, Rhodophyta) from Tosa Bay, southern Japan. Jpn. J. Phycol., 40: 239-244.

Perrone, C. and Cecere, E. (1997). Regeneration and mechanisms of secondary attachment in *Solieria filiformis* (Gigartinales, Rhodophyta). Phycologia, 36: 120-127.

Perrone-Pesola, M. and Felicini, G. P. (1981). Polarité dans la fronde de *Schottera nicaeensis* (Phyllophoracées). Phycologia, 20: 142-146.

Polne-Fuller, M., Biniaminov, M. and Gibor, A. (1984). Vegetative propagation of *Porphyra perforata*. Hydrobiologia, 116/117: 308-313.

Polne-Fuller, M. and Gibor, A. (1987). Calluses and callus-like growth in seaweeds: Induction and culture. Hydrobiologia, 151/152: 131-138.

Provasoli, L. (1968). Media and prospects for the cultivation of marine algae. Cultures and Collections of Algae. Watanabe A. and Hattori

- A. (eds.). pp. 63-75, Jap. Soc. Plant Physiol., Tokyo.
- Pueschel, C. M. (1990). Cell structure. Biology of the red algae. Cole, K. M. and Sheath, R. G. (eds.), pp. 7-41, Cambridge University Press, Cambridge.
- Ramus, J. (1972). The production of extracellular polysaccharide by the unicellular red alga *Porphyridium aerugineum*. J. Phycol., 8: 97-111.
- Robaina, R. R., García-Jimenez, P. and Luque, A. (1992). The growth pattern and structure of callus from the red alga *Laurencia* sp. (Rhodophyta, Ceramiales) compared to shoot regeneration. Bot. Mar., 35: 267-272.
- Santelices, B. and Varela, D. (1994). Abiotic control of reattachment in *Gelidium chilense* (Montagne) Santelices and Montalva (Gelidiales; Rhodophyta). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 177: 145-155.
- Santelices, B. and Varela, D. (1995). Regenerative capacity of *Gracilaria* fragments: effects of size, reproductive state and position along the axis. J. appl. Phycol., 7: 501-506.
- Schmitz, K. and Lobban, C. S. (1976). A survey of translocation in Laminariales (Phaeophyceae). Mar. Biol., 36: 207-216.
- Spurr, A. R. (1969). A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res., 6: 31-43.
- 須藤俊造 (1965). 沿岸海藻類の増殖. 水産増養殖叢書9, pp. 16-18. 日本水産資源保護協会.
- Sylvester, A. N. and Waaland, J. R. (1983). Cloning the red alga *Gigartina exasperata* for culture on artificial substrates. Aquaculture, 31: 305-318.

津布楽洋和・和田俊司 (1989). ハネモ巨大細胞の新生長点誘導に伴う骨格微小管の極性変動. 日本植物学会第54回大会 (仙台) 講演要旨.

植田勝巳 (1979). 電子顕微鏡で見た植物の構造. pp. 241. 培風館.

Vöchting, H. (1878). Über Organbildung im Pflanzenreich.

和田正三 (1991). 極性. 新免輝男編, 環境応答 (pp. 115-127). 朝倉書店.

Wiencke, C. and Laüchli, A. (1980). Growth, cell volume, and fine structure of *Porphyra umbilicalis*. *Planta*, 159: 342-346.

Wittmann, W. (1965). Aceto-iron-haematoxylin-chloral hydrate for chromosome staining. *Stain Technol.*, 40: 161-164.

山本弘敏 (1993). 函館湾に生育するツルシラモについて. 藻類, 21: 86-91.

Yokoya, N. S., Guimarães, S. M. P. B. and Handro, W. (1993). Development of callus-like structures and plant regeneration in thallus segments of *Grateloupia filiformis* Kützinger (Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 260/261: 407-413.

XI 圖 版



To study how a 10 meter wide (100 ft) wide
 fragment of a wide band of
 material is shown

1. A representative shape showing the margin of cut
 and face

2. Surface view of the surface of 1. a
 with pigmentary lines

3. Longitudinal section of 1. a
 showing the width of the
 (exposed)

4. A view of the surface of 1. a
 for 2.



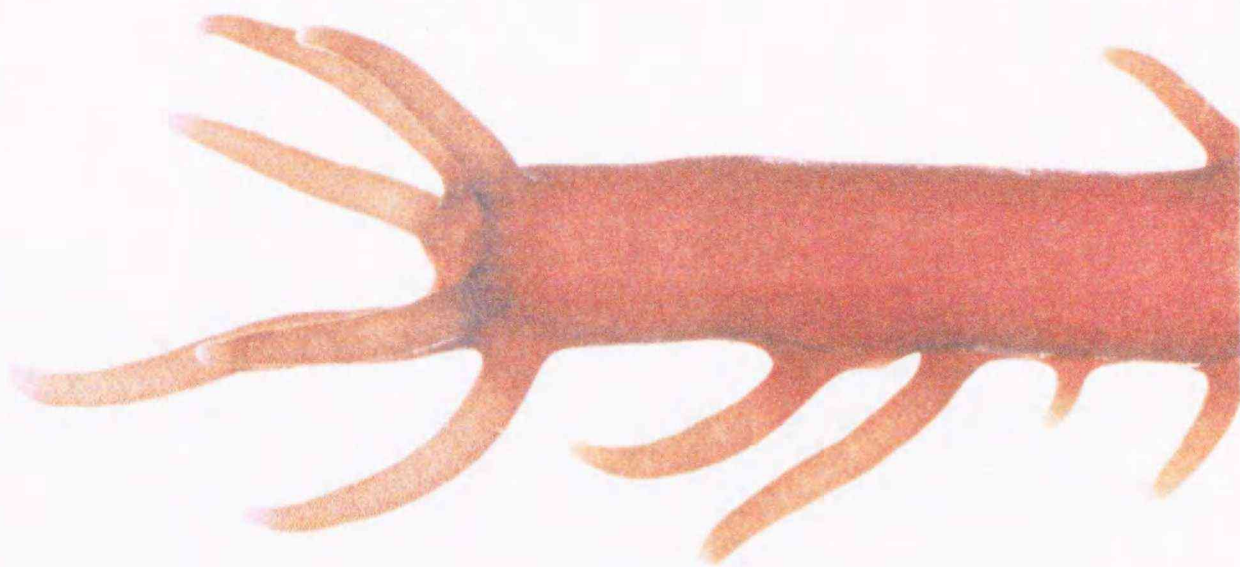
Plate 1

Regeneration at the cut surface of a wild plant of
Gracilaria chorda.

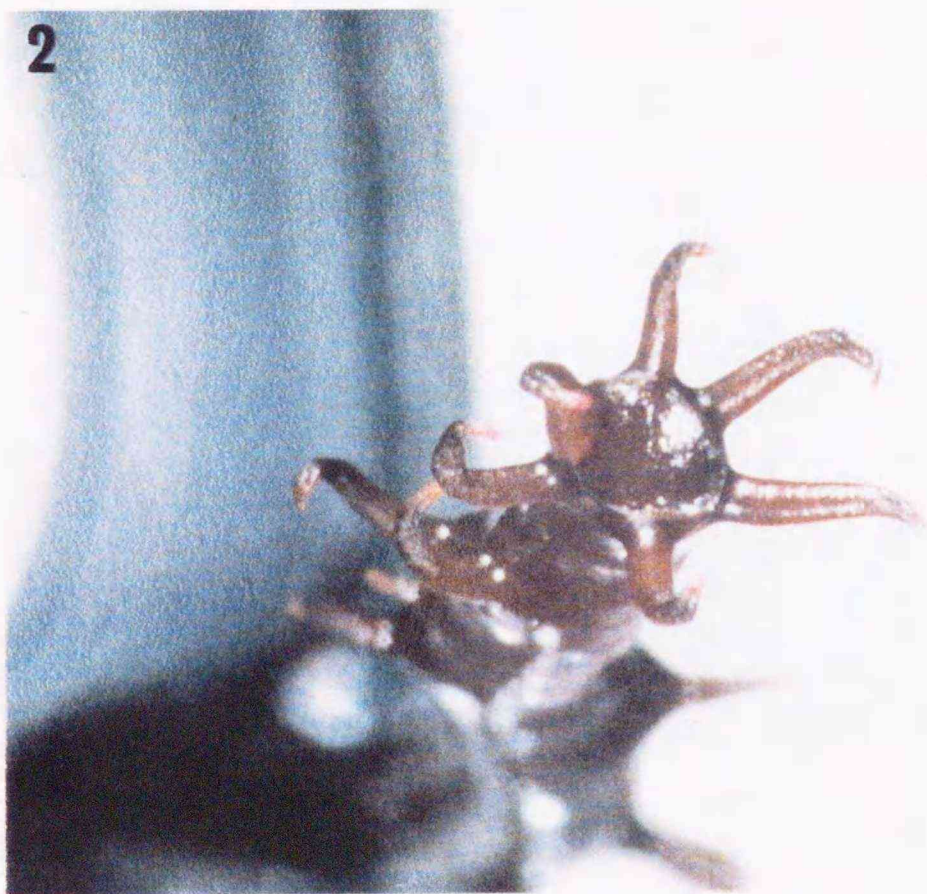
1. Six regenerative shoots issuing from the margin of cut surface.
2. Surface view of cut surface of 1, showing cut surface covered with pigmentary tissue.
3. Longitudinal section of wounded portion of a wild plant, showing the wound tissue developing at cut surface (arrowhead).

Scale bars : 1mm for 1, 2 ; 100 μ m for 3.

1



2



3

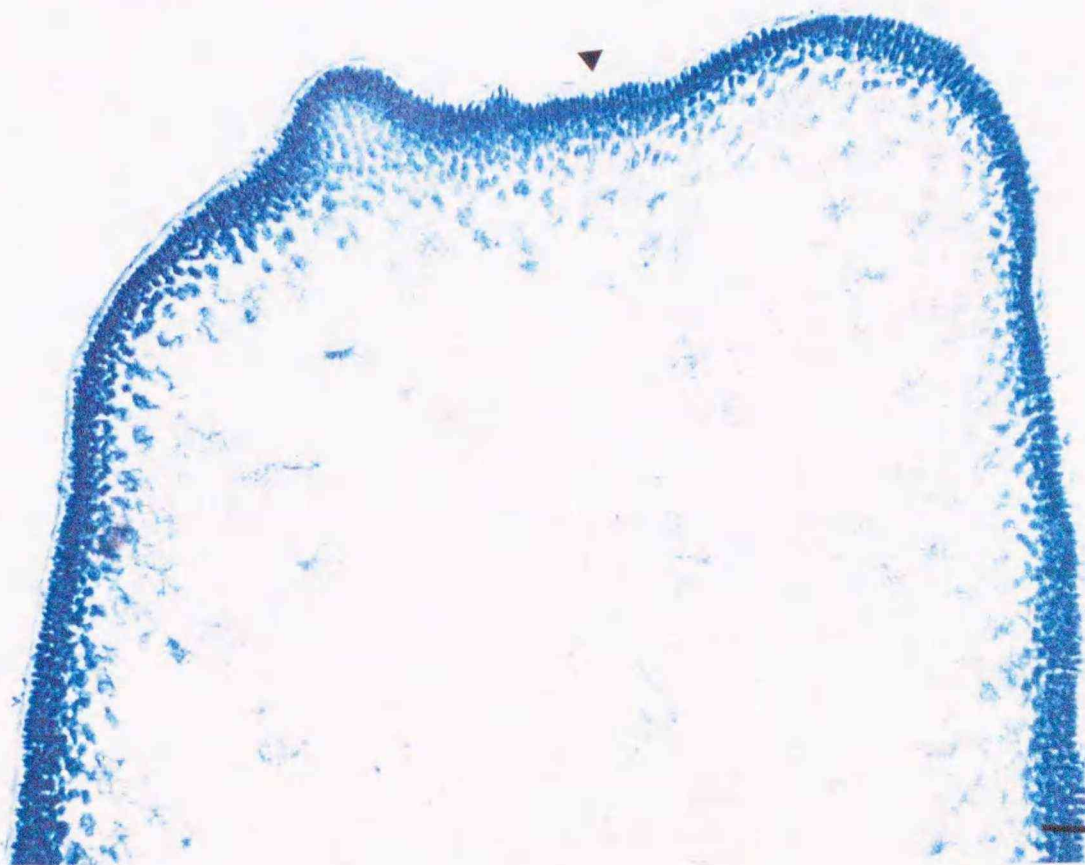


Plate 3

Regenerative shoot arising from wounded portion of a wild
 plant of *G. texensis* (Heller species of *G. texensis*)

Scale bar: 1 cm



Plate 2

Regenerative shoots issuing from wounded portion of a wild plant of *G. textorii*, flattened species of *Gracilaria*.

Scale bar : 1mm.



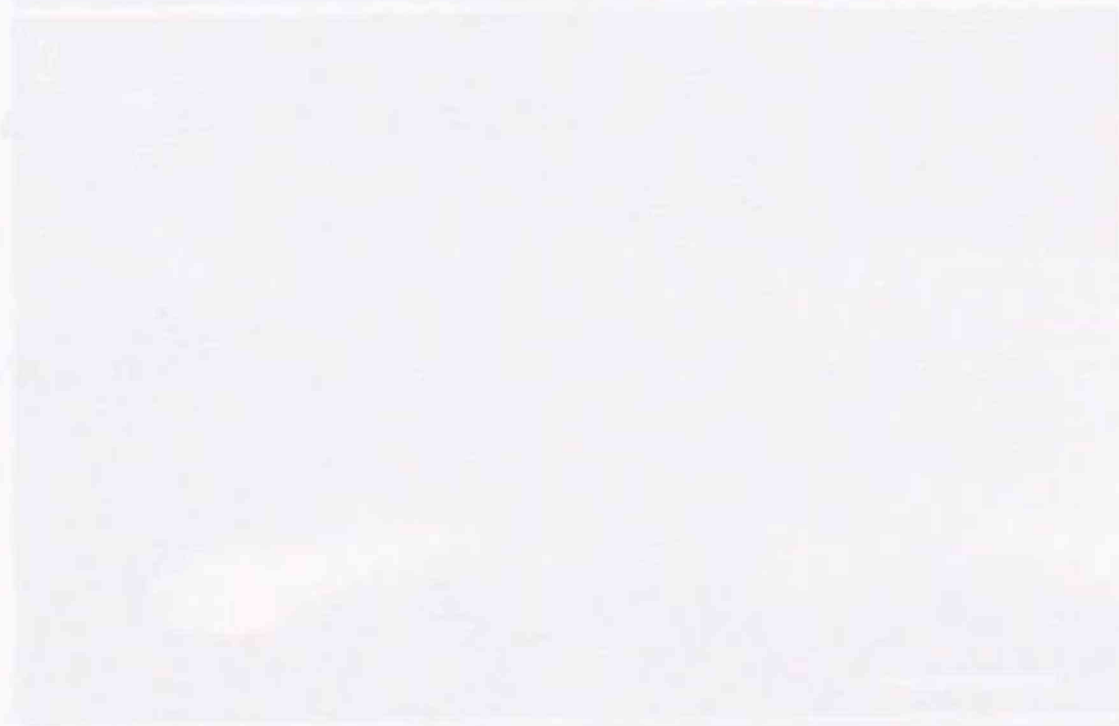
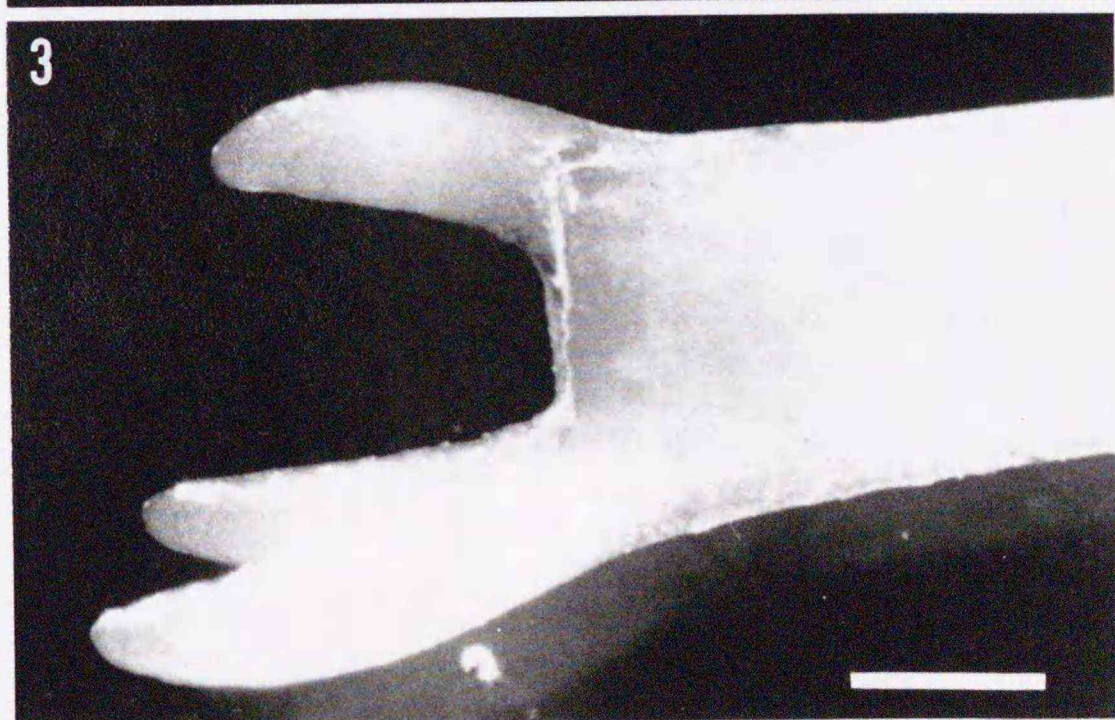
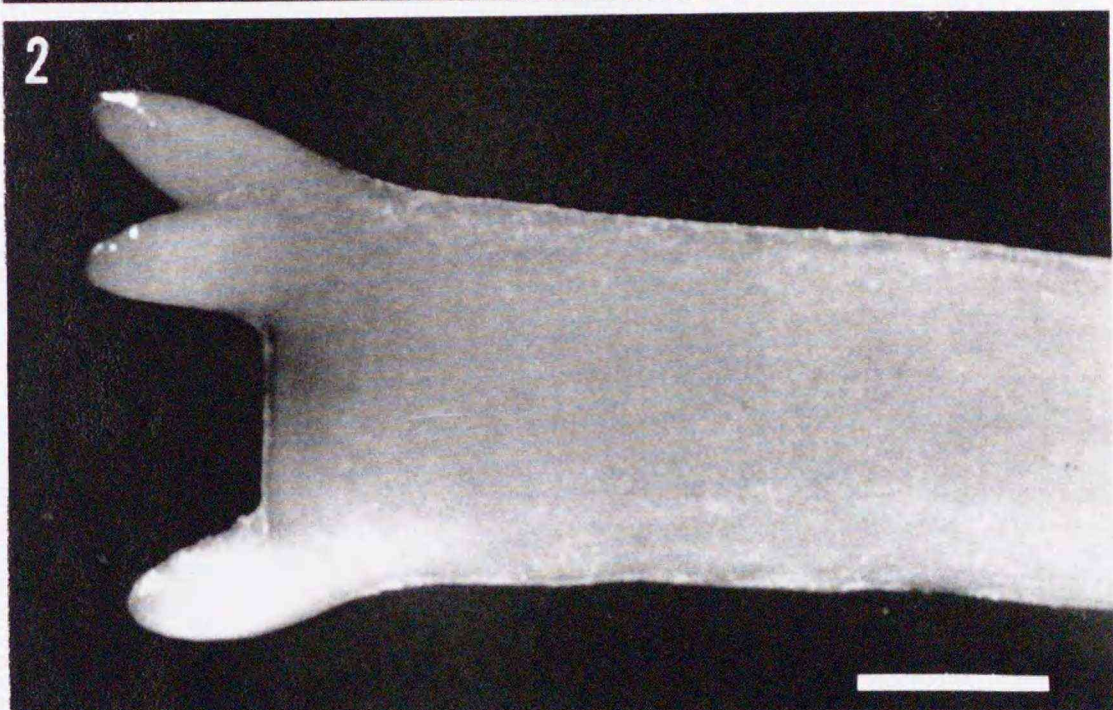
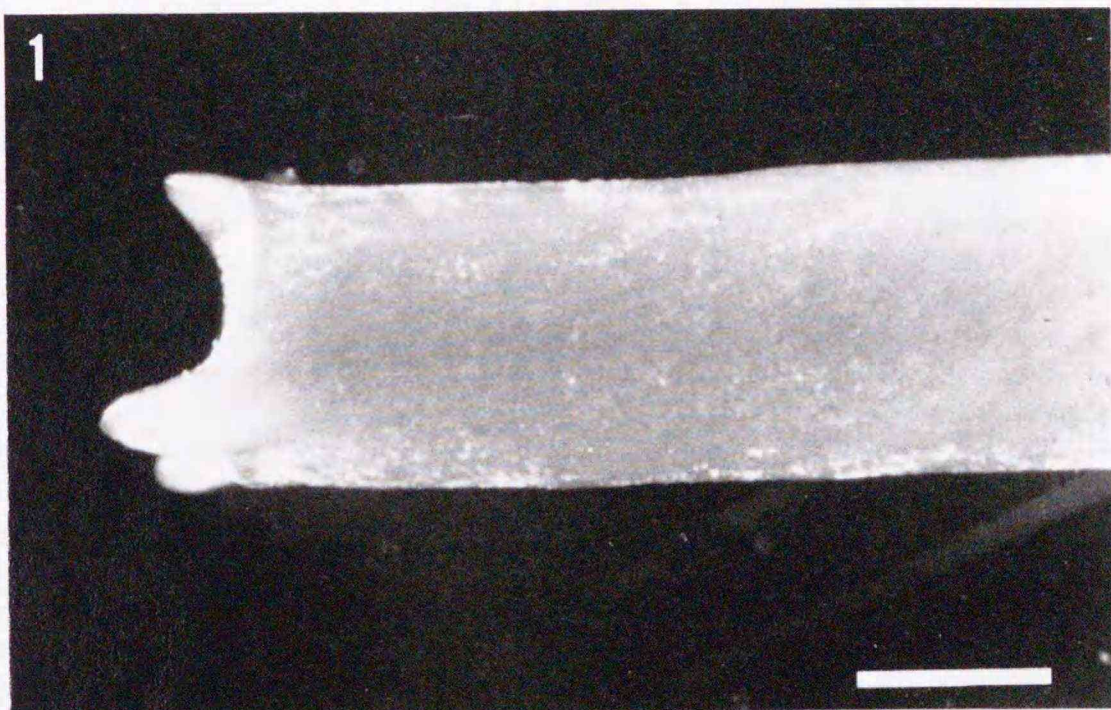


Plate 3

Regenerative shoots issuing from the margine of cut surface of a cultured fragment.

1. 8 days after wounding, showing three shoots.
2. 10 days after wounding.
3. 13 days after wounding, showing no regeneration of additional shoots.

Scale bars : 1mm.



1. Regeneration of the lateral branches showing the
 tendency to form a new system of lateral branches
 (arrowhead) and the old system of lateral branches
 (arrow).

2. Colorless, undifferentiated (arrow) formed at
 proximal end of system.

Scale bar = 1 mm.

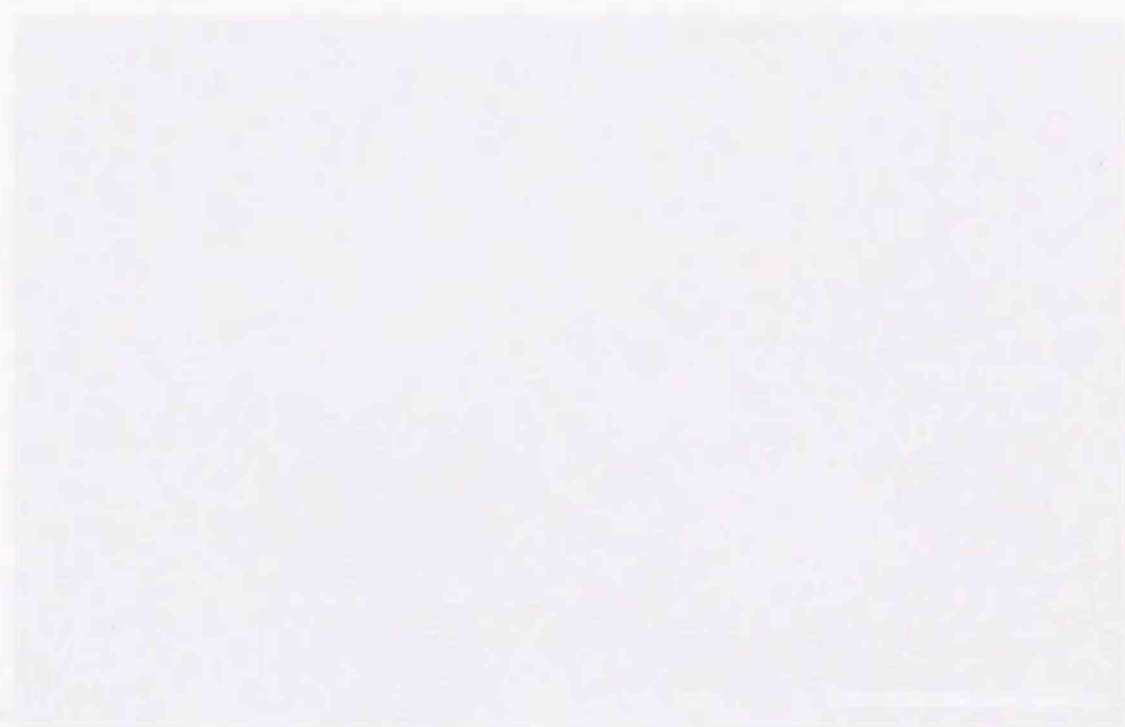
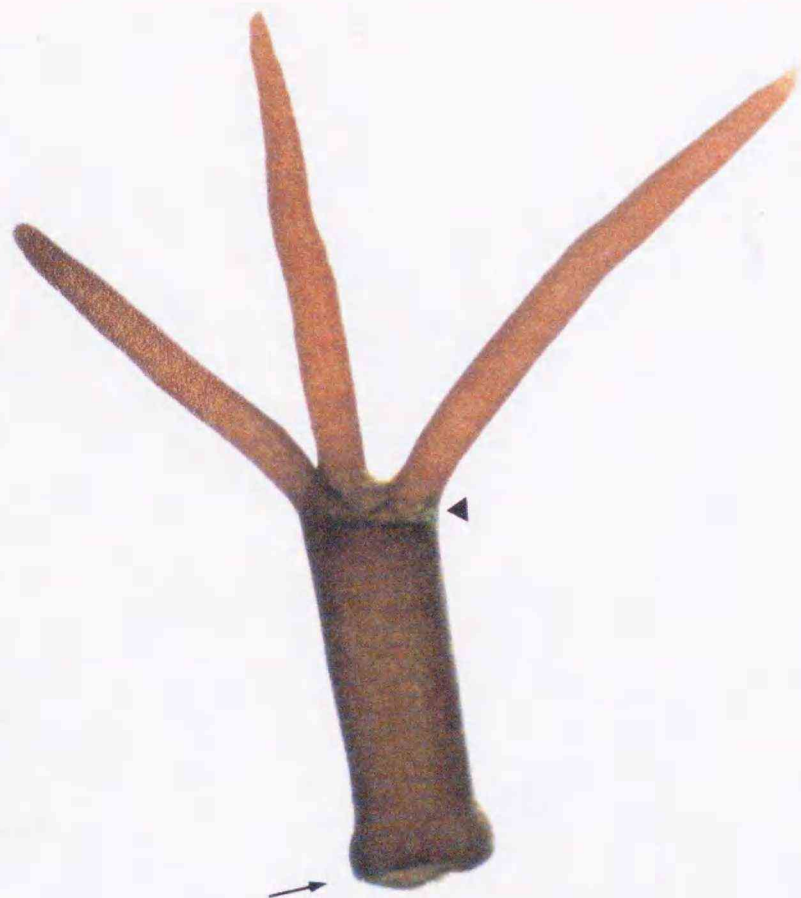


Plate 4

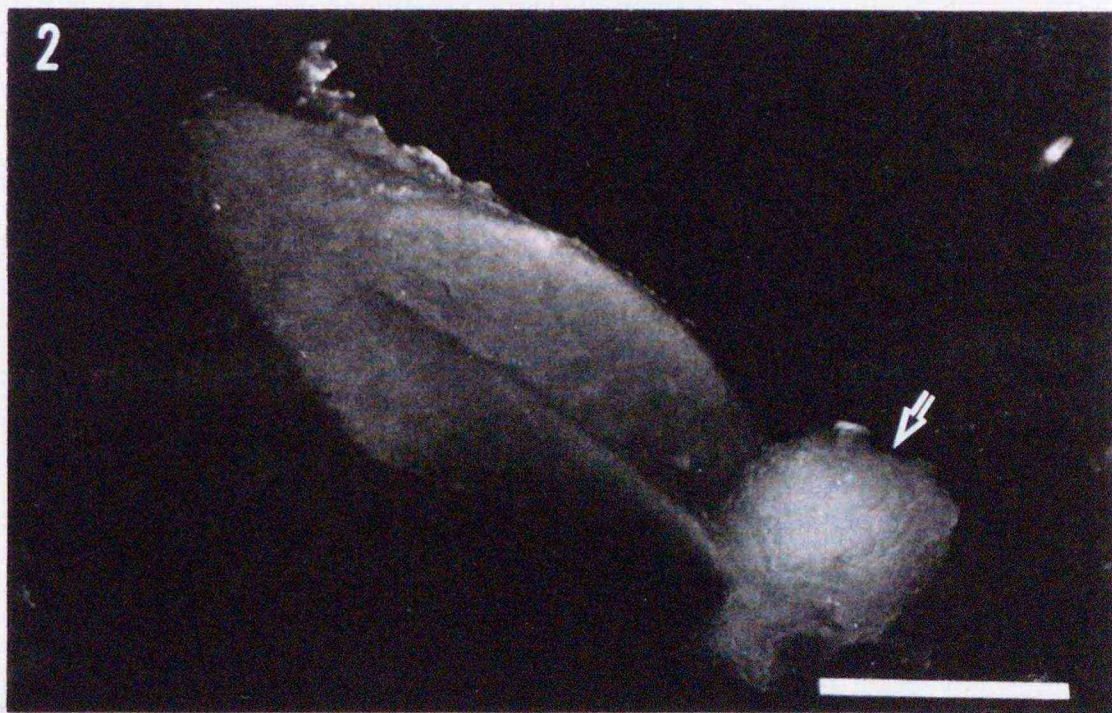
1. Regenerating fragment 30 days after wounding, showing three regenerative shoots issuing from distal cut surface (arrowhead) and slight swelling (arrow) at proximal cut surface.
2. Colorless, undifferentiated cell mass (arrow) formed at proximal cut surface.

Scale bars : 1mm.

1



2



Plan 1

Sectional view of the cell after

new cell formation

working

2. Cell formation

working

3. Cell formation

working

1000

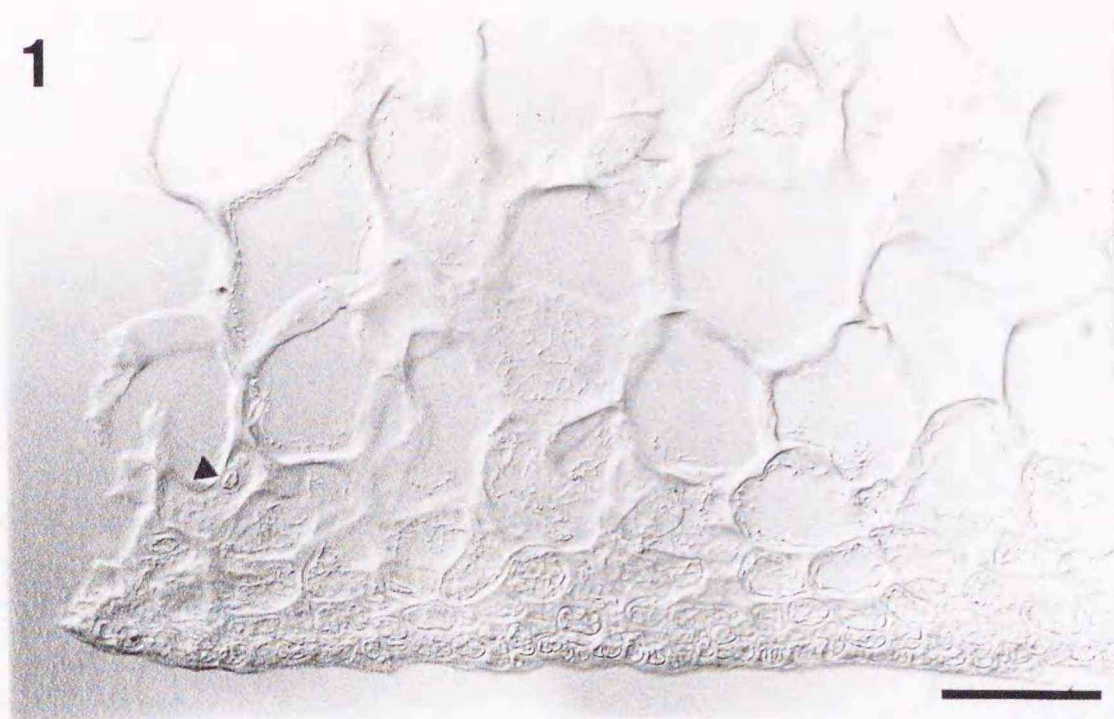
Plate 5

Sectional views of distal cut surface of a cultured fragment.

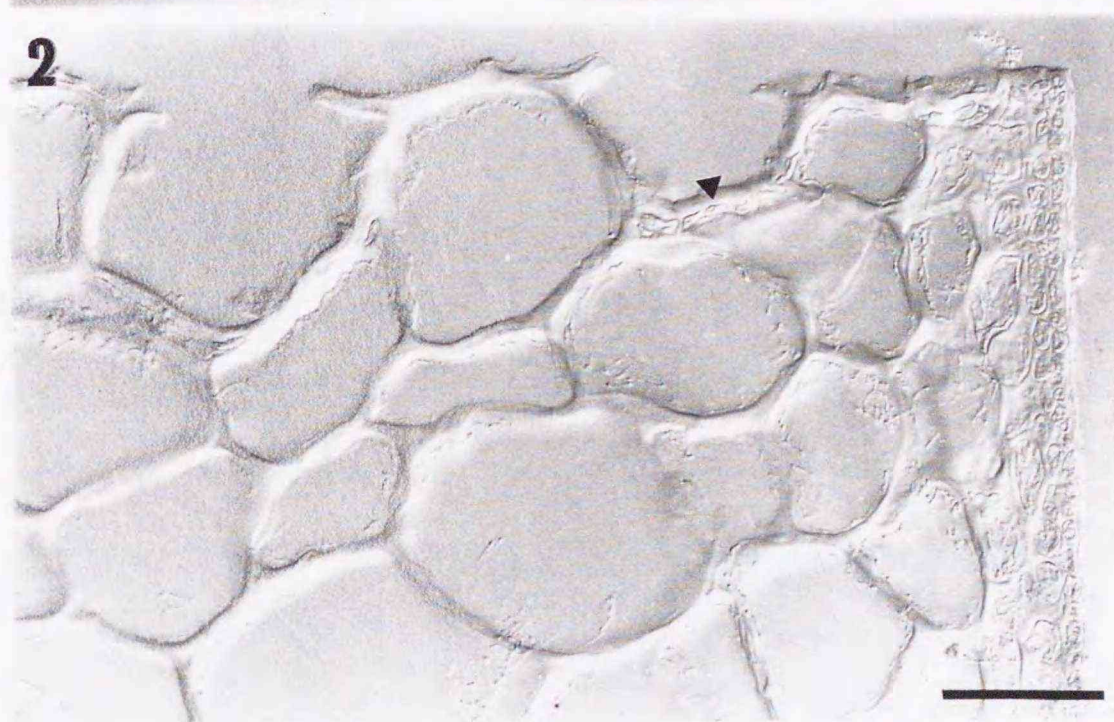
1. New cell (arrowhead) formed at cut surface 4 days after wounding.
2. Cell line (arrowhead) formed at cut surface 7 days after wounding.
3. Cell lines (arrowheads) formed at several portions 8 days after wounding.

Scale bars : 100 μ m.

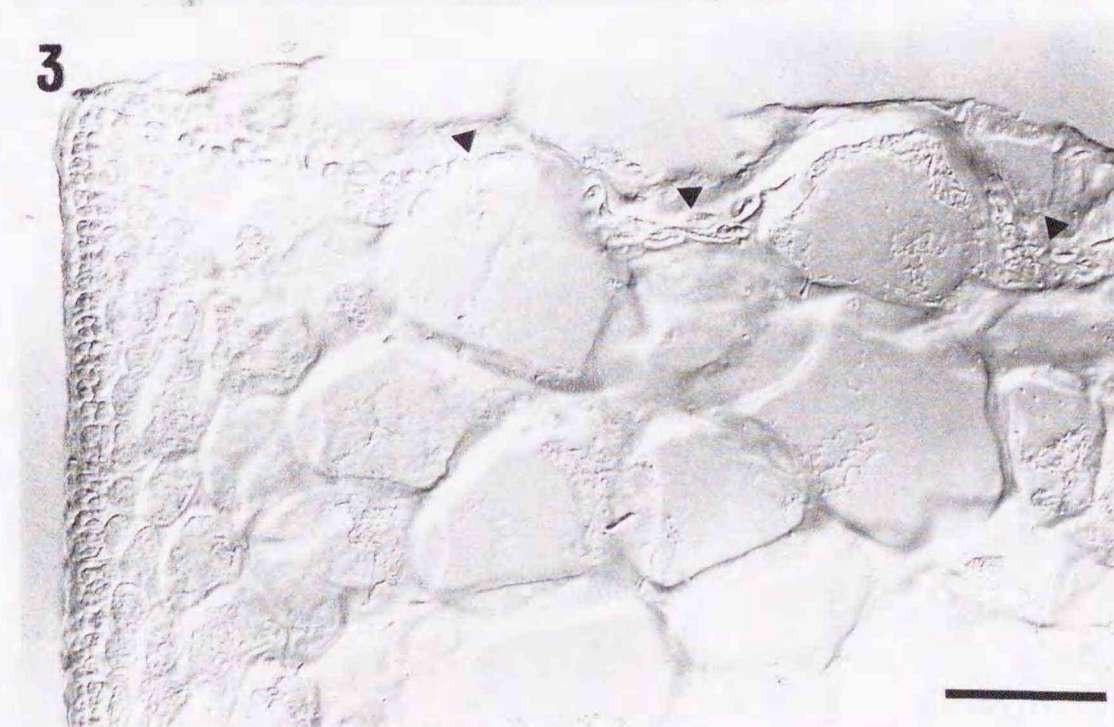
1



2



3





1. Distal cut surface of a cultured fragment of the wound (epithelialized) with call line (wound line) 12 days after wounding.
2. Cut surface of a cultured fragment of the wound (epithelialized) with call line (wound line) 24 days after wounding.
3. Distal cut surface of a cultured fragment of the wound (epithelialized) with call line (wound line) 24 days after wounding.



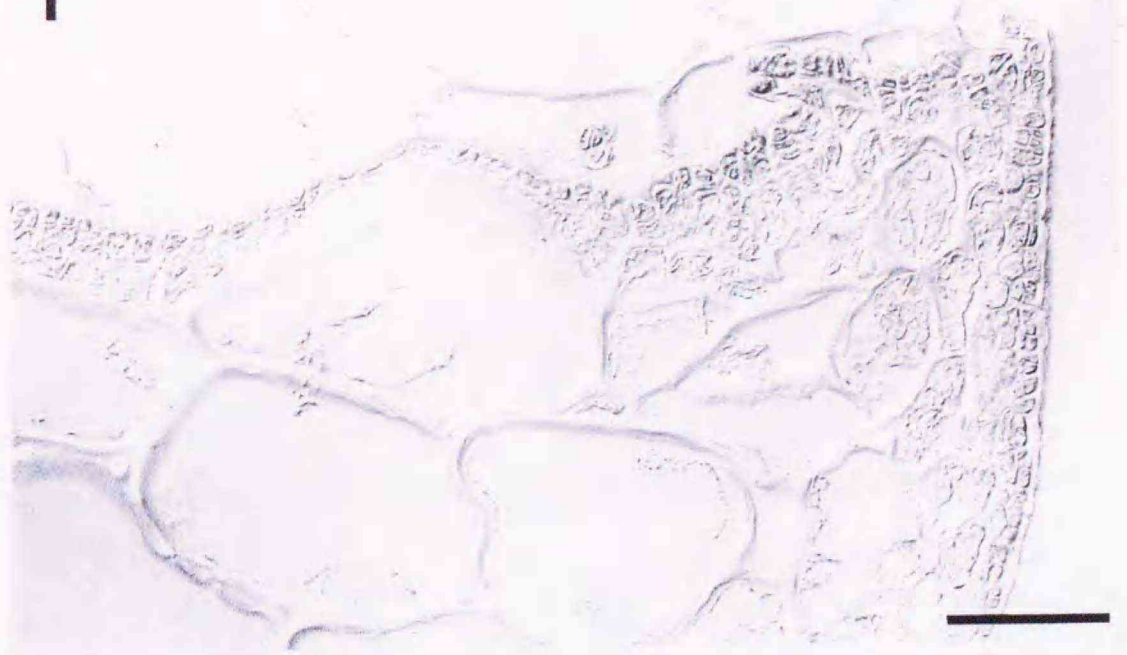
Plate 6

Distal cut surface of a cultured fragment.

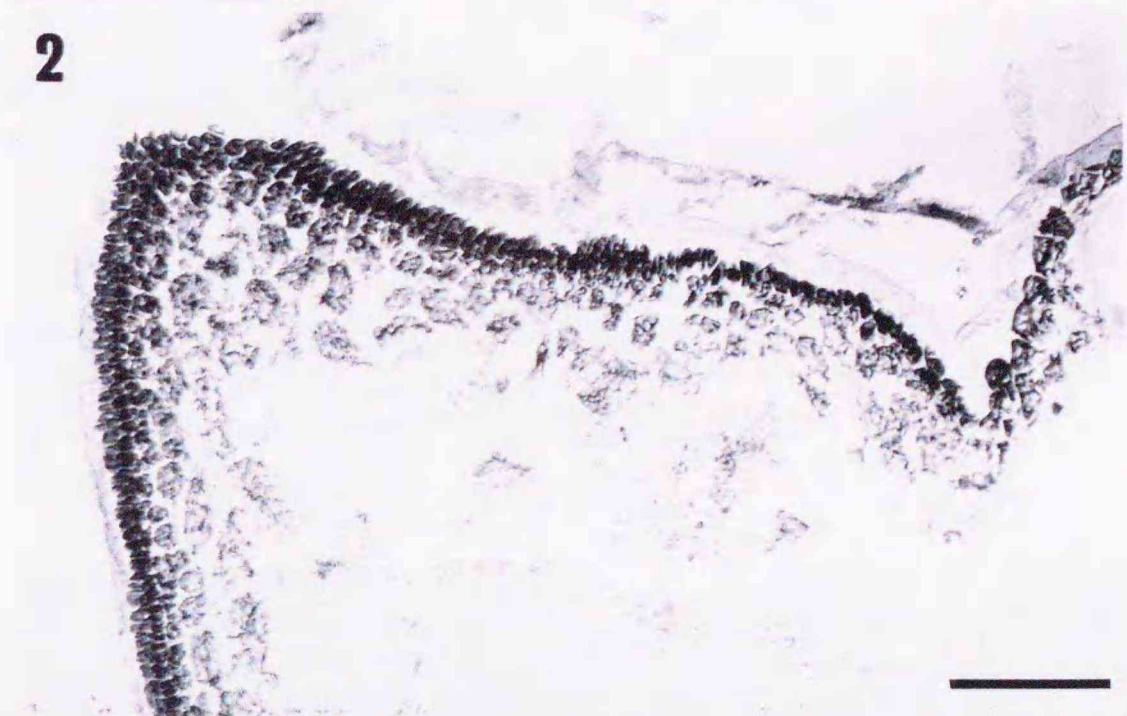
1. Cut surface covered with cell line (wound tissue) 15 days after wounding.
2. Cut surface covered completely with the wound tissue 24 days after wounding, which is composed of several layers.
3. Distal cut surface of a cultured fragment, showing wound tissue (arrowheads) stained as well as cortical tissue (doublearrowhead) with 1% toluidine blue solution 24 days after wounding.

Scale bars : 100 μ m.

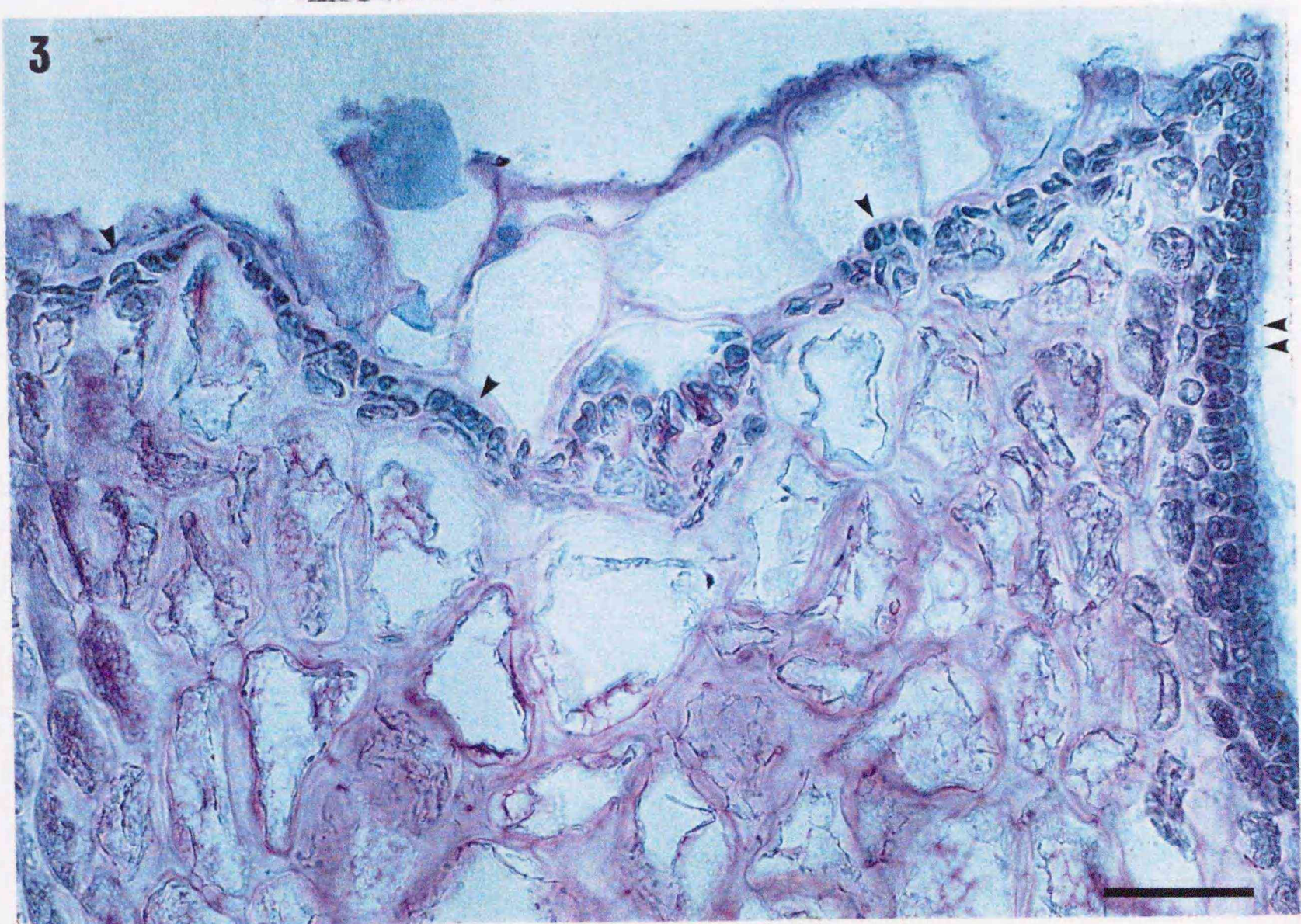
1



2



3



Longitudinal sections of infant & juvenile skulls at the

base of the brain

1. 9 days old (normal)

(normal)

2. 10 days old (normal)

(normal)

3. 10 days old

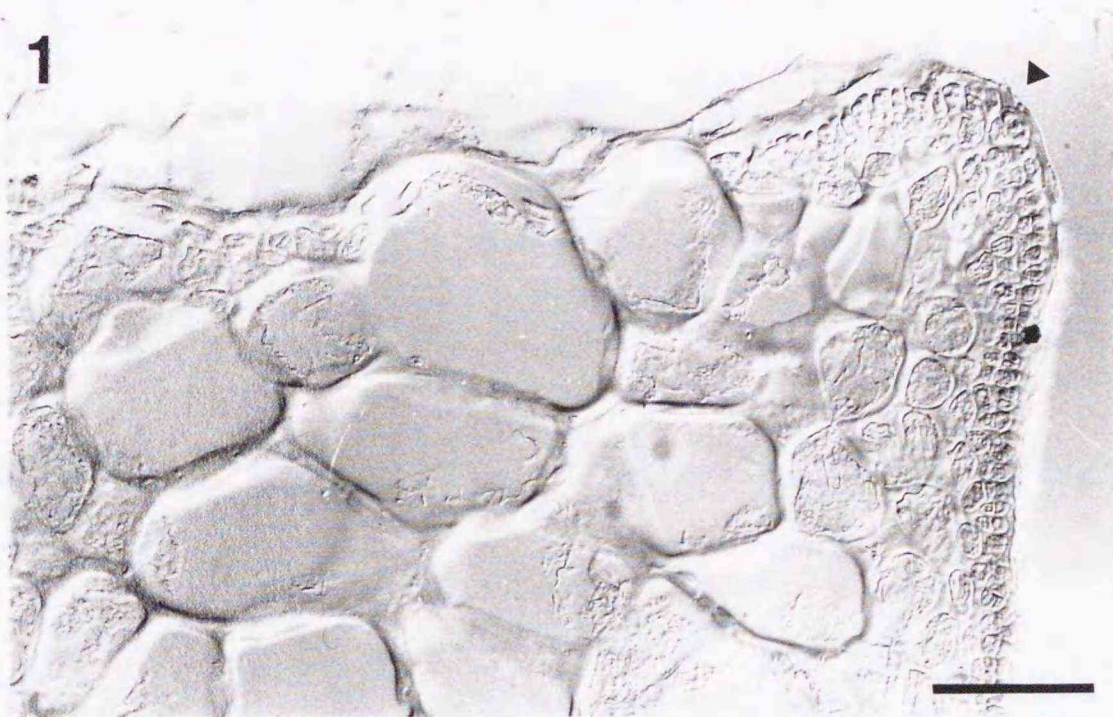


Plate 7

Longitudinal sections of initial regenerative shoots at the
margine of distal cut surface.

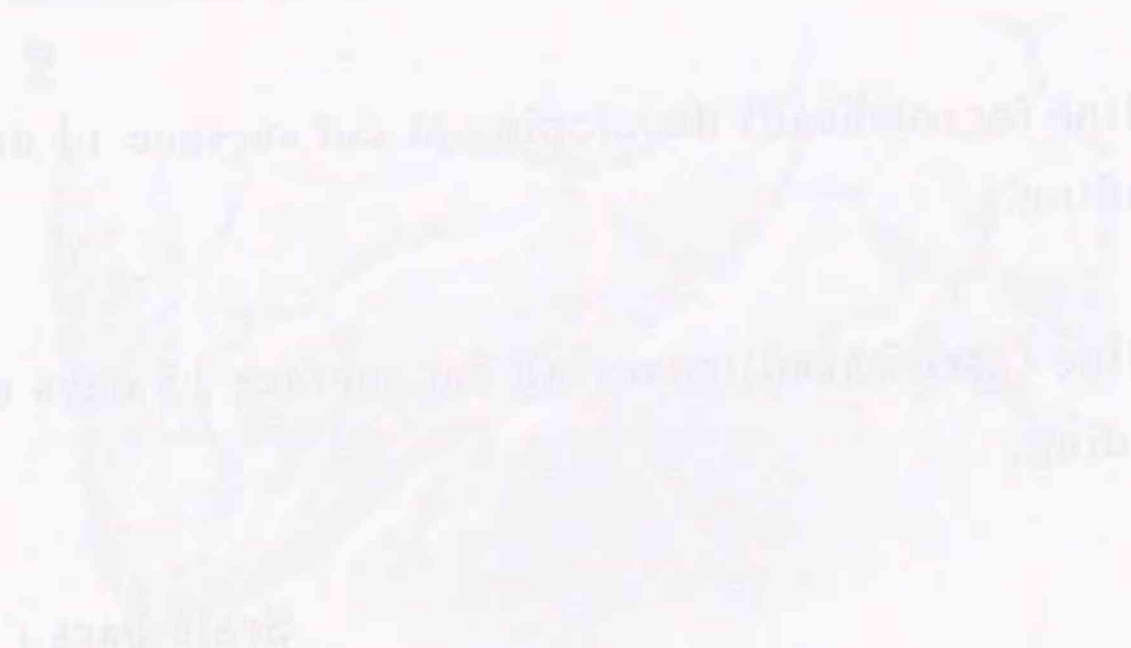
1. 8 days after wounding, showing the edge with slight elevation
(arrowhead).
2. 10 days after wounding, showing a regenerative shoot
(arrowhead) in a little advanced stage.

Scale bars : 100 μ m.

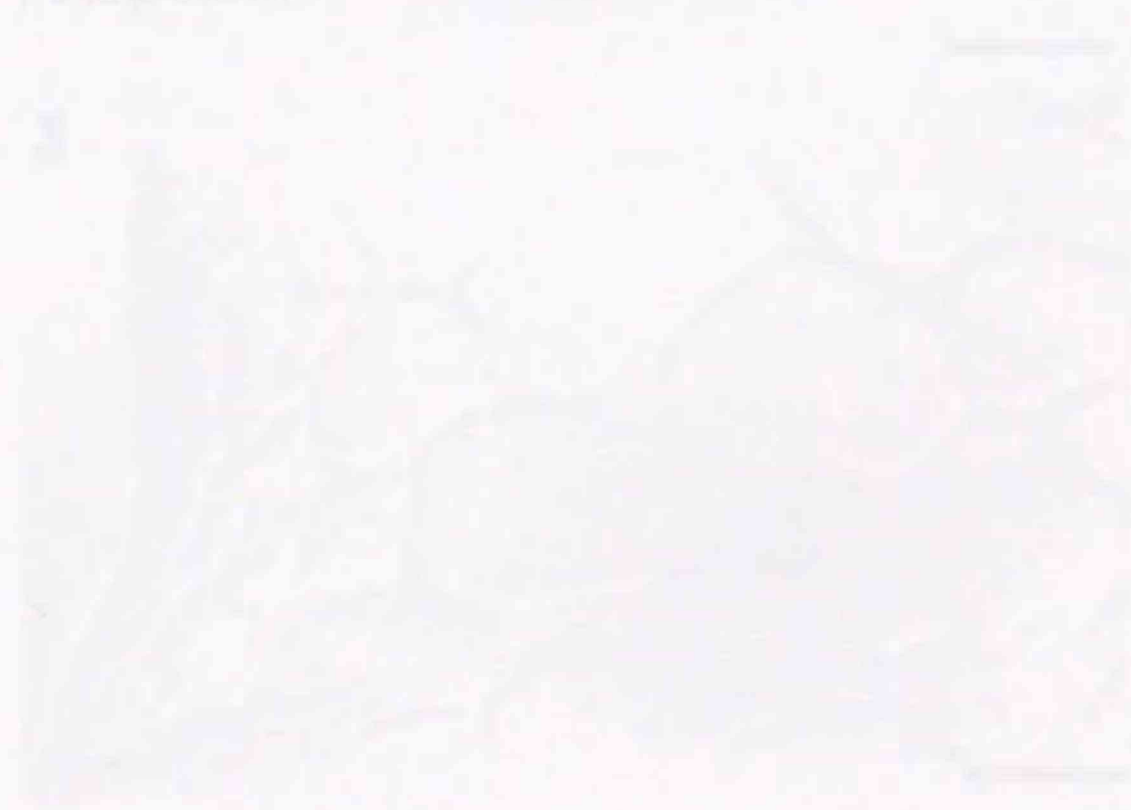




1. New call (arrow) made in the
wounding



2. All the (arrow) and (arrow) of days after
wounding



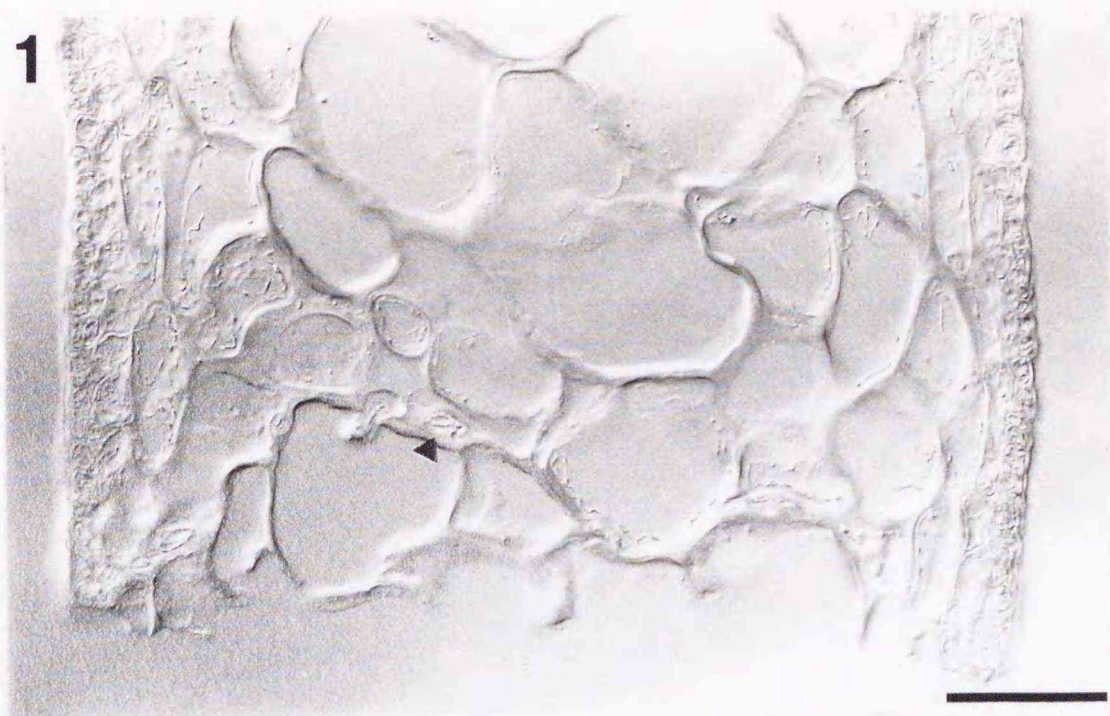
3. Call the (arrow) and (arrow) of days after
wounding

Plate 8

Formation of wound tissue at proximal cut surface of a cultured fragment.

1. New cells (arrowhead) formed at cut surface 5 days after wounding.
2. Cell line (arrowhead) developing at cut surface 11 days after wounding..
3. Cell line (arrowhead) covering cut surface 15 days after wounding.

Scale bars : 100 μ m.



Portion of cell, showing the surface of a culture.

1. Inner cell, showing the surface of a culture.

2. Cells of inner cell, showing the surface of a culture.

Scale bar, 100 μ m.

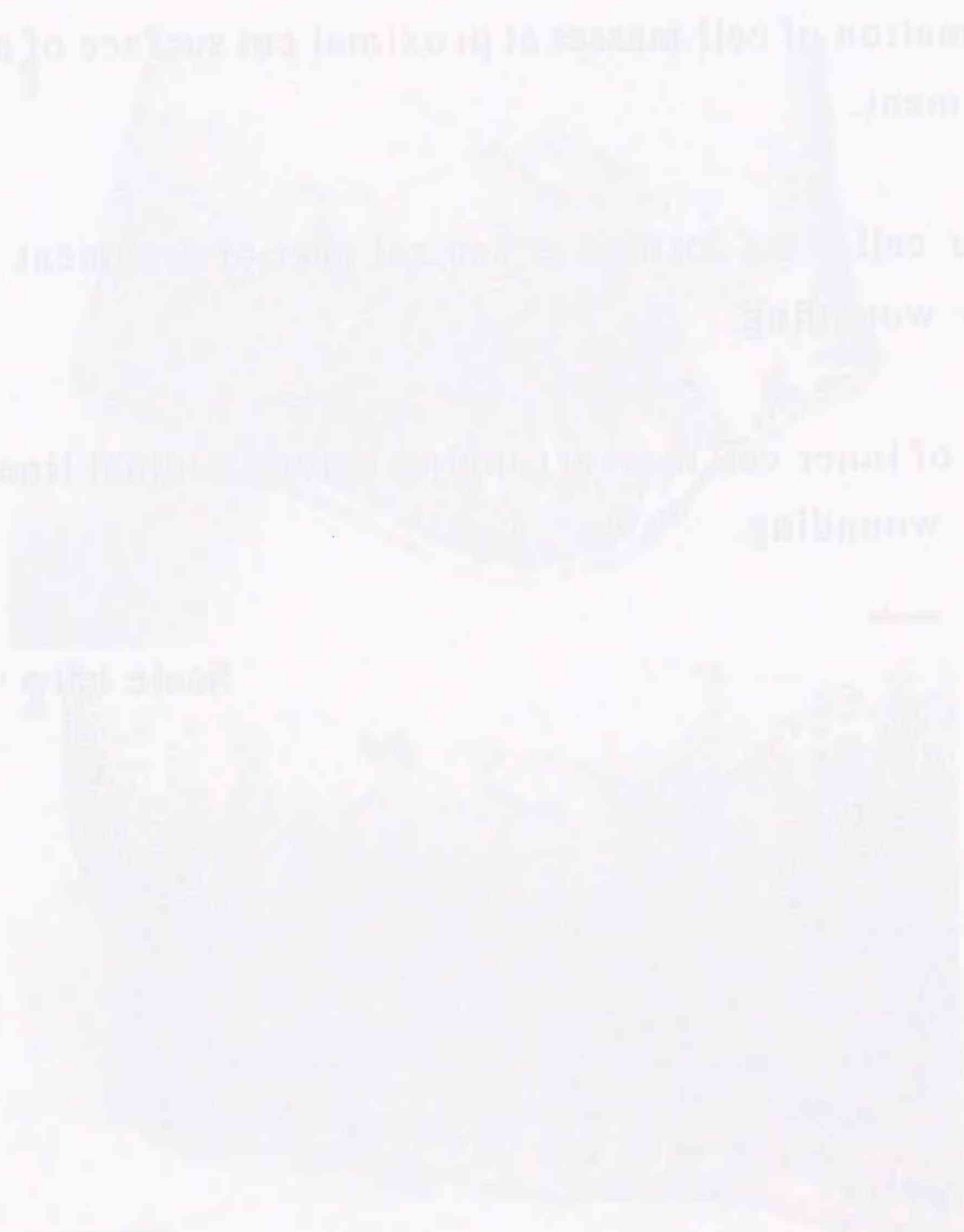


Plate 9

Formation of cell masses at proximal cut surface of a cultured fragment.

1. Inner cell mass formed at central part of fragment 35 days after wounding.
2. Cells of inner cell mass arranging in longitudinal lines 35 days after wounding.

Scale bars : 100 μ m.

1



2



Cell takes up the dye and is stained
segment 32

1. Longitudinal section of whole cell

2. Close-up of part of 1. showing
divided cell

3. Marginal section of whole cell
stained with toluidine blue

4. Close-up of part of 3. showing
divided cell

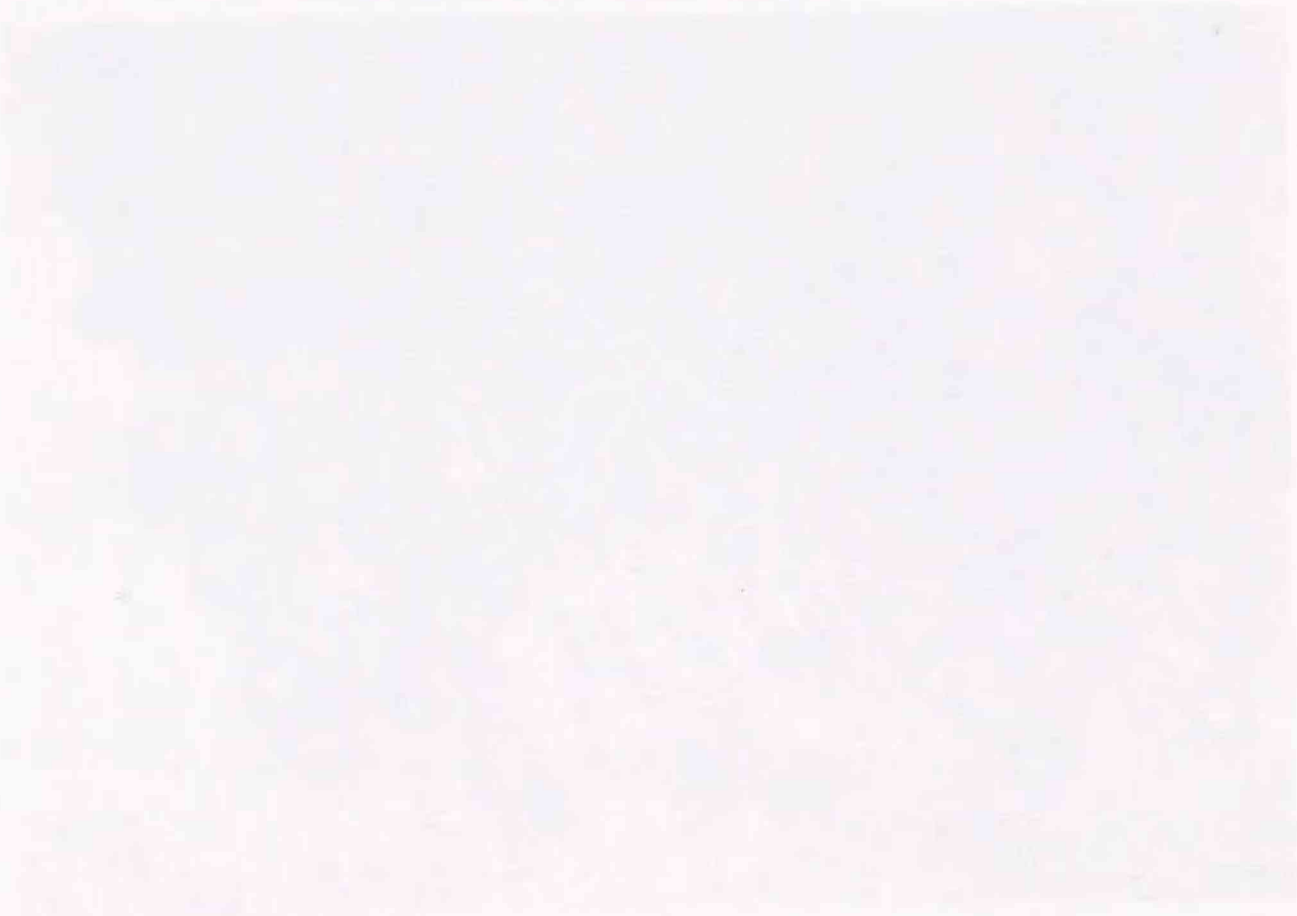
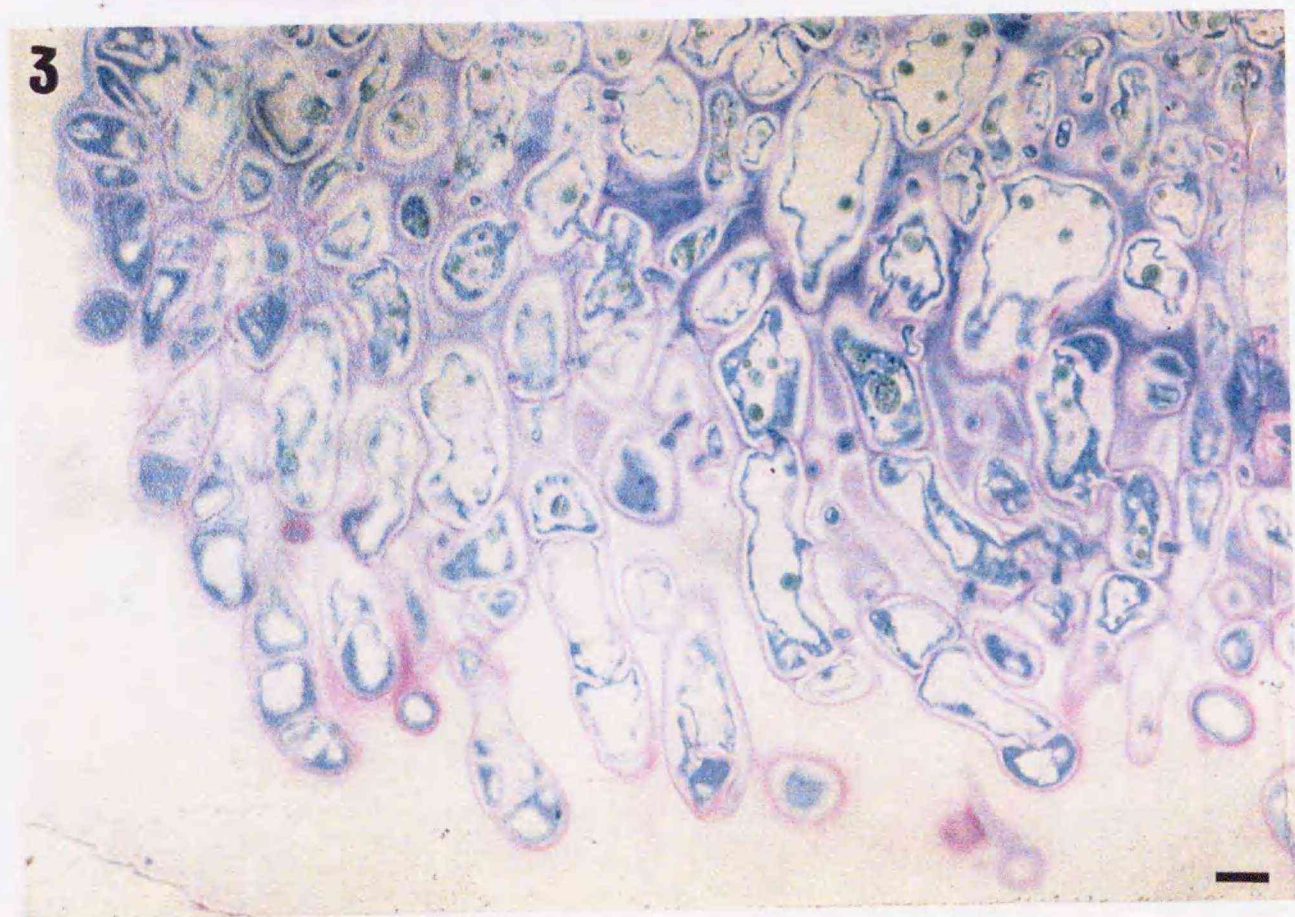
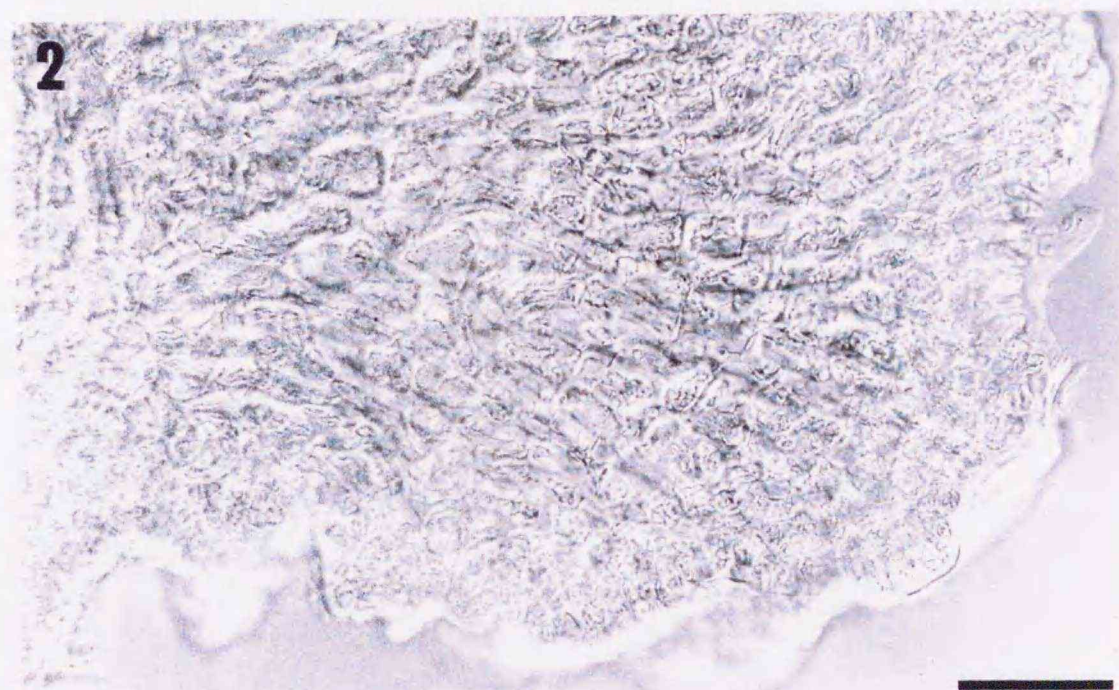
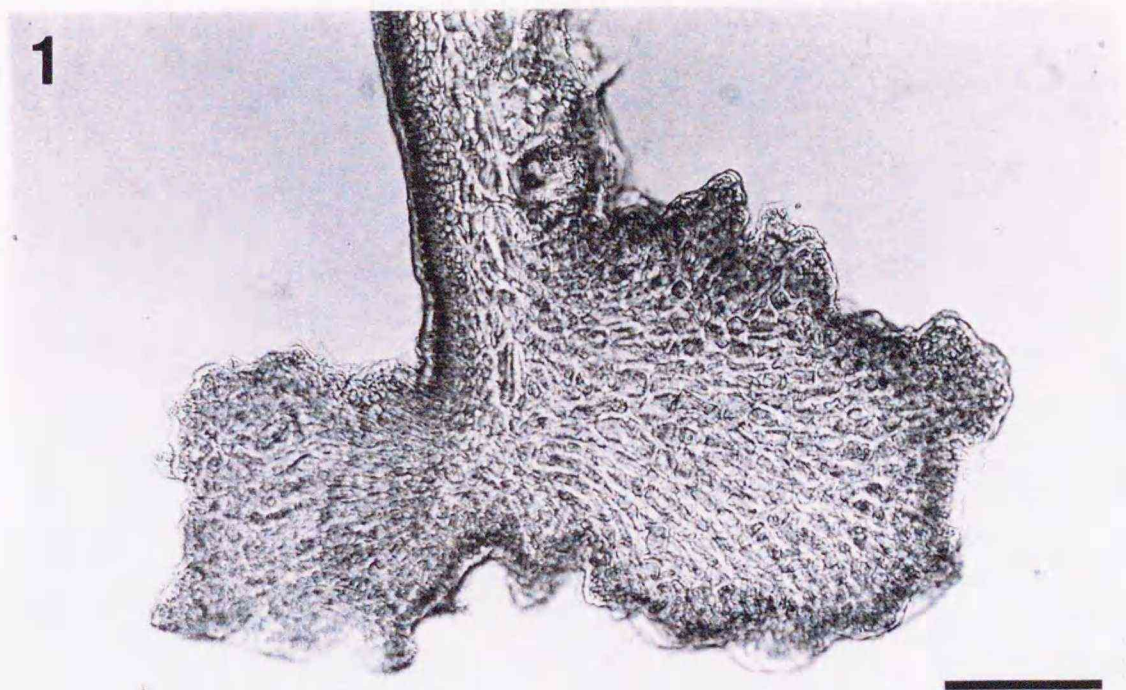


Plate 10

Cell mass formed at proximal cut surface of a cultured fragment 35 days after wounding.

1. Longitudinal section of whole cell mass.
2. Close-up of part of 1. Cell mass consisting of transversely divided cells.
3. Marginal portion of cell mass stained with 1% toruidine blue solution, showing cells with vacuoles.

Scale bars : 100 μ m for 1, 2 ; 10 μ m for 3.



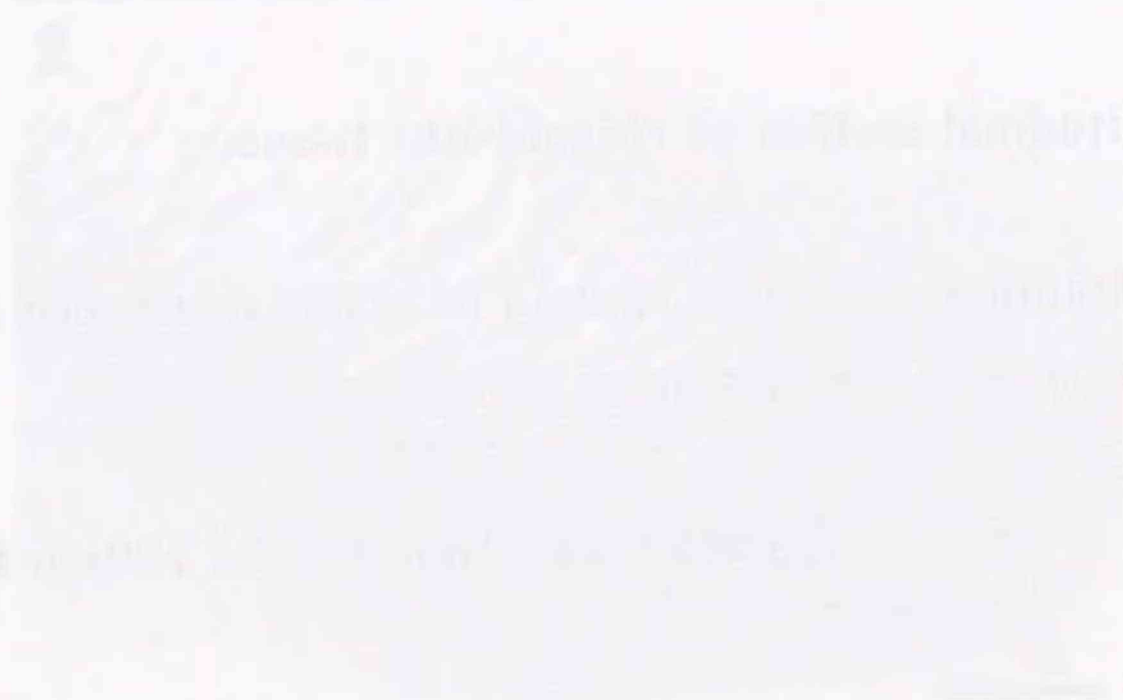
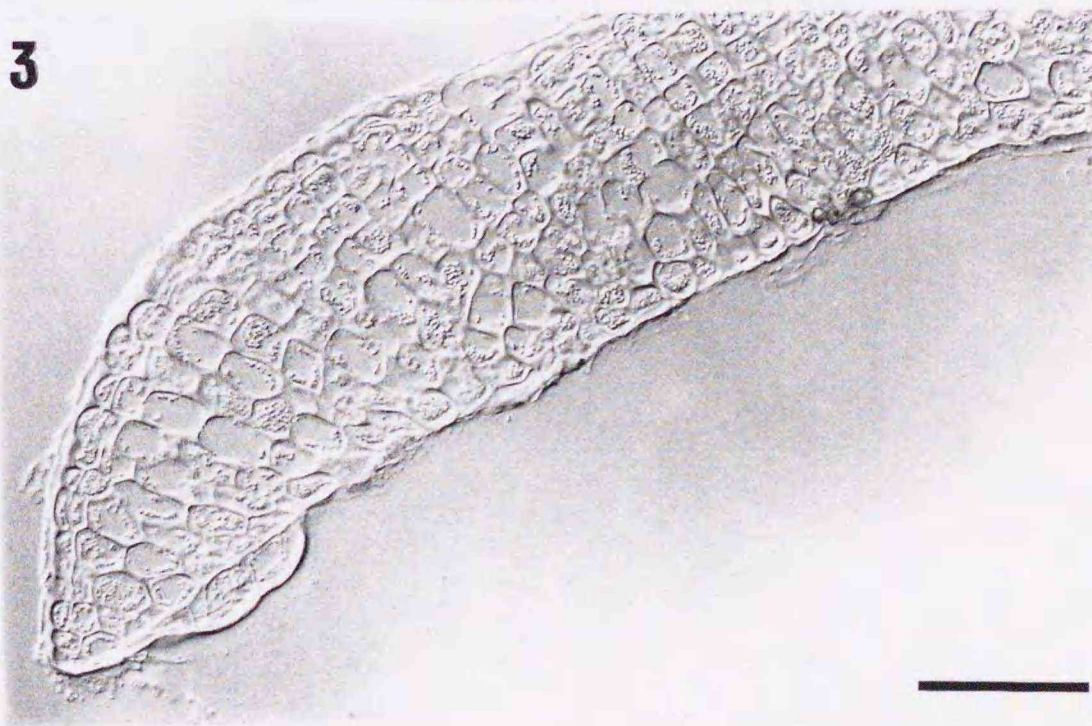
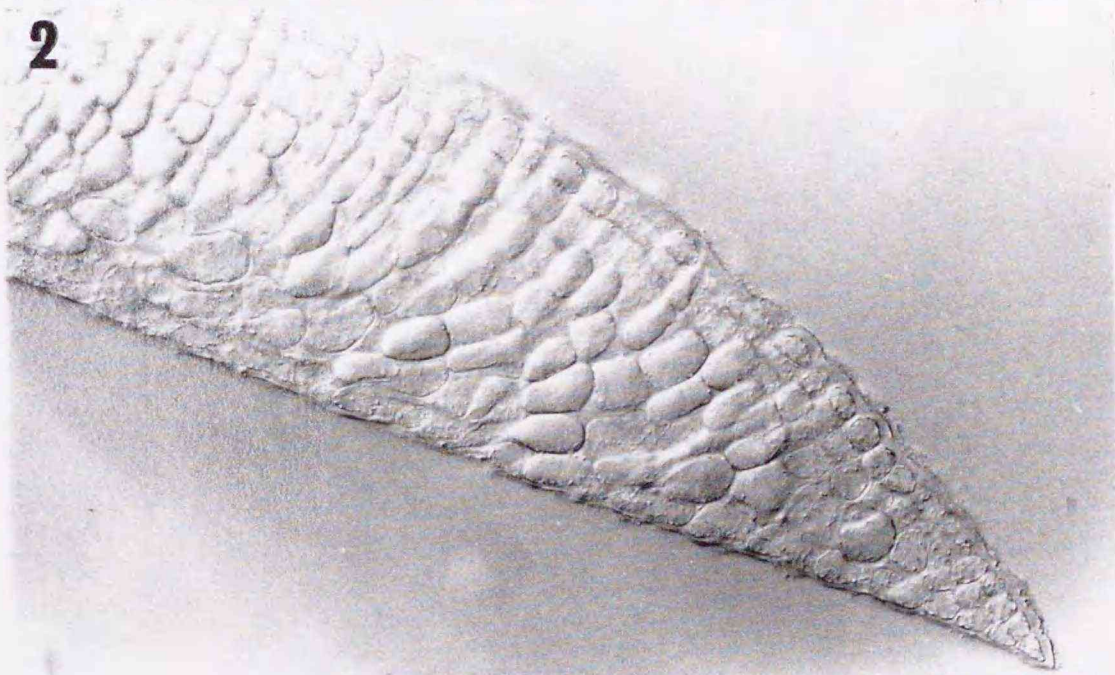
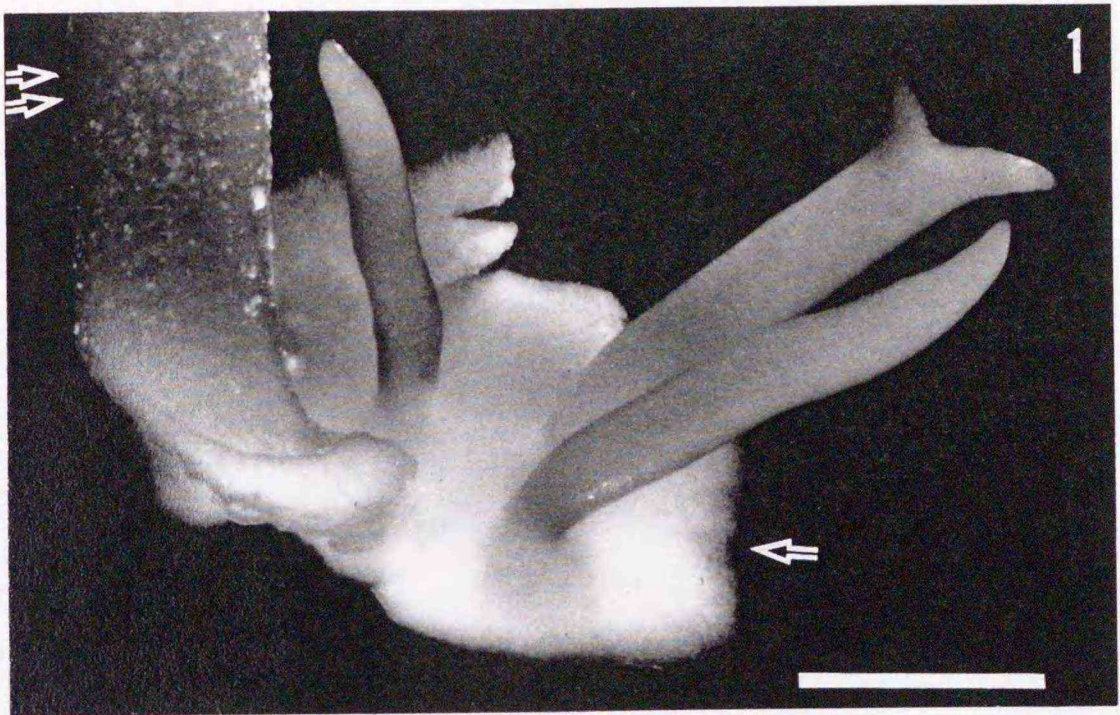


Plate 11

Rhizoid-like tissue and shoots.

1. Rhizoid-like tissue (arrow) developed at proximal cut surface of a fragment (doublearrow), showing three erect shoots issuing from the surface of rhizoid-like tissue.
2. Longitudinal section of rhizoid-like tissue.
3. Longitudinal section of rhizoid of plants developed from a spore, showing arrangement of cells similar to 2.

Scale bars : 1mm for 1 ; 100 μ m for 2, 3.



Longitudinal sections of rhizoid-like tubes and erect rhizoids (arrowhead).

Scale bar = 100 μ m



Plate 12

Longitudinal sections of rhizoid-like tissue and erect shoot
(arrowhead).

Scale bar : 100 μ m.



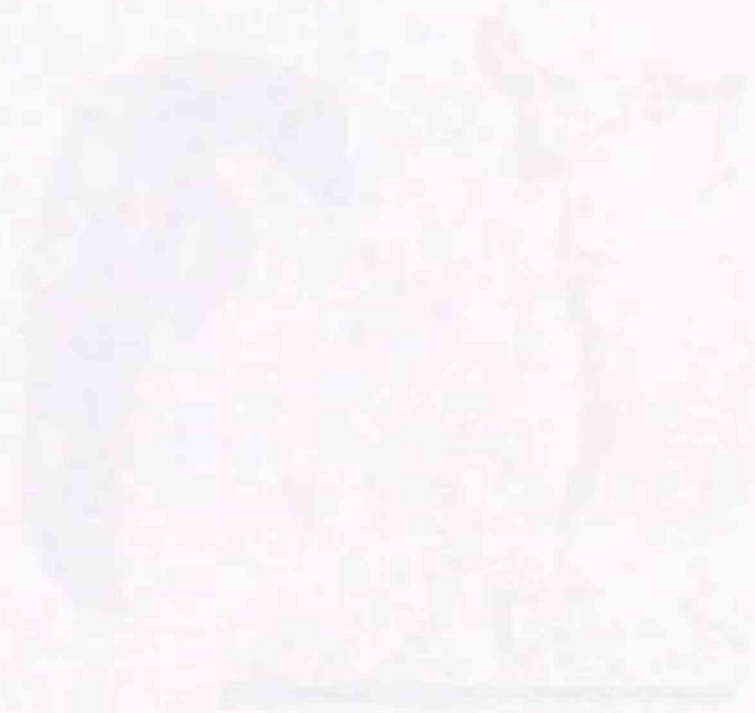
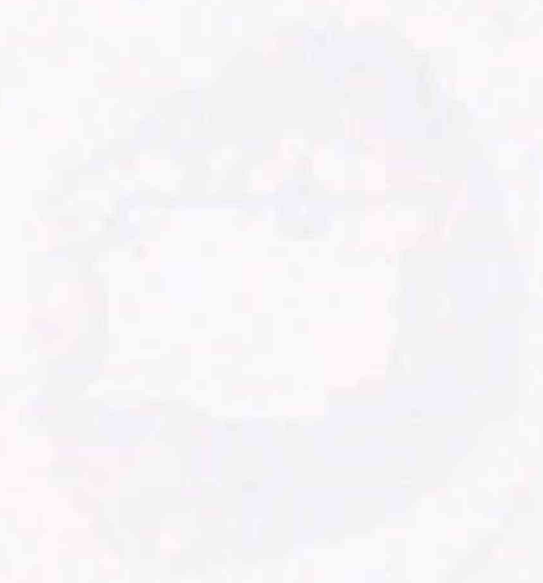
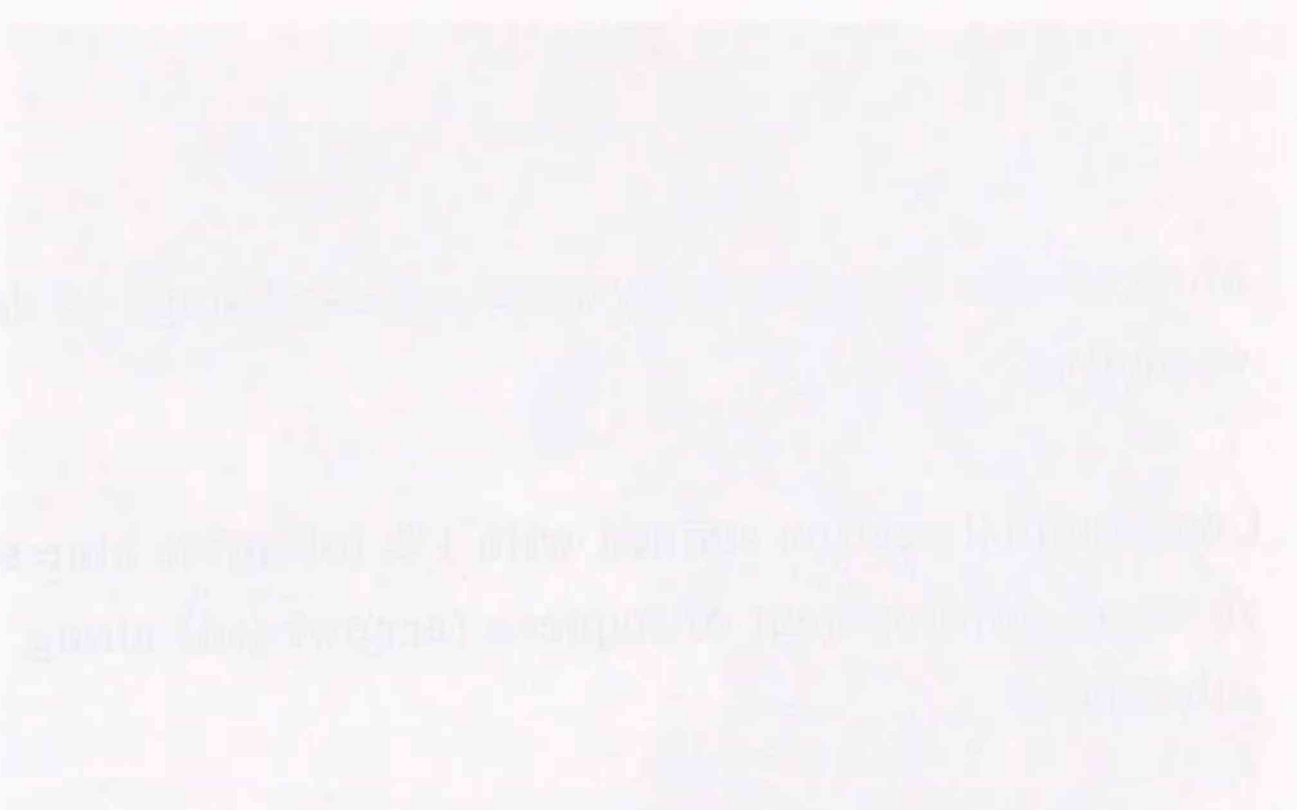


Plate 13

Rhizoid-like tissue in early developmental stage 15 days after wounding.

1. Longitudinal section stained with 1% toluidine blue solution, showing development of haptera (arrowhead) along substratum.
2. Haptera cells of rhizoid-like tissue, showing well-developed cell walls.

Scale bars : 10 μ m.

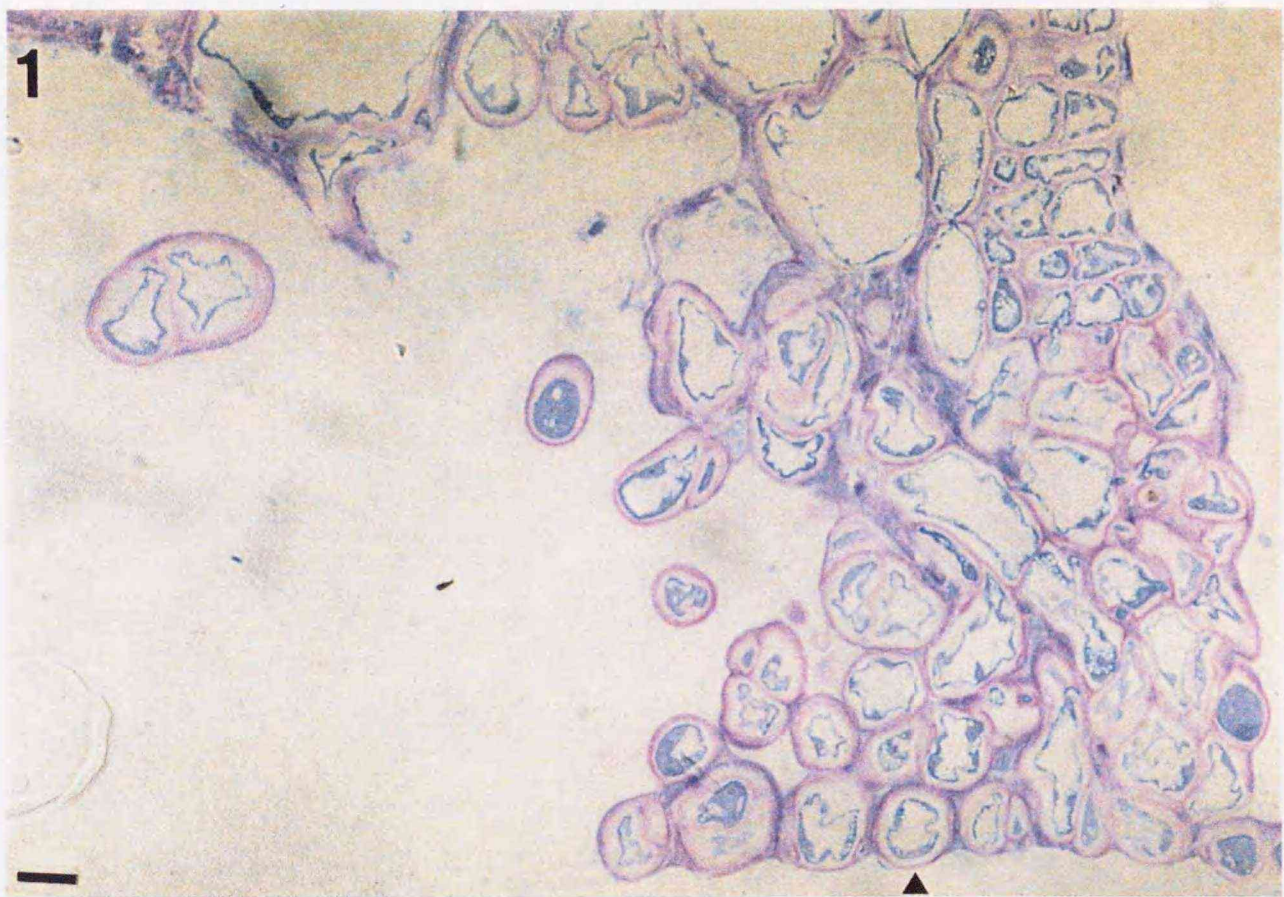




Plate 14

Development of regenerative shoots and regeneration of additional shoots at distal cut surface.

1. Single regenerative shoot (arrow) from the distal cut surface of a fragment (doublearrow).
2. 21 days after of 1. Elongating regenerative shoot (arrow). New regenerative shoots do not appear at distal cut surface, suggesting apical dominance of an existing shoot.
3. Regenerative shoot cut for cancelling apical dominance (arrow).
4. Regeneration (arrow) of cut shoot and a new regenerative shoot (doublearrow) issuing from cut surface 21 days after cutting, showing a new shoot induced by removing tip of an existing shoot.

Scale bars : 1mm.

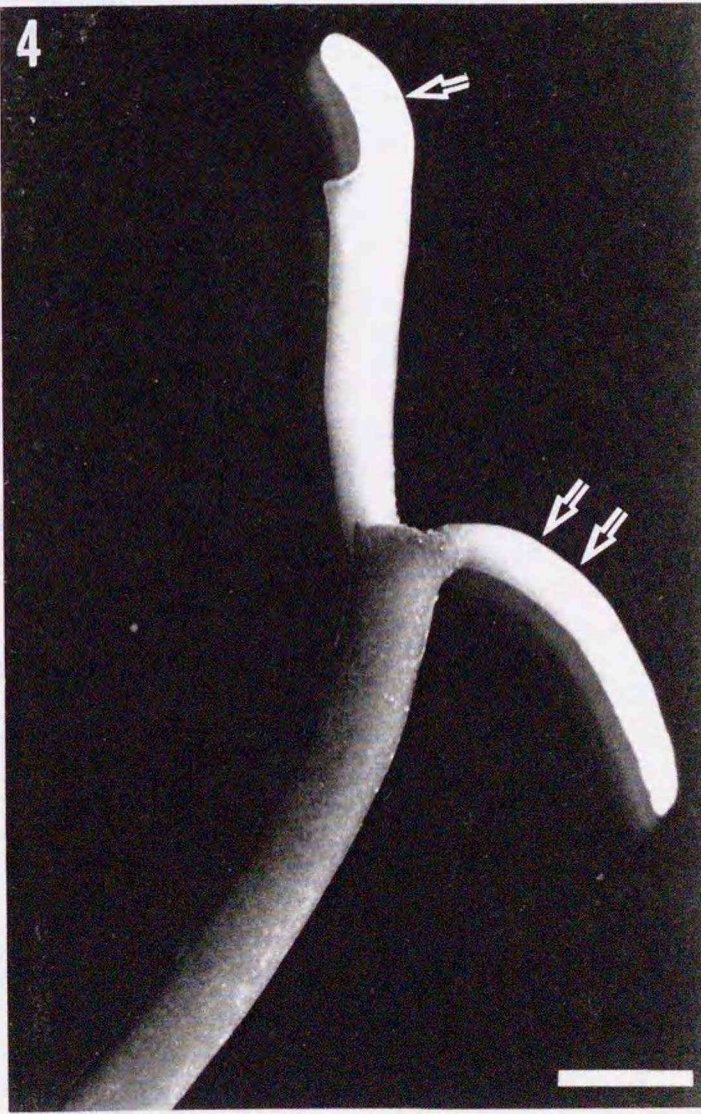
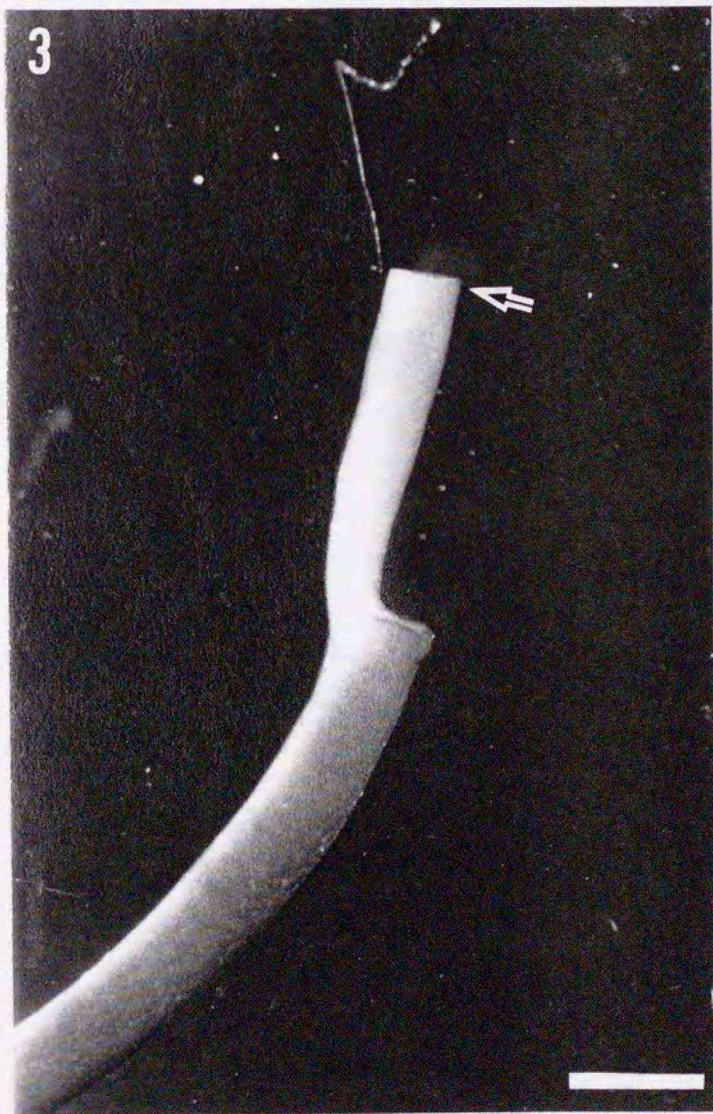
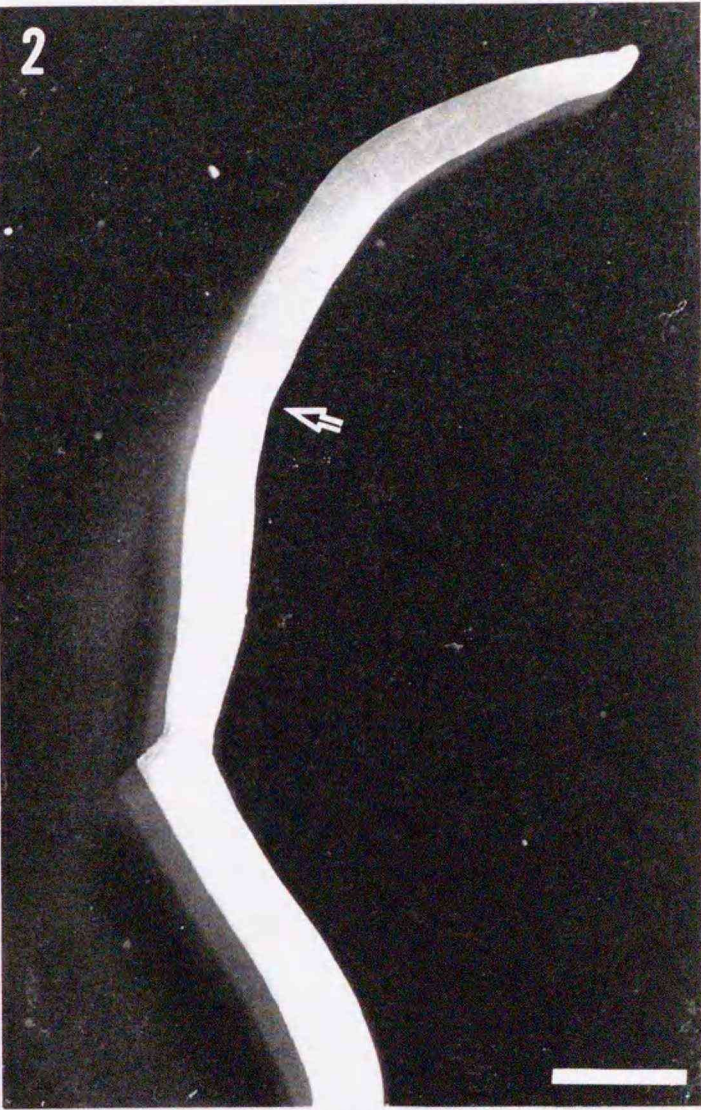
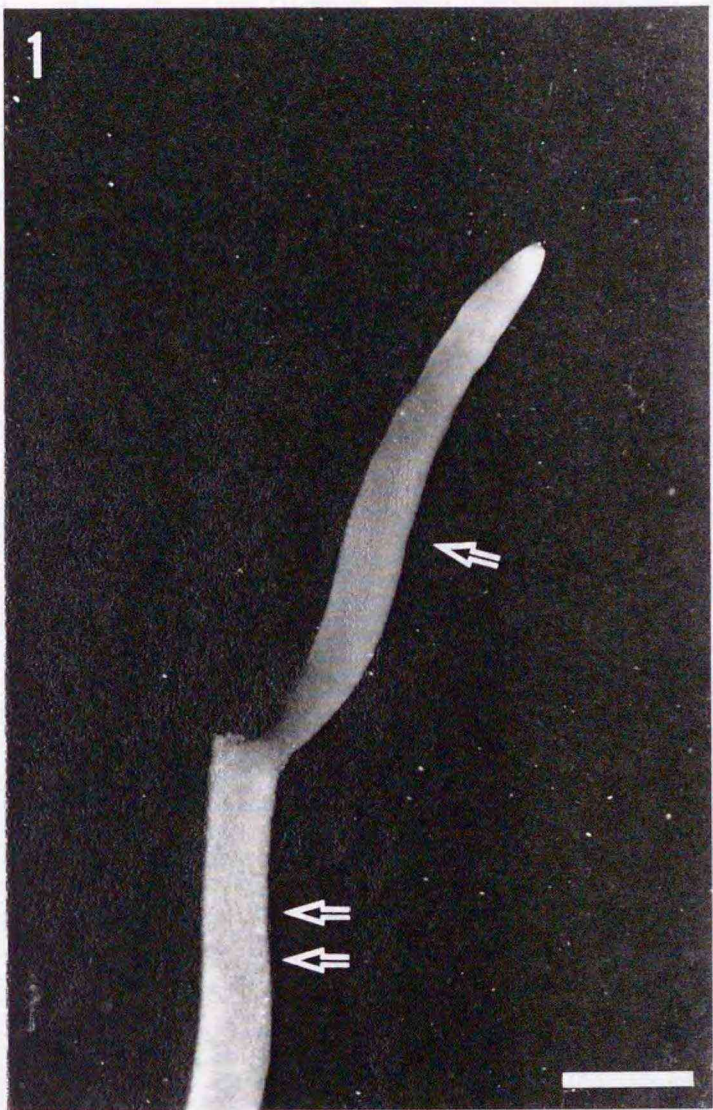


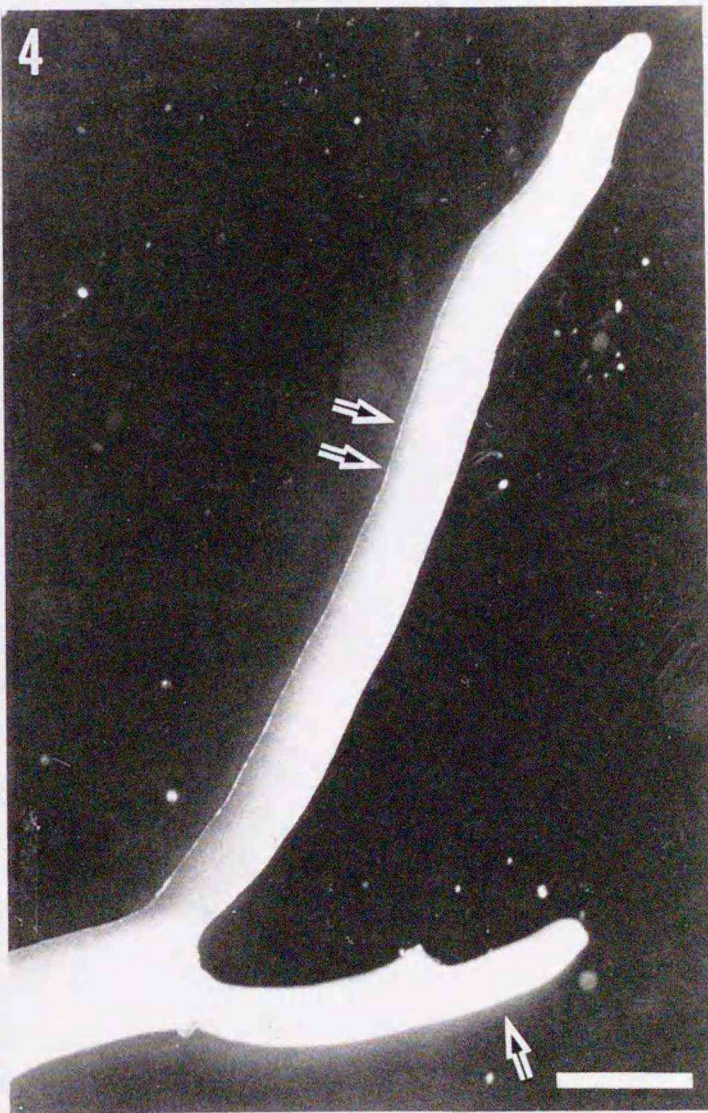
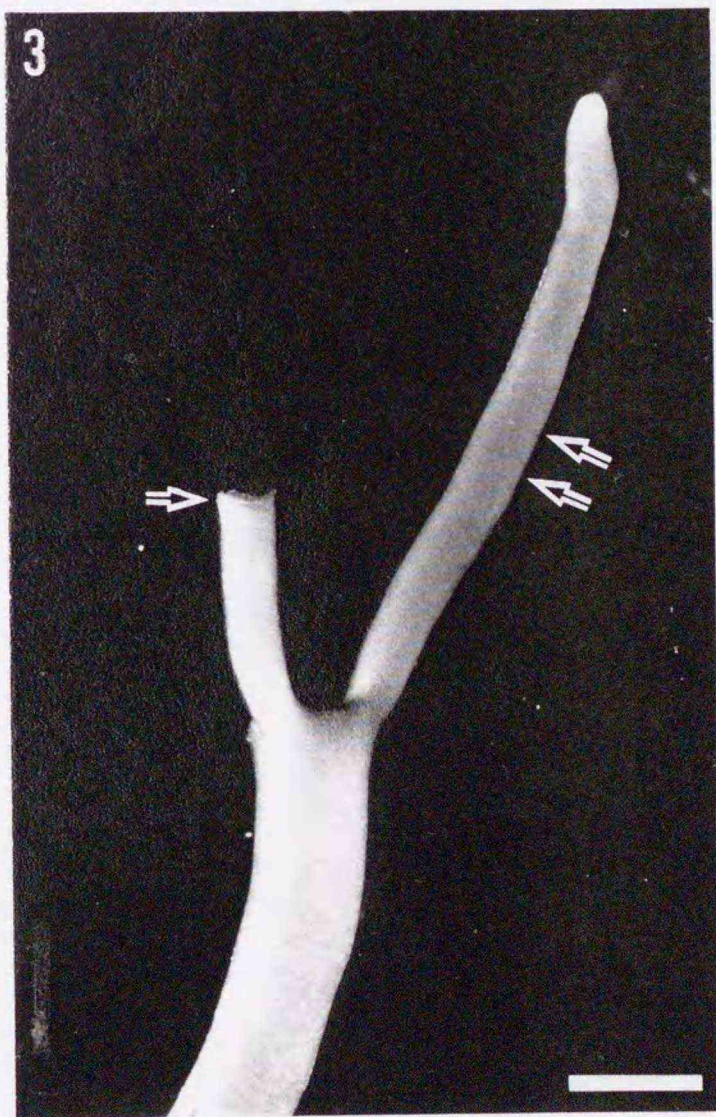
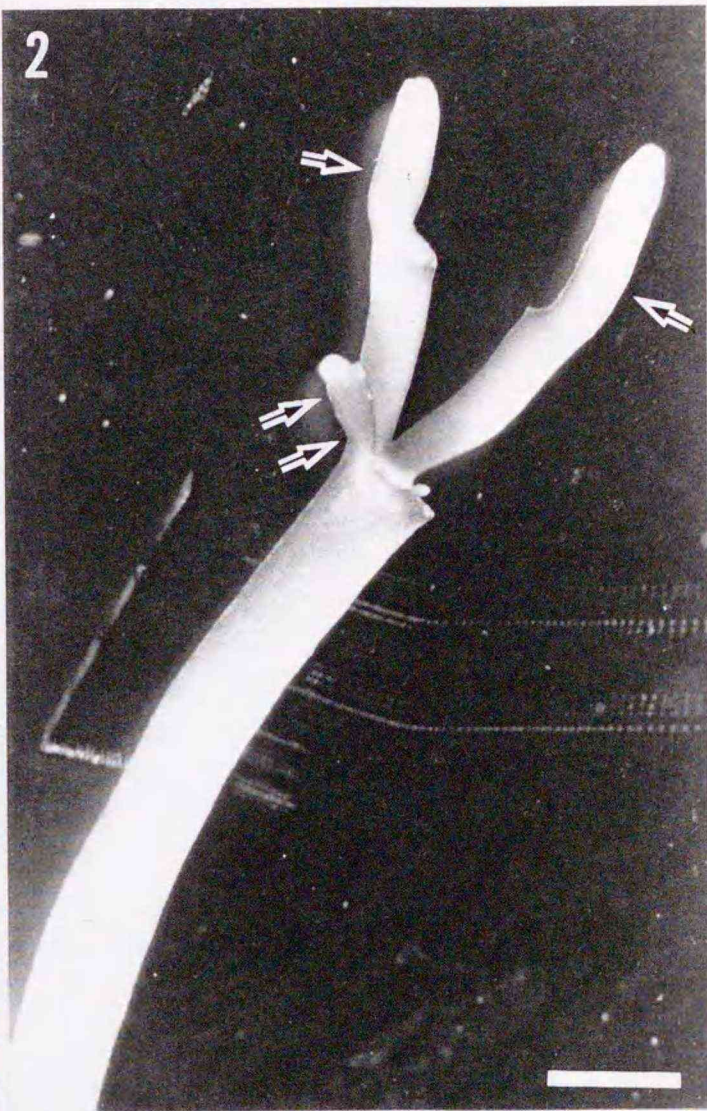
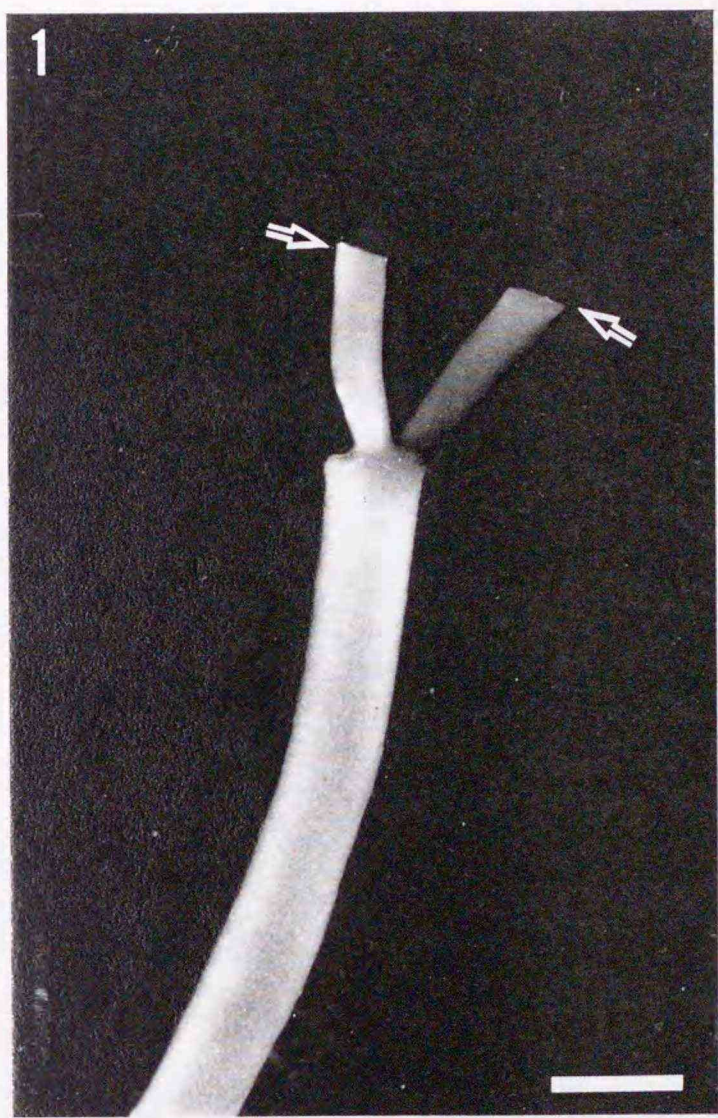


Plate 15

Regeneration of additional shoots at distal cut surface.

1. Two regenerative shoots cut (arrows) for cancelling apical dominance.
2. Regeneration (arrows) of cut shoots and a new regenerative shoot (doublearrow) issuing from cut surface 21 days after cutting, showing a new shoot induced by removing tip of an existing shoot.
3. One of two regenerative shoots is cut (arrow), but the other is (doublearrow) remained intact.
4. Regeneration (arrow) of cut shoot and elongation of intact shoot (doublearrow) 21 days after cutting, showing no regeneration at cut surface.

Scale bars : 1mm.



Cultivation of cortical tissue

1. Cross section of cortical tissue (100 μ m thick)
2. Staining of cross section (100 μ m thick) with toluidine blue
3. Staining of cross section (100 μ m thick) with toluidine blue

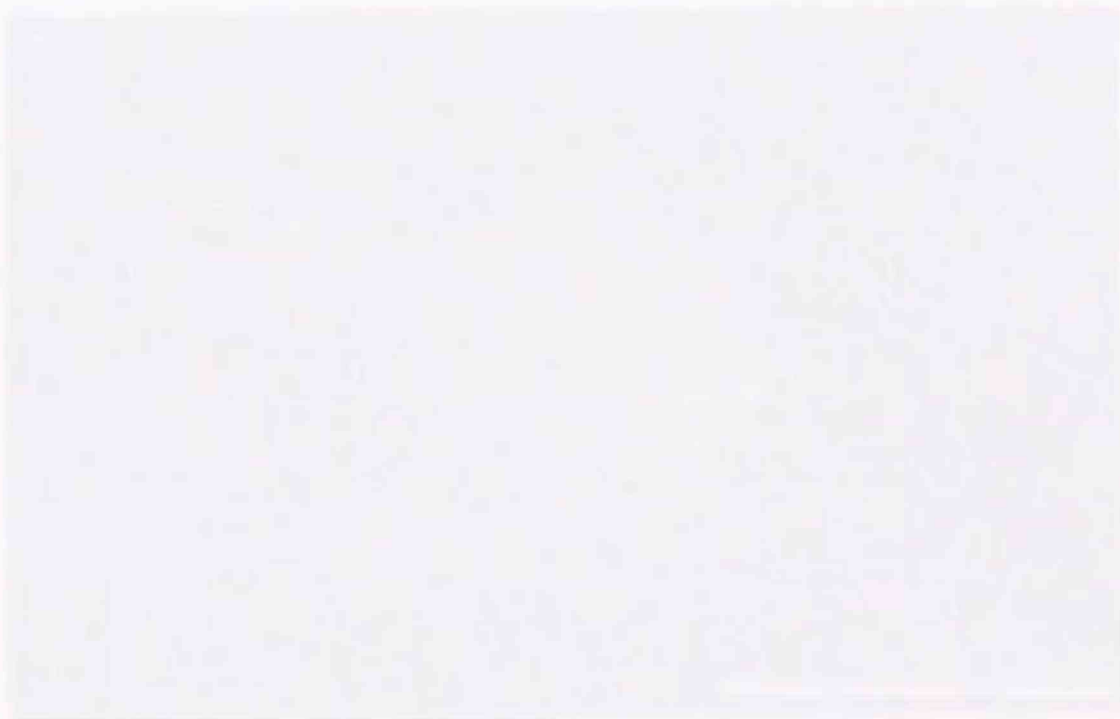
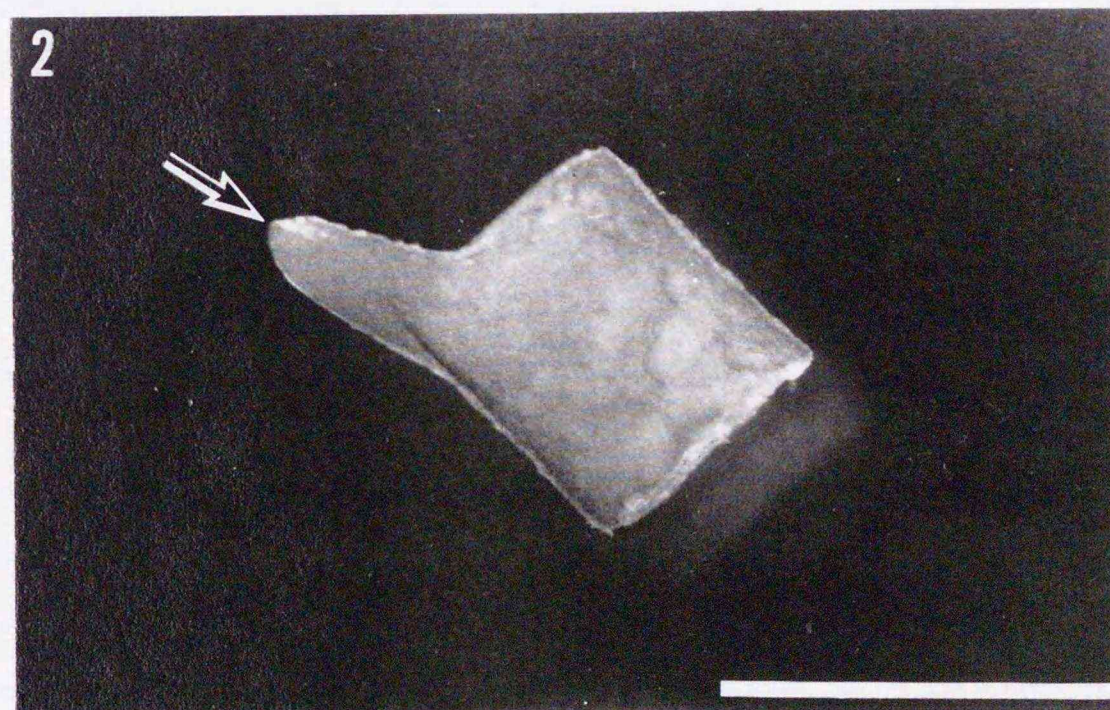


Plate 16

Cultivation of cortical tissue.

1. Cross section of cortical tissue used for cultivation.
2. Showing a regenerative shoot (arrow) issuing from distal cut surface 30 days after cutting.

Scale bars : $100\mu\text{m}$ for 1 ; 1mm for 2.





Cuba

1. Prag

2. Elab

3. sho

4. list

5. eye

1. Prag
2. Elab
3. sho
4. list
5. eye

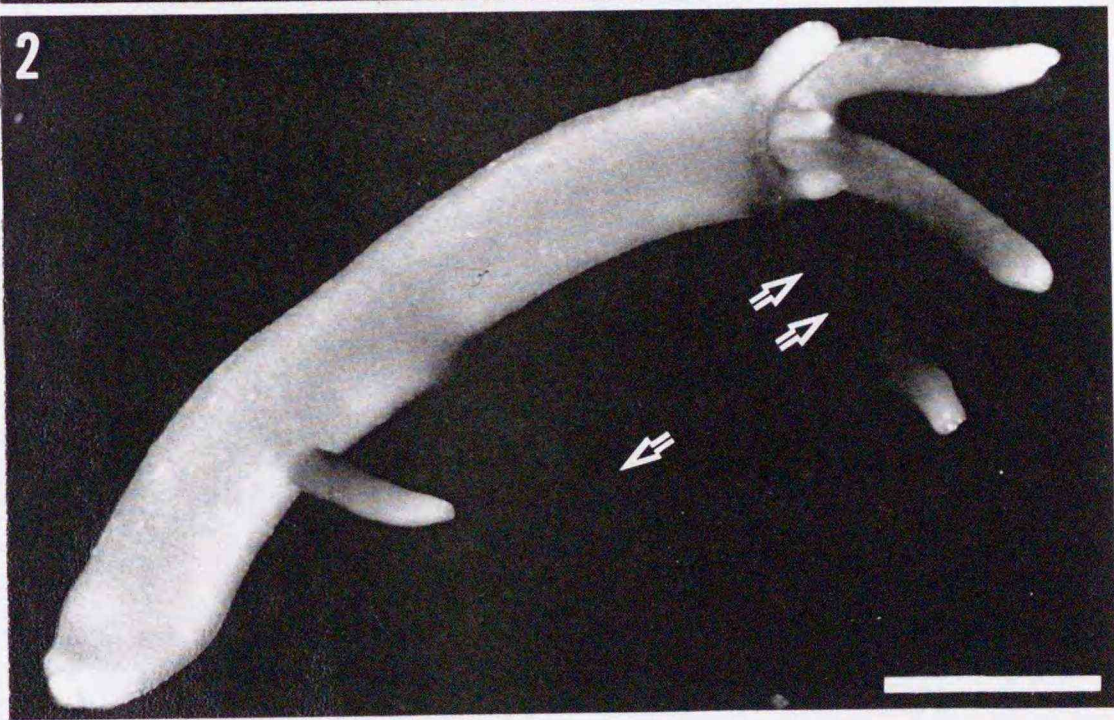
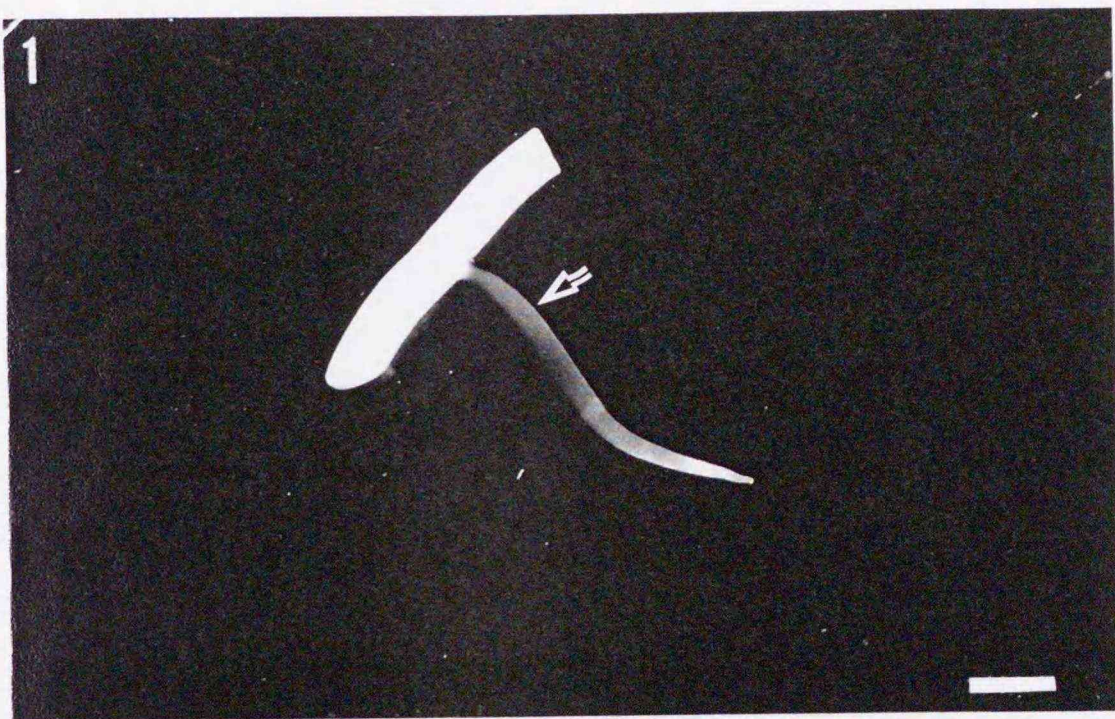
1. Prag
2. Elab
3. sho
4. list
5. eye

Plate 17

Cultivation of fragment with a lateral branch.

1. Fragment with a lateral branch (arrow).
2. Elongation of lateral branch (arrow), and six regenerative shoots (doublearrow) issuing from distal cut surface 21 days after cutting, showing lateral branches do not control regeneration at distal cut surface.

Scale bars : 1mm.



Cultivation of 30 m. to 40 m. in diameter

(art)

regio

dom

lateral

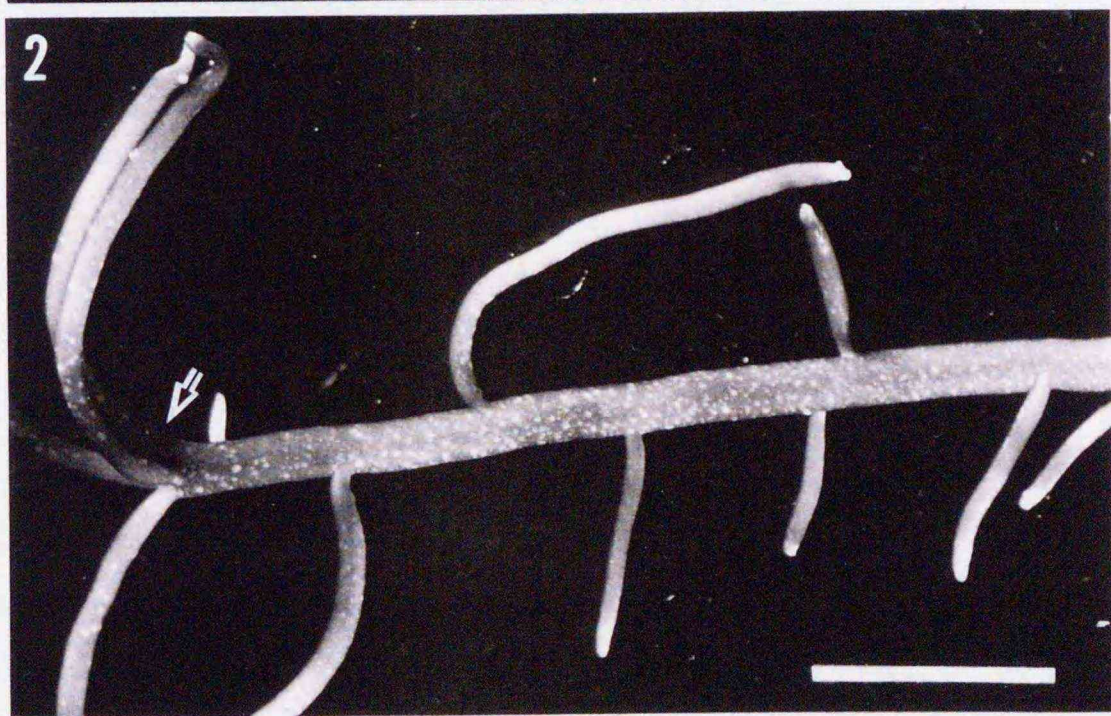
12. 1. 1900



Plate 18

Cultivation of 30-mm fragments. Four regenerative shoots (arrow) issuing from distal cut surface and several regenerative lateral shoots, showing absence of apical dominance in long fragments.

Scale bars : 1mm.



1. (continued) section 1 day after spawning. Cytoplasm is lost from wounded cell (WC); but remains intact in nearby cells.



Plate 19

Longitudinal section 1 day after wounding. Cytoplasm is lost from wounded cell (WC), but remains intact in inside cells (IC).

Scale bar : $1\mu\text{m}$



Longitudinal section of an insect with 5 days after
wounding. The wound is on the right side of the body
and the insect is shown in a lateral view.

Fig. 1



Plate 20

Longitudinal section of an inside cell (IC) 2 days after wounding. Nucleus (arrow) and cytoplasm moved toward wound side (arrowhead).

Scale bar : 10 μ m



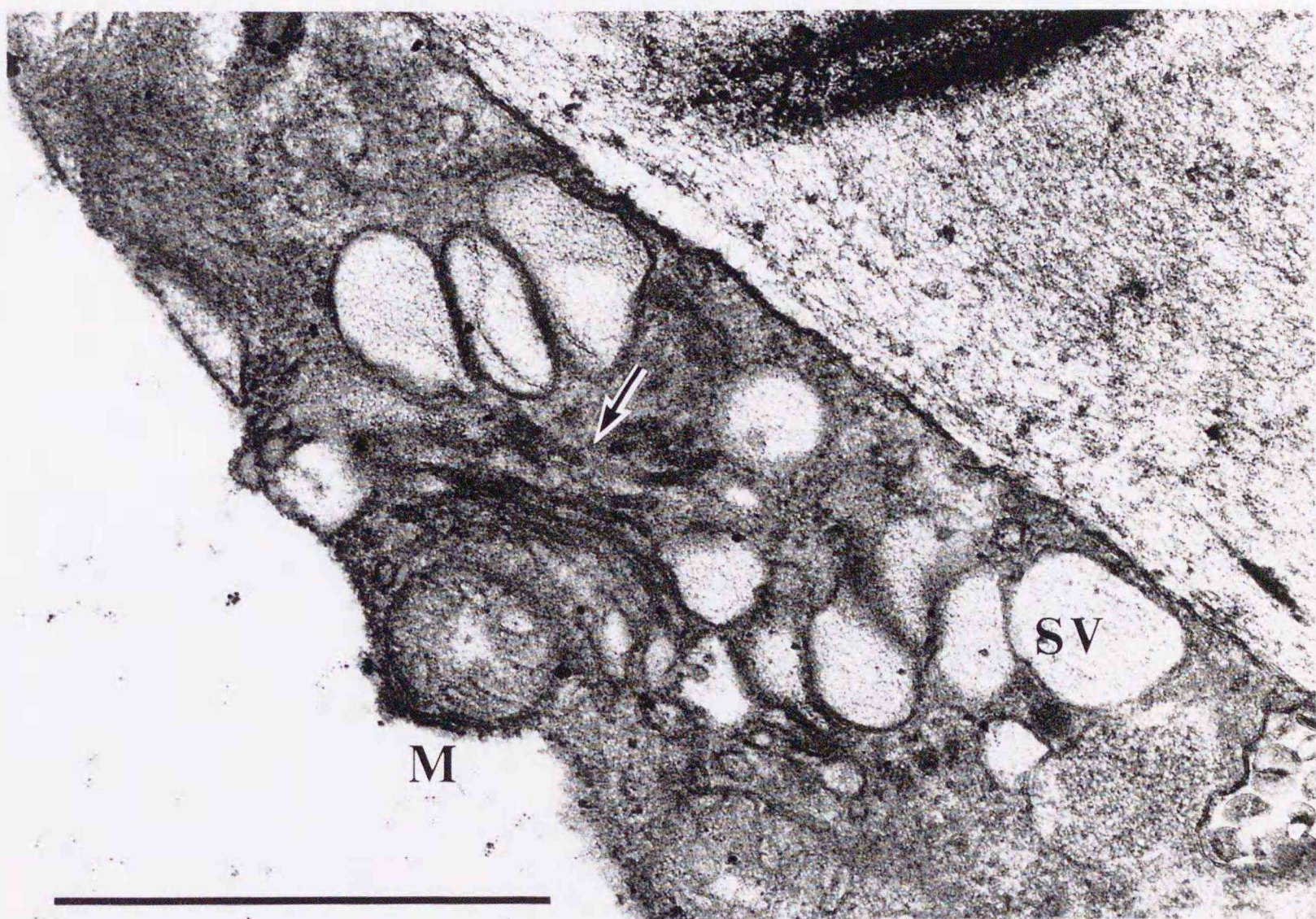
Section of an inside wall, showing the
(a) (b) location of the wall in the interior of the building.



Plate 21

Section of an inside cell 2 days after wounding. Golgi body (arrow) locating near wound side is releasing many secretory vesicles (SV). A mitochondrion (M) is near the Golgi body.

Scale bar : $1\mu\text{m}$.



Section of the ...
...
...

1. ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...

...

...

...

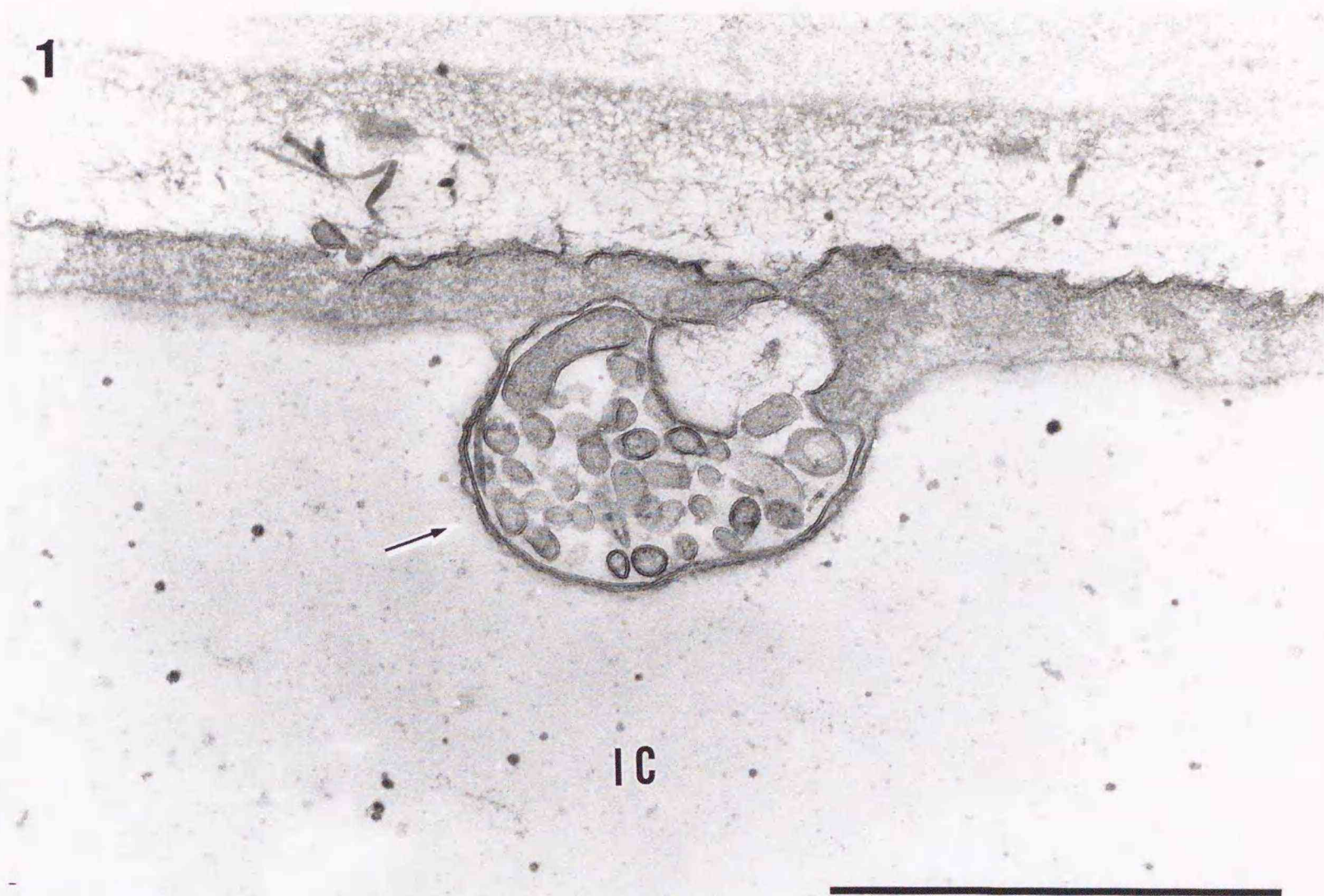
Plate 22

Sections of an inside cell (IC) 2 days after wounding.

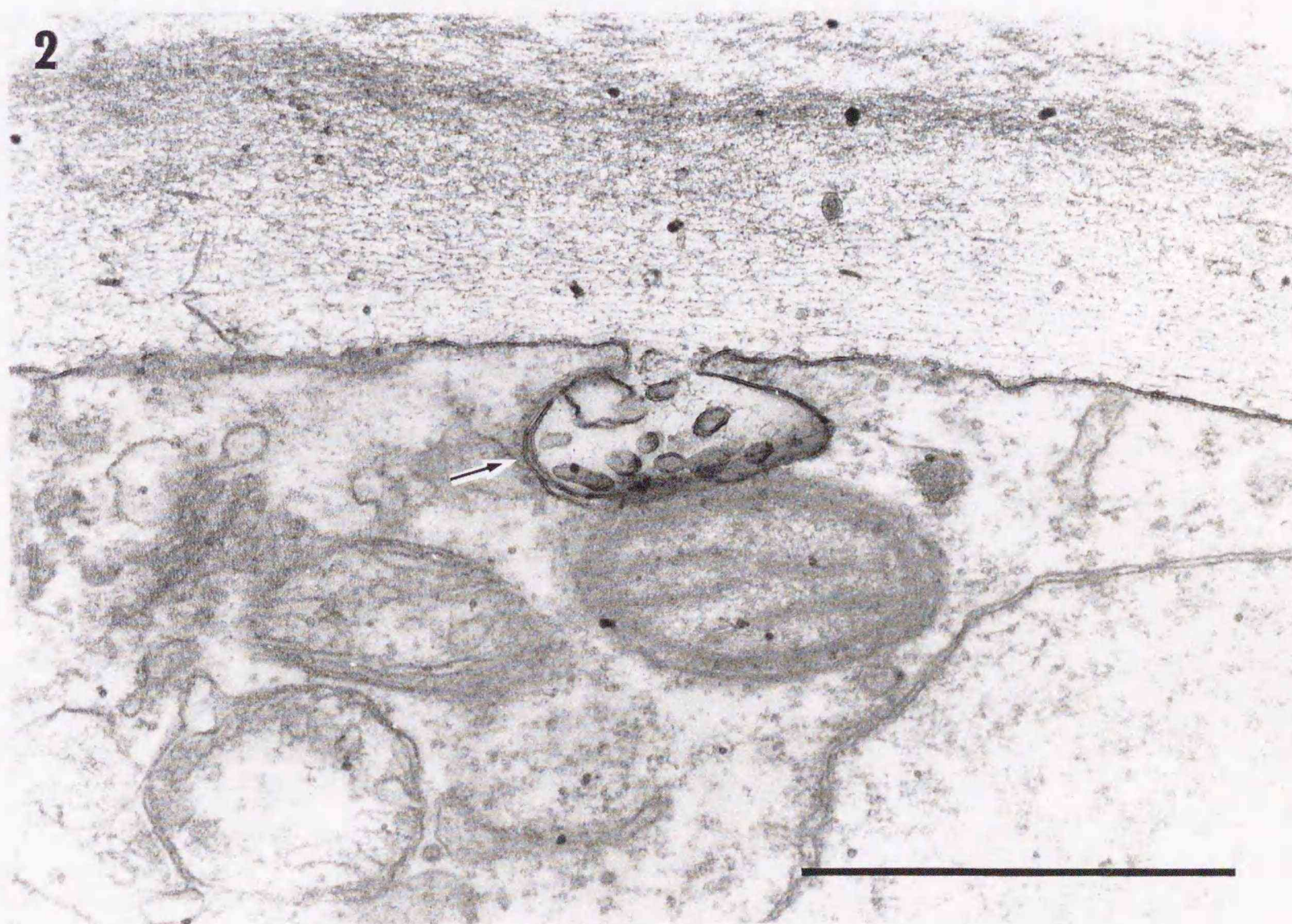
1. Multivesicular body (arrow) is located near wound side.
2. Multivesicular body (arrow) is releasing its contents into cell wall.

Scale bars : $1\mu\text{m}$.

1



2



Section of an inside wall 3 days after burning
showing the charred wood (left) divided into the two



Plate 23

Section of an inside cell 2 days after wounding, showing a chloroplast (ch) divided into the two.

Scale bar : $1\mu\text{m}$.



1. The first part of the paper is devoted to a general discussion of the problem of the origin of life. It is shown that the problem is one of the most important and most difficult in the history of science. The author discusses the various theories of the origin of life, and shows that the most plausible is the theory of spontaneous generation. This theory is based on the fact that life is a complex of many different parts, and that these parts are all derived from a common ancestor. The author also discusses the possibility of life being introduced from elsewhere, and shows that this is also a possibility. The paper concludes with a discussion of the future of the study of the origin of life.

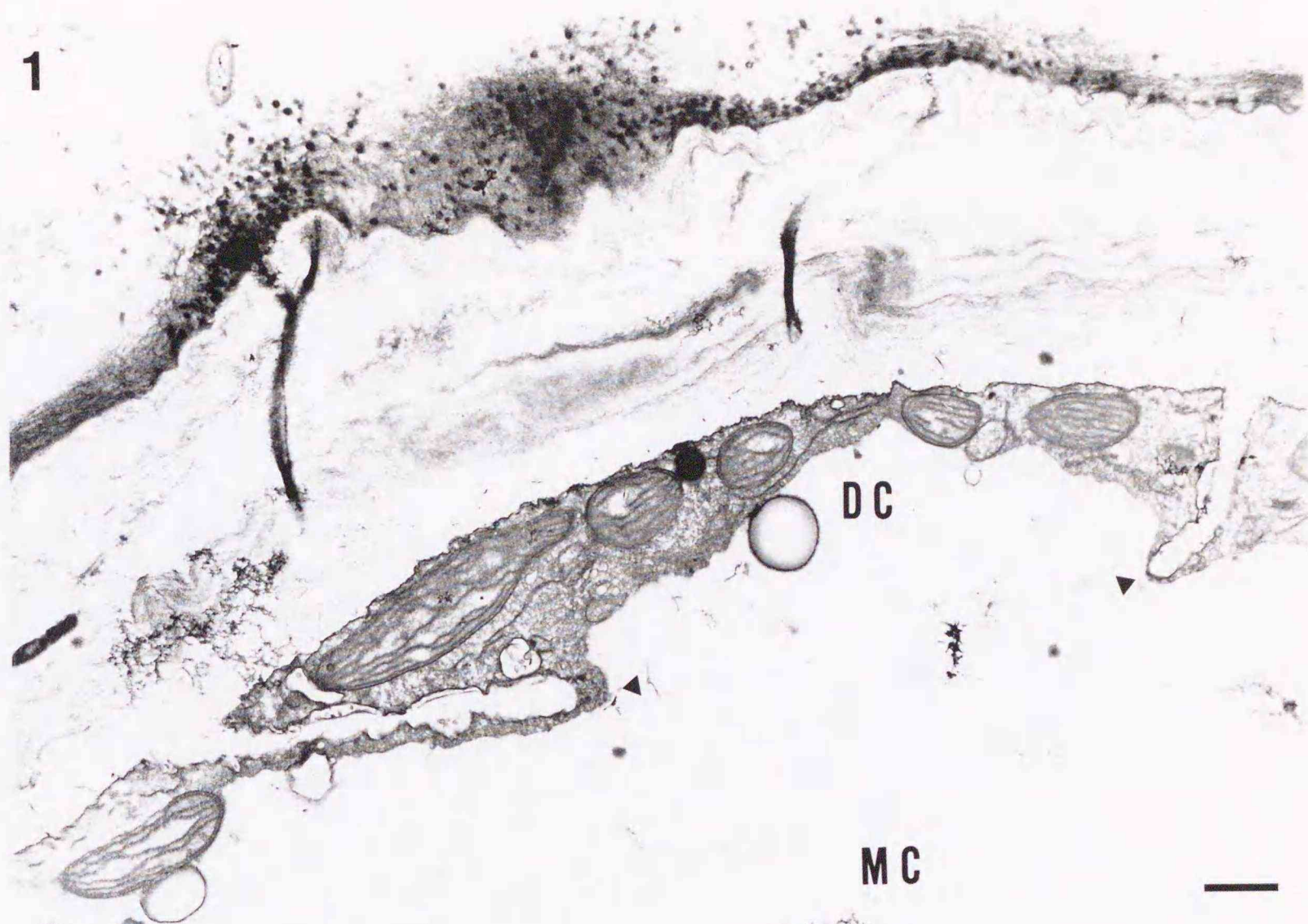
Plate 24

Section of an inside cell 2 days after wounding.

1. Cytokinesis is occurring at wound side, showing cleavage furrows (arrowheads) separating a daughter cell (DC) from mother cell (MC).
2. Section of an inside cell 2 days after wounding, showing stepping stone-like cleavage furrow (arrow).

Scale bars : $1\mu\text{m}$.

1



2

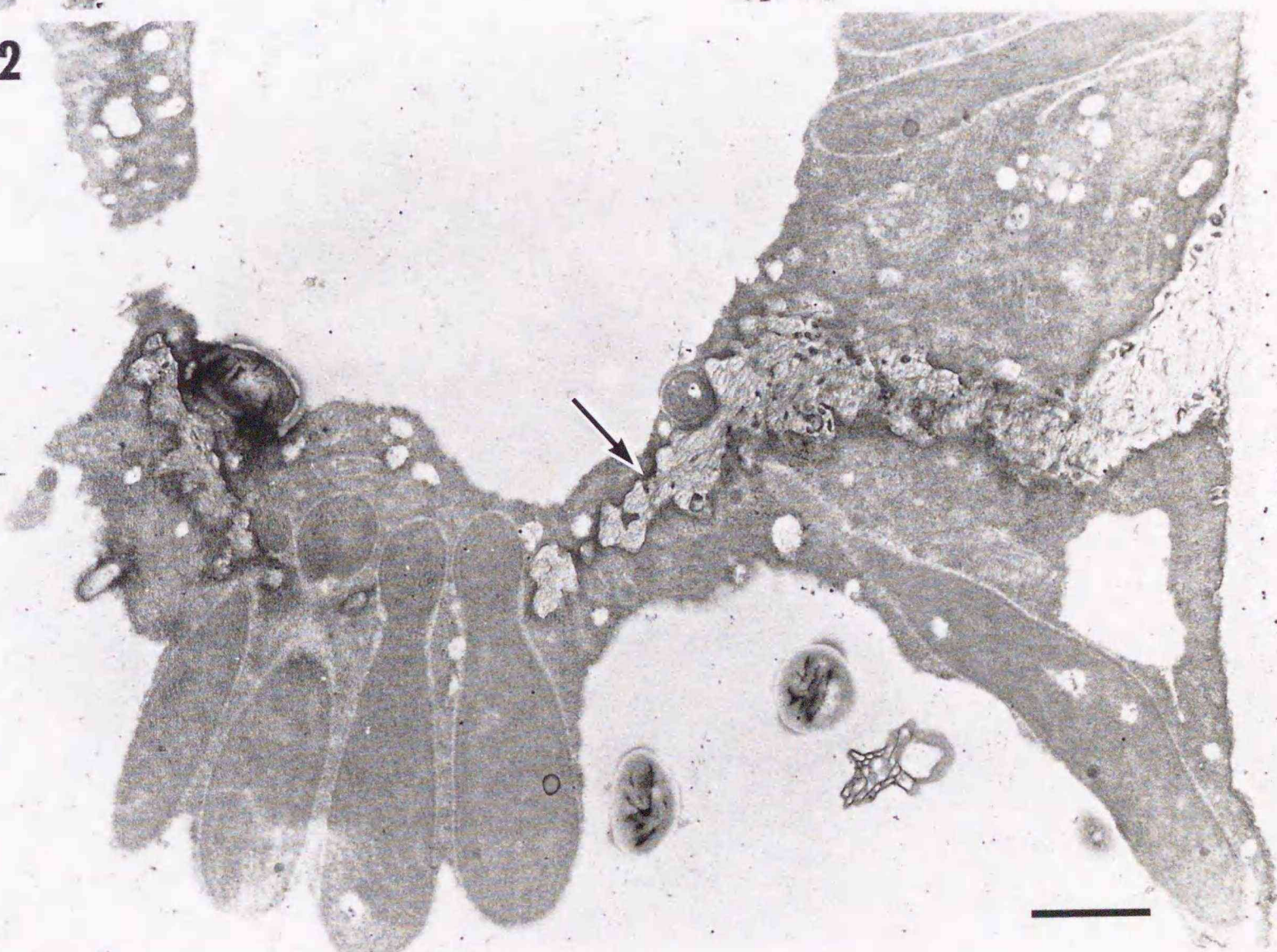




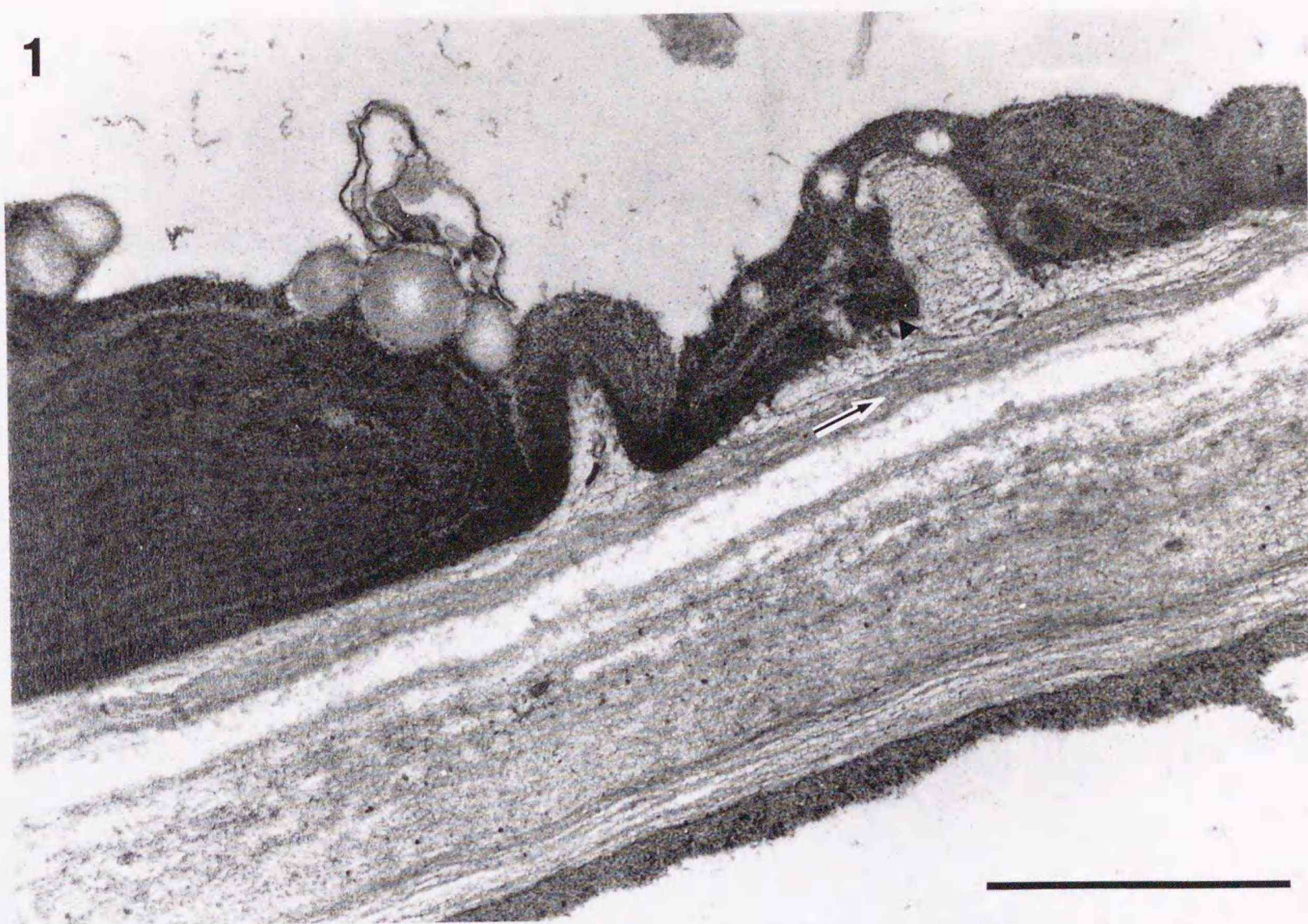
Plate 25

Close-up of cleavage furrow.

1. Structure of cleavage furrow (arrowhead) is different from that of original cell wall (arrow).
2. Cleavage furrow (CF) surrounded by cytoplasm (arrowheads).

Scale bars : $1\mu\text{m}$.

1



2

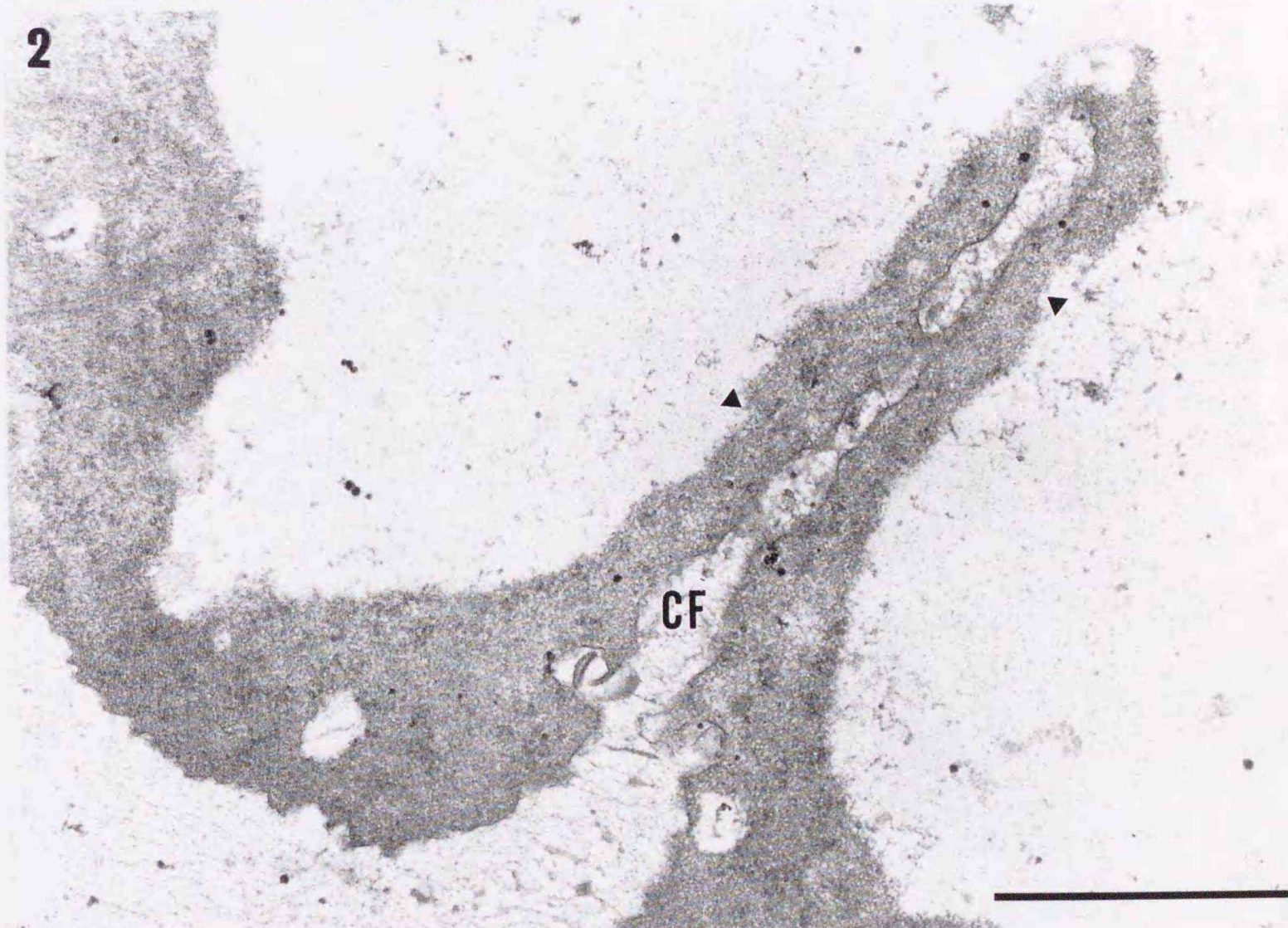


Figure 26

Section of the ... showing new ...

Scale bar: 10 km



Plate 26

Section of an inside cell 2 days after wounding, showing new cells (NC) formed along cut surface.

Scale bar : 10 μ m.

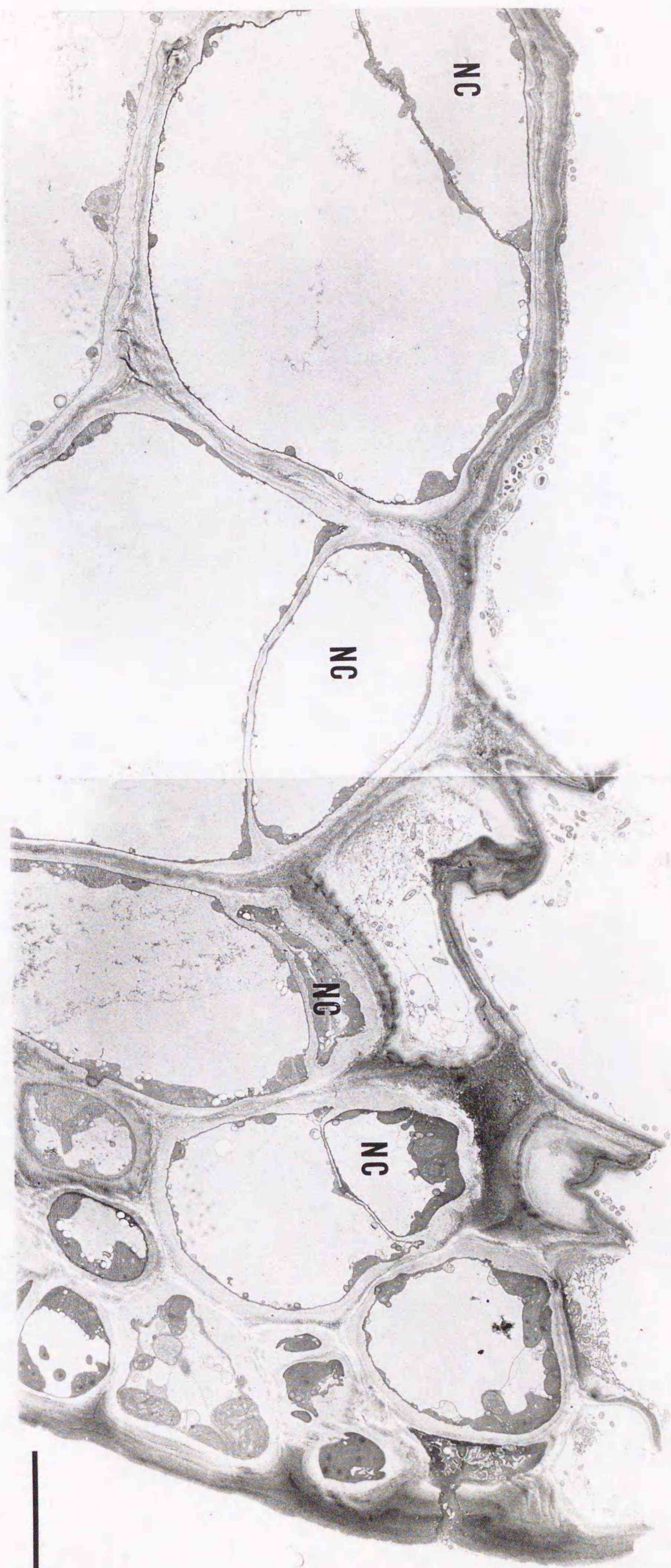


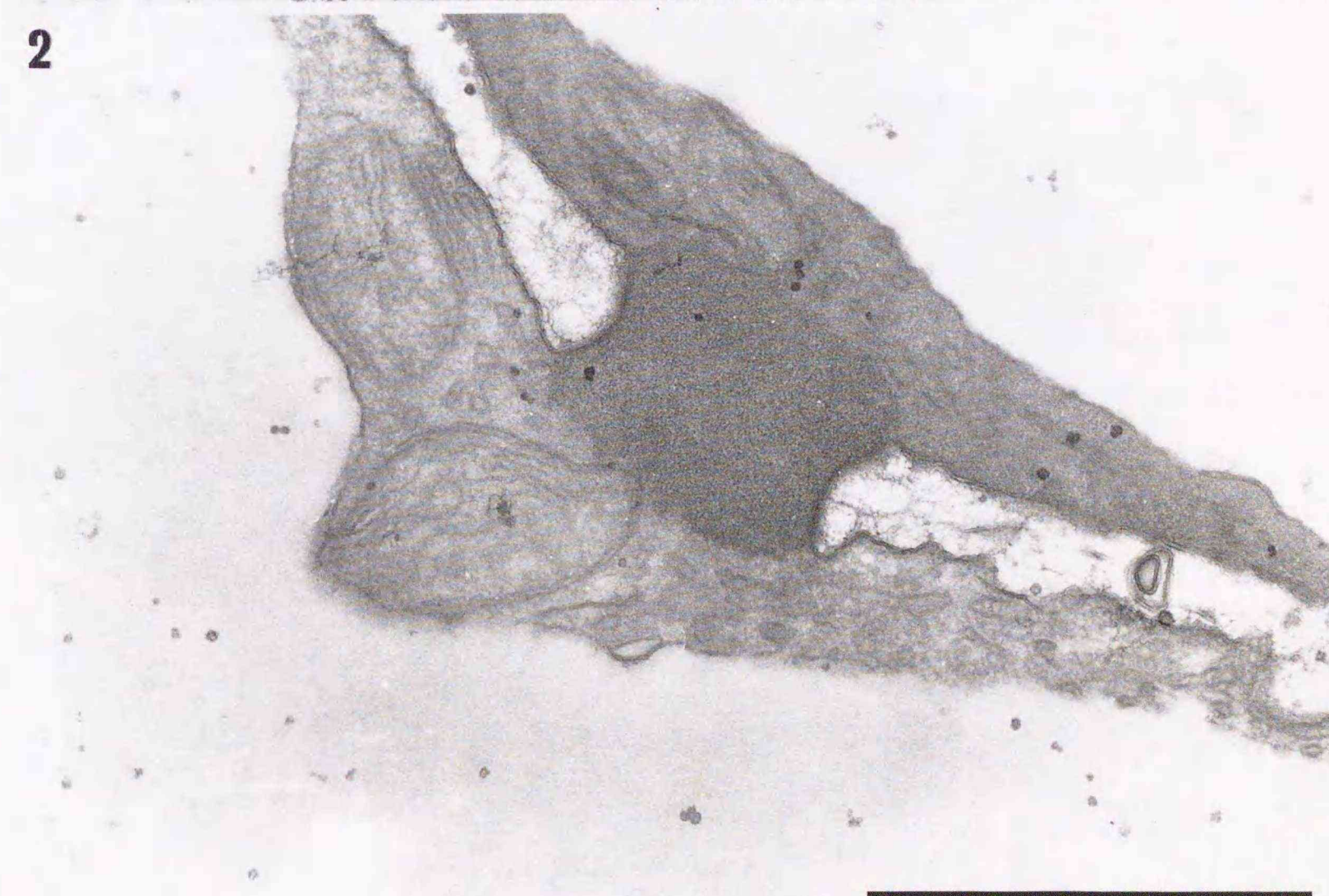
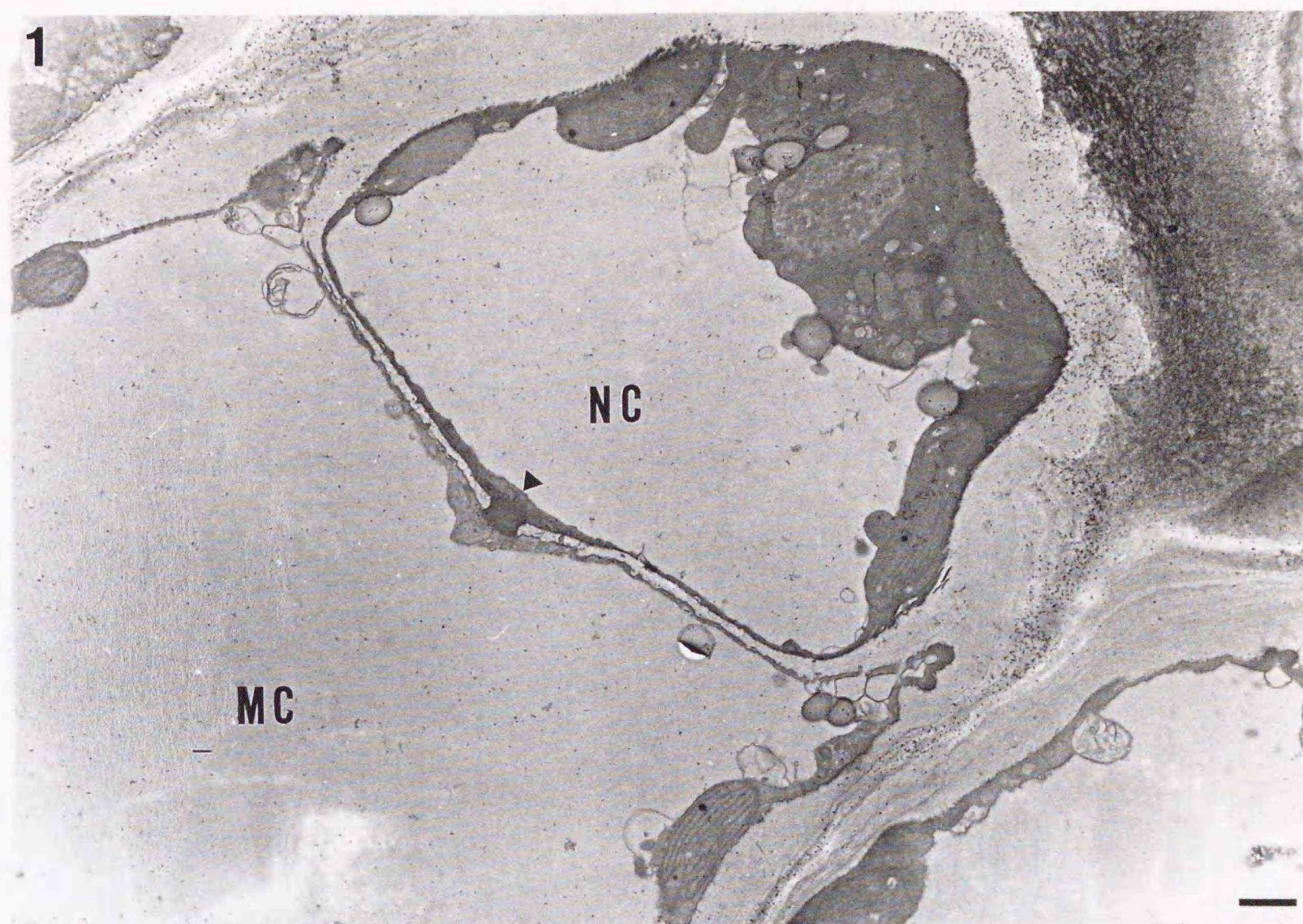


Plate 27

Close-up of new cell (NC) of Plate 26.

1. New cell connects with its mother cell (MC) by primary pit connection (arrowhead).
2. Close-up of primary pit connection of 1, showing primary pit connection without cap membrane.

Scale bars : $1\mu\text{m}$.



Close-up of head part of *Stenobothrus* showing
mouthparts and eyes (Fig. 1) illustrating the position of
clypeus (arrow) and eyes (arrowhead).

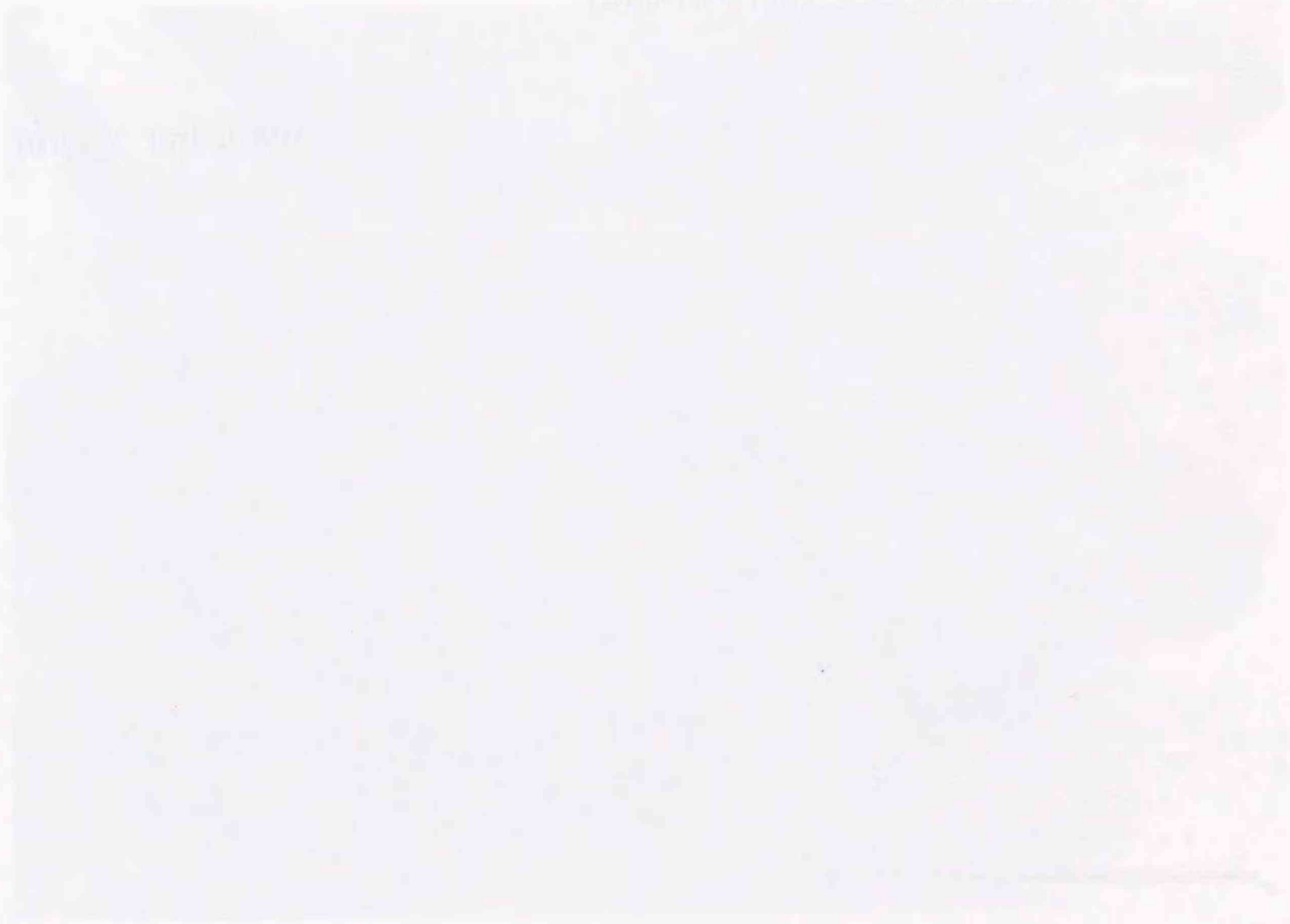


Plate 28

Close-up of basal part of cleavage furrow, showing multivesicular bodies (MB) discharging its contents to cleavage furrow (arrowhead).

Scale bar : $1\mu\text{m}$.

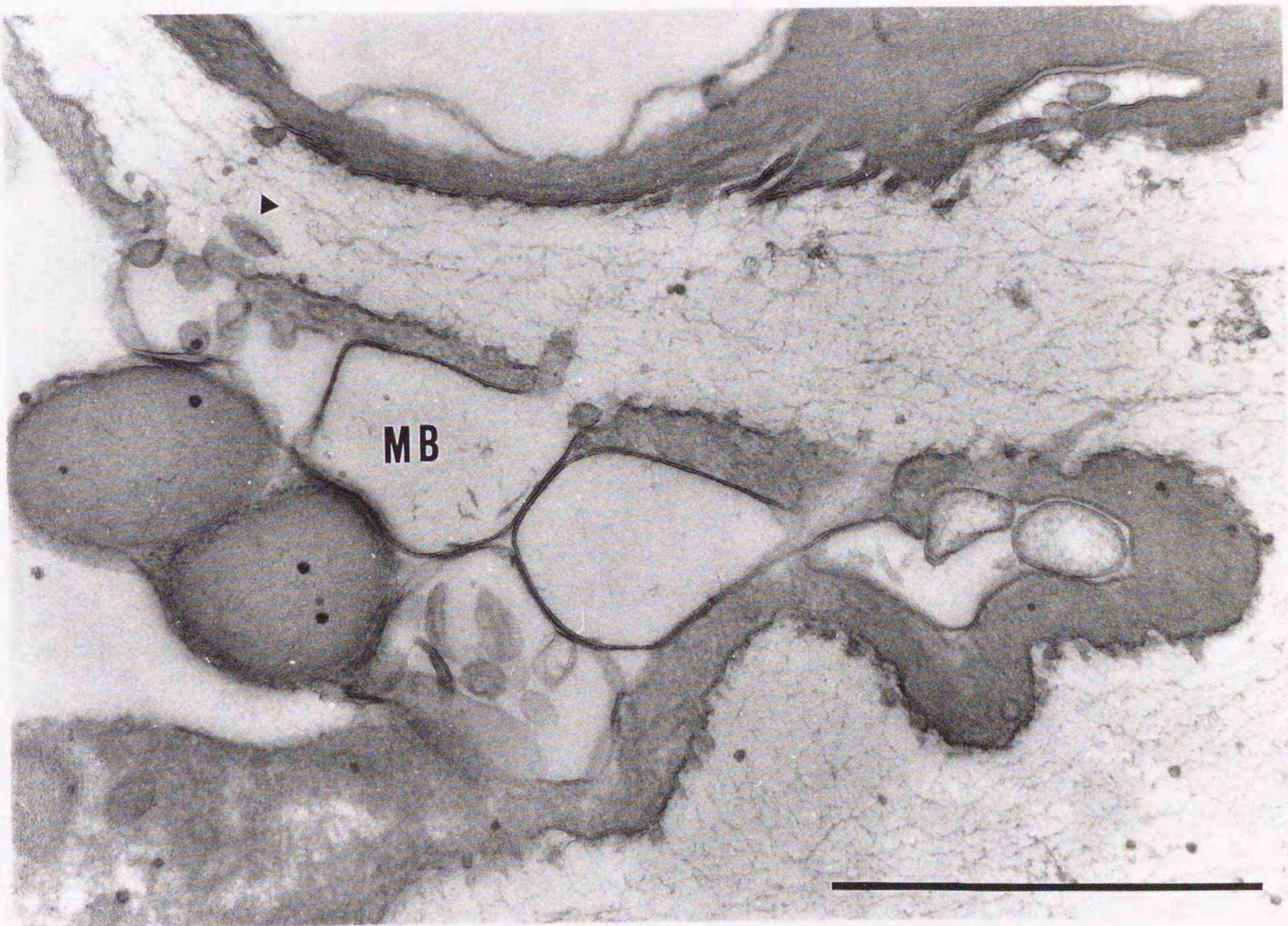


Plate 28

(Developing cleavage theory with Jordan March
(arrowhead) at its tip.

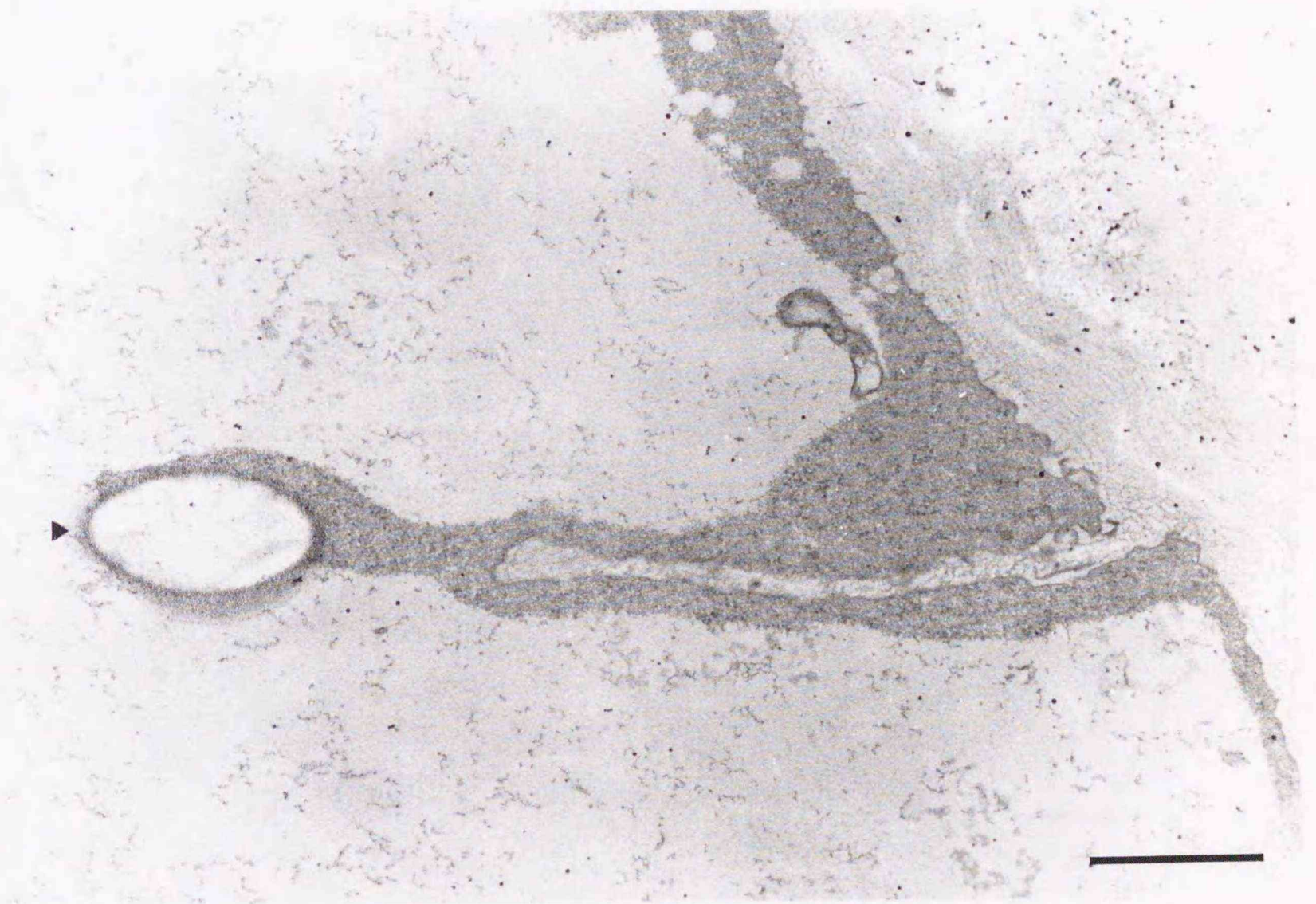
Scale bar - 1 mm



Plate 29

Developing cleavage furrow with floridean starch
(arrowhead) at its tip.

Scale bar : $1\mu\text{m}$.



Section of an *Ameloblast* (A) 1 day after wounding. New cell
(NC) divided from medullary epithelium in the central part of cell

surface

Scale bar: 1 mm



Plate 30

Section of an inside cell (IC) 3 days after wounding. New cell (NC) divided from medullary cell in the central part of cut surface.

Scale bar : $1\mu\text{m}$.



PLATE 24

Section of an Indian girl (C) 2 days after wounding. Two new
cells (NC) divided from woundings cell.

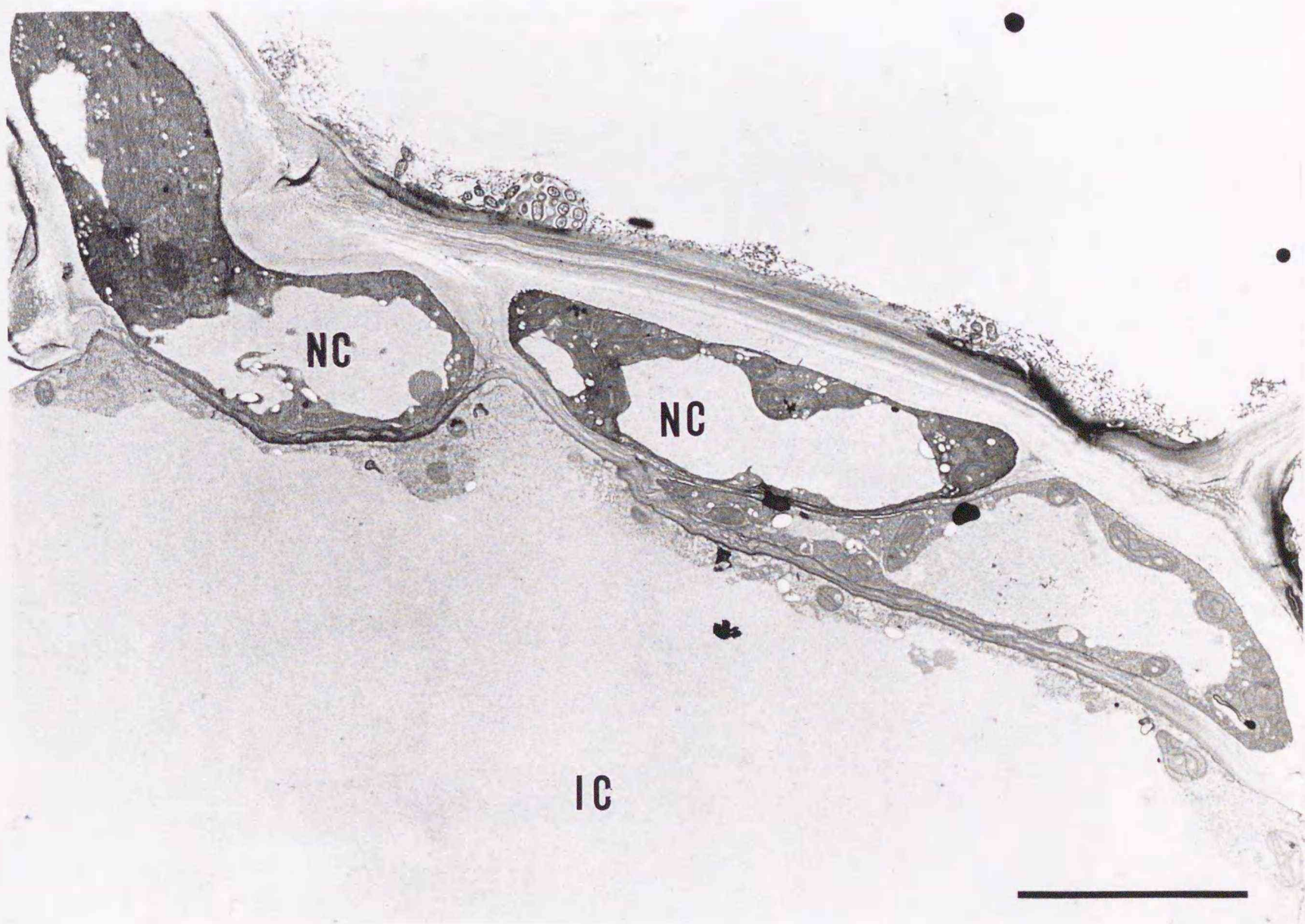
PLATE 25



Plate 31

Section of an inside cell (IC) 5 days after wounding. Two new cells (NC) divided from medullary cell.

Scale bar : $1\mu\text{m}$.



Section at 100 ft. 7 days after spawning. showing
 some of the cells with some small chloroplasts
 in the cytoplasm. The cells are a few microns in size
 and are somewhat elongated. The cell wall is thick
 and the cells are arranged in a regular pattern.
 The cells are surrounded by a thin layer of water.

Scale bar: 1 mm.

Plate 32

Section of an inside cell 7 days after wounding, showing outermost cells (OC) with some small chloroplasts (arrowhead), which have a few thylakoids, and inner cells (IC) with developed vacuole. Cell wall of cut surface is thick, and pit plug (arrow) between wounded cell and inside cell is separated from the latter by cell wall materials.

Scale bar : $1\mu\text{m}$.



Light micrograph of longitudinal section of tissue 24 days
after wounding, showing cystic-like wound tissue (WT)
covering the surface.



Plate 33

Light micrograph of longitudinal section of tissue 24 days after wounding, showing cortex-like wound tissue (WT) covering cut surface.

Scale bar : 100 μ m.

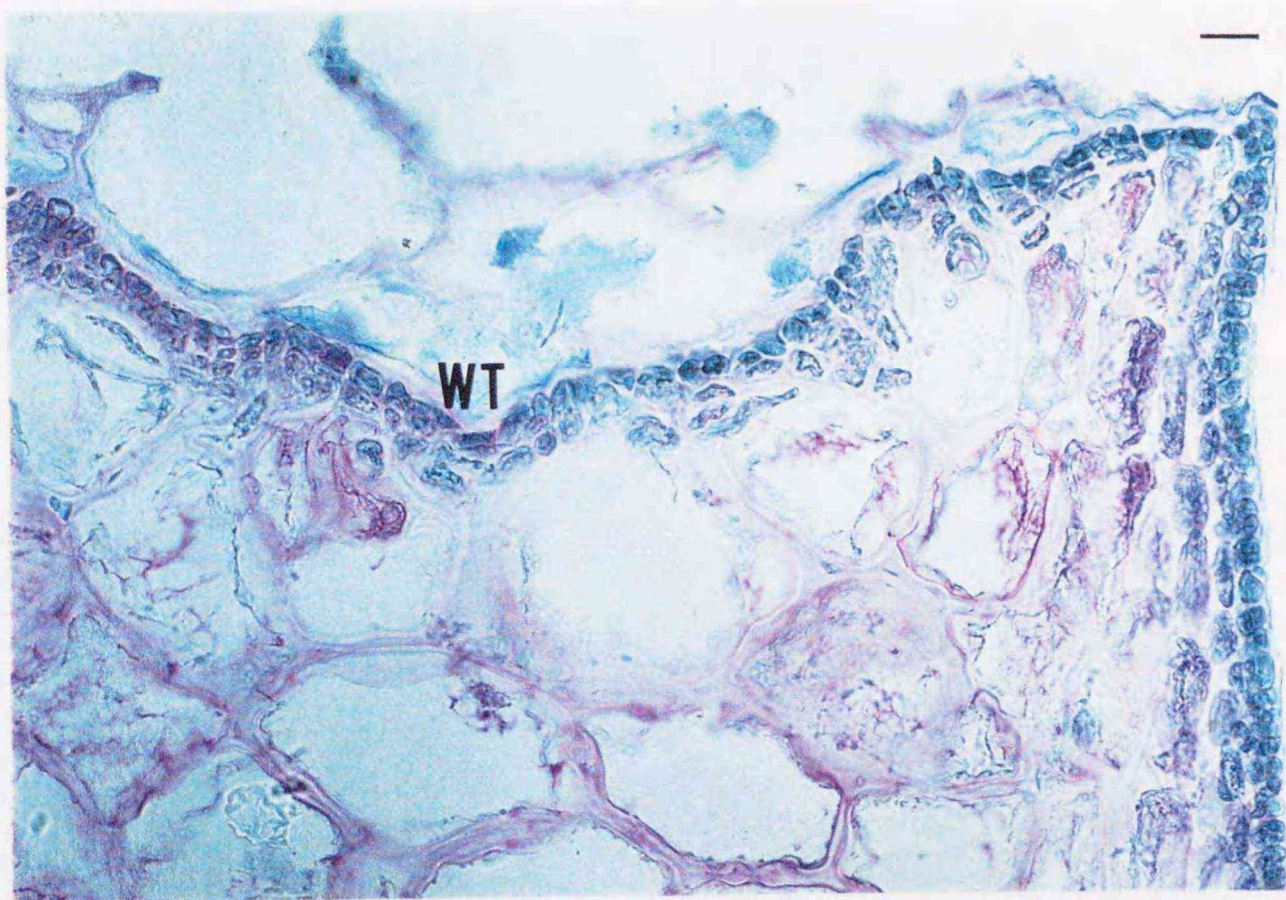


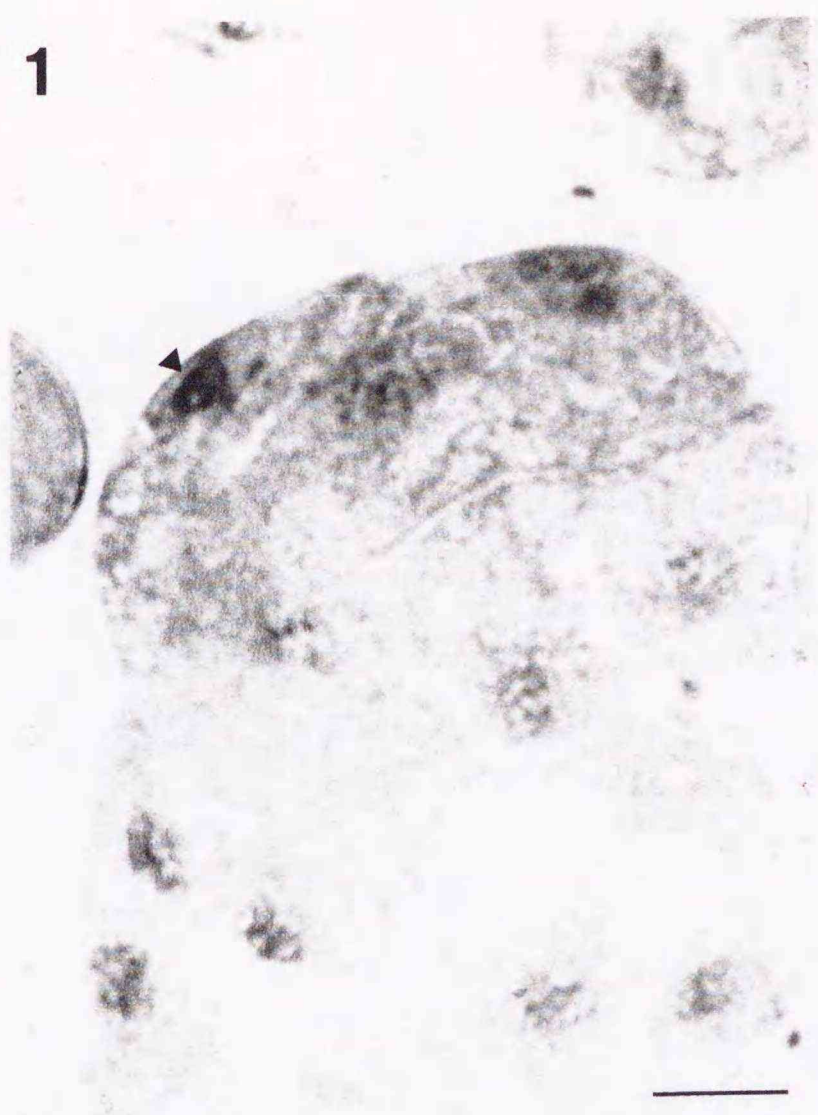
Plate 34

The nuclei of inside cells stained with aceto-iron-haematoxylin-chloral hydrate solution and squashed for Nomarski differential interference microscopic observation.

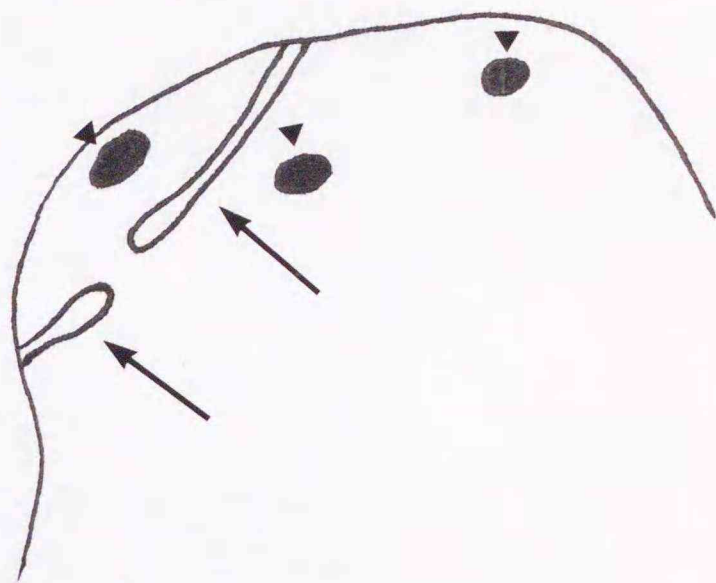
1. Inside cell producing a new cell, showing cleavage furrow formed centripetally at both sides of the cell forming a new cell with one nucleus (arrowhead).
2. Diagram of 1. Nuclei (arrowheads); cleavage furrows (arrows).
3. Inside cell producing a new cell with one nucleus, showing completed septum.

Scale bars : $10\mu\text{m}$.

1



2



3

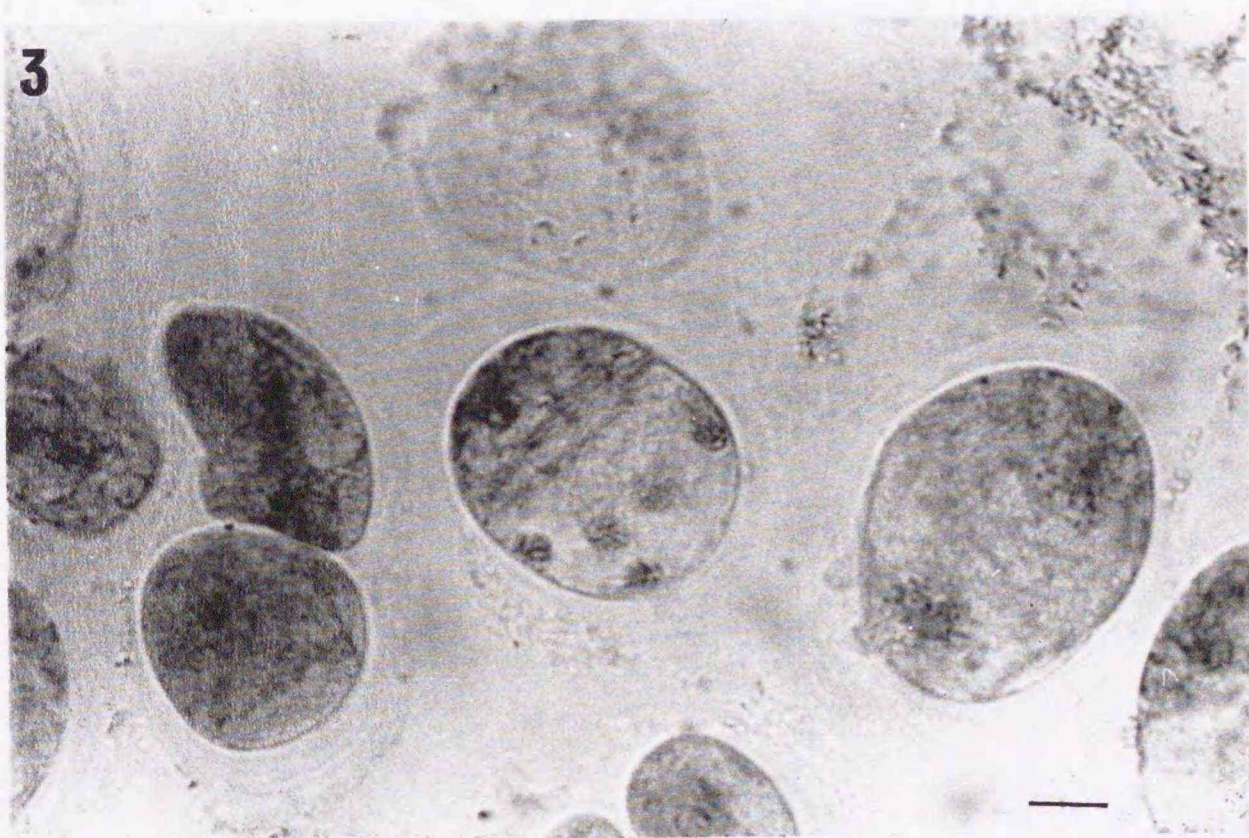




Plate 35

Tip of thallus.

1. Tip of thallus with apical cells.
2. Close-up of apical cells dividing into the two.

Scale bars : $10\mu\text{m}$.

1



2



