

圧縮あて材仮道管の2次壁の形成

——らせん状のうねと裂目について——

The Secondary Wall Formation of Compression Wood Tracheids

—On the Helical Ridges and Cavities—

藤田 稔・佐伯 浩・原田 浩

Minoru FUJITA, Hiroshi SAIKI, Hiroshi HARADA

目 次

要 旨.....	192	4 考 察.....	196
1 緒 言.....	192	引用文献.....	198
2 材料と方法.....	193	Résumé	198
3 観察結果.....	194		

要 旨

圧縮あて材仮道管における特異な構造として知られている、いわゆる“らせん状裂目”の形成過程をスギ苗木を材料として各種の光学顕微鏡と透過型および走査型電子顕微鏡で観察した。観察に際しては、試料の固定法やらせん状裂目の特異な構造にとくに留意した。そしてこのらせん状裂目は S_2 層に生じた裂溝ではなく、 S_2 層形成初期からの細胞壁の不均一な肥厚に起因することを確かめた。観察結果の概略は以下のとおりである。

(1) S_2 層形成のごく初期に、形成中の細胞壁内表面にすでに多数の、巾の小さいらせん状のうね (ridge) と溝 (cavity) が観察された。またそのうねの先はとがっていた。

(2) S_2 層の肥厚が進むにつれて、このうねは櫛の歯状に高さがまし、それにはさまれた部分にらせん状裂目が形成されていた。うねの生長はその後しだいに不均一になり、生長を続けるうねと、それらに押えられ生長を止めてしまううねとが見られる。生長を止めたうねの先端の所ではらせん状裂目があたかも分岐しているように見える。

(3) S_2 層形成の後期には、とくに巨大に生長するうねがあらわれ近くのうねをおおって発達する。

(4) 細胞壁形成のすべての過程を通じて、原形質膜は常に存在し、 S_2 層の不均一な肥厚の際には形成中の細胞壁内表面にそって著しい凹凸を示した。

1 緒 言

針葉樹の圧縮あて材仮道管の細胞壁が正常な仮道管と比べて種々の特異な構造をもつことはこれまでの数多くの研究により明らかとなっている。しかしながら、これらの特異な構造が形成さ

れる過程や、その構造が傾斜した樹幹や枝の生理的な挙動にどのように関与しているのかという問題には不明な点が多い。ここでとりあげた S_2 層に生じるいわゆる“らせん状裂目”と呼ばれる構造の形成過程についての見解もいまだに重大な対立点を残している。

Wardrop と Davies¹⁾ は *Actinostrobus pyramidalis* と *Pinus radiata* を材料として、らせん状裂目は、乾燥によって生じた細胞壁の亀裂ではないが、 S_2 層形成過程ですでに堆積していた細胞壁の lamella が仮道管の接線方向に、それも microfibril と直角方向に収縮して生じた裂溝であろうと考えた。この見解に対して、Casperson と ZinBer²⁾ は *Pinus sylvestris* を用いて、 S_2 層の肥厚はその形成初期からすでに不均一に進行し、その結果として肥厚の阻害された部分が生じることを観察した。そしてこの部分があとでらせん状の裂目として観察されるのだと推定した。Côté³⁾ らは *Abies balsamea* でさらに観察を進めて、らせん状裂目は Wardrop と Davies が主張したように S_2 層の大部分が形成されたのちに生じた裂溝が主要な成因であり、そののちに残りの lamella が割裂によって生じたらせん状のうねの上に堆積するとのべ、Casperson と ZinBer の見解をしりぞけた。この Côté らの見解の主要な根拠は、 S_2 層の lamella がらせん状裂目をこえてなおかつ連続している根拠が観察されたことを挙げている。これは本来は連続していた lamella がその収縮により引き裂かれたことを意味する。

しかしながら、以上の研究はそれぞれ圧縮あて材仮道管の細胞壁肥厚の過程を一面的に、あるいはその一場面のみをとらえて結論しているのでさらに詳細に検討しなおす必要がある。その 1 例をあげれば、仮道管軸に対して約 45° に傾斜したらせん状裂目を、彼らが用いた通常の木口、柾目切片だけで観察しても、切片中でのらせん状裂目の 3 次元的配置からその詳細な構造が不明瞭となることや、試料の固定法にも問題点があると考えられるからである。

筆者らは上記の問題点を考慮して、(1) 試料の固定法の影響、(2) らせん状裂目の観察にもっとも適した切片の切削角度、(3) あて材仮道管の細胞壁形成の全過程を確実に把握するための観察方法、などに特に留意して一連の研究を進めた。なぜなら、このらせん状裂目は圧縮あて材の生理的な挙動に重要な意味をもっていると考えられ、さらに、筆者らが現在進めている細胞壁形成の観点からもこのような特異な壁形成の過程は非常に興味を引くことであり、是非とも明らかにしなければならない対象と考えられるからである。

この内容は第22回日本木材学会大会で発表したものの一部である。またこの研究の実施にあたり、試料を提供していただいた京都大学演習林の吉川勝好氏と、走査型電子顕微鏡写真を撮影していただいた古川郁夫氏をはじめ色々と御協力、御助言下さった当木材構造学研究室各位に深く謝意を表するものである。

2 材 料 と 方 法

2.1 材 料

5 年生のスギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) 苗木数本を1971年6月2日に幹の中央部にひもをかけて曲げ、傾斜した幹の下側に圧縮あて材を形成させた。

2.2 固定、包埋

上記の苗木の 1 本を同年6月18日に幹の根元から切断して切り口をグルタルアルデヒド固定液 (1.5%, リン酸緩衝液) に入れて3時間放置した。この処理で約 30 ml の固定液が葉の蒸散作用により苗木に吸収された。この処理は分化中のきわめて軟弱な組織から微小な試片を切り出す

時に生じる損傷を防止するために、樹幹内でその組織を前固定することを目的としている。この処理ののち、幹の下側のあて材形成中の部位から試片を清浄なカミソリの刃で切り出しグルタルアルデヒド固定液（3%リン酸緩衝液）で6時間再固定した。なお、同様に傾斜させた幹から別の試片を切りだして過マンガン酸カリウム固定液（2%リン酸緩衝液）で2時間固定した。グルタルアルデヒド固定した試料はさらに四酸化オスミウム固定液（1%リン酸緩衝液）で2時間後固定した。これらの試片はすべて Luft 法によりエポキシ樹脂に包埋した。

2.3 切片の作製

包埋した試料から 2μ , 1μ , 0.1μ の厚さの切片をガラスナイフおよびダイヤモンドナイフを装着した Porter Blum MT-1 型 ultramicrotome によって連続的に多数作製した。切片としては通常の木口および柁目切片と、仮道管軸に対して約 45° 傾斜させた角度の切片とを作製した (Fig. 1)。この傾斜切片はらせん状のうねと裂目の正確な横断面と縦断面を得るために作製した。

2.4 切片の観察方法

2μ の薄切片はカナダバルサムで封入し、位相差および偏光顕微鏡で観察した。位相差顕微鏡は低倍で切片の全体の像を撮影して、分化中の個々の仮道管の位置の確認に用い (Fig. 6(B)), 偏光顕微鏡は S_2 層の fibril 傾角の測定, S_2 層形成の開始時期ならびにらせん状裂目の形成の開始期の確認に用いた (Fig. 2, 6(A))。 1μ の薄切片の一部はエポキシ-ヨウ素⁵⁾染色して通常の光学顕微鏡で観察し、仮道管の分化の程度、固定状況を調べ、残りは Mayor⁶⁾らの方法により脱包埋後、carbon-Au coating して走査型電子顕微鏡 (JSM-U3) で観察し、らせん状裂目の形成過程を細胞内腔側と断面の両方から立体的に検討した。 0.1μ の超薄切片の一部は脱包埋して Pt-Pd shadowing し細胞壁の肥厚の過程を、他は酢酸ウラニル染色して細胞壁と細胞質を、ともに透過型電子顕微鏡 (JEM-7) で観察した。

3 観 察 結 果

3.1 固定法の影響

過マンガン酸カリウム固定した試料では、肥厚した2次壁はよく染色されていた。しかし細胞壁の lamella は膨潤している場合があり、 S_2 層形成初期にはそれが特に顕著であった (Fig. 4)。また細胞器管の多くも明らかに損傷を受けていたので、この固定法はこの種の実験には不適當であることがわかった。これらの artefacts は過マンガン酸カリウム固定液の強い酸化作用によって引き起されたと考えられる。一方グルタルアルデヒド-四酸化オスミウム固定した試料からとった酢酸ウラニル染色の切片では細胞器管の構造 (Fig. 7.(B). 8, 10, 12) が、脱包埋後 shadowing した切片では細胞壁の微細な構造 (Fig. 7(A), 11) が非常によく保存されていた。このため以下の観察はすべてこの固定法を用いた試料で行なった。

3.2 切片の切削角度の検討

まず 2μ の柁目切片を偏光顕微鏡で観察して、今回用いたスギの仮道管の S_2 層の fibril 傾角を測定し、それが 45° であることを確認した。同時にらせん状裂目と考えられる 45° に傾斜した暗い条線が S_2 層開始直後の仮道管で現れることを認めた (Fig. 2)。またこの 0.1μ の超薄切片の電子顕微鏡観察でも偏光顕微鏡の場合と同様に S_2 層形成のごく初期の仮道管にすでに 45° に傾斜した微細な裂目が観察された (Fig. 3)。しかしながら、柁目切片の電子顕微鏡観察では切片

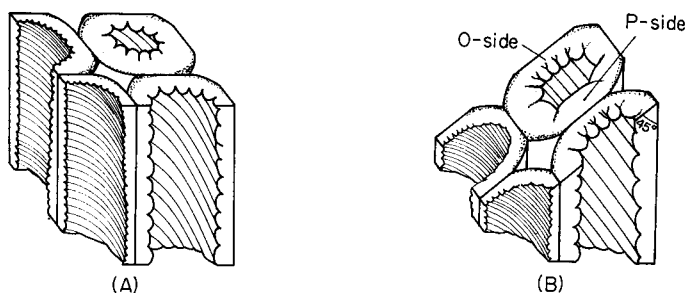


Fig. 1. Diagrammatic representations of sectioning of the differentiating compression wood tracheids.

(A) A conventional cross or longitudinal section of tracheids.

(B) An inclined section at an angle of 45° to the fiber axis.

Helical ridges and cavities are sliced orthogonally in one side of tracheids and parallelly in another side of them (B). O-side: orthogonal side. P-side: parallel side.

中の構造の配置が複雑であるのでらせん状裂目形成の全過程を確実に把握することはできなかった。

つぎに木口切片を観察した。この角度の切片では分化の過程における仮道管の横断面の形状変化や、壁層の厚さの変化は容易に知ることができたが、らせん状裂目やその中へ入りこんでいる原形質膜の構造は正確に観察されなかった。この不明瞭さは Fig. 1(A) に示されるように、切片中でらせん状裂目が 45° に傾斜して存在していることに原因があると考えられる。この問題を解決するためには、らせん状裂目を直角に切断した切片を観察しなければならない。そこで Fig. 1(B) に示すように仮道管軸に対して 45° の角度を持つ傾斜切片を作製した。この傾斜切片ではその1例を Fig. 5 に示すように仮道管の断面の一部にらせん状のうねと裂目の正確な横断面が、その反対側にはうねの縦断面が現れた。前者の部分ではらせん状の裂目とうねの微細な構造が電子顕微鏡で正確に観察することができ、後者の部分は偏光顕微鏡下で光るので S_2 層の堆積の開始期を適確に知ることができた (Fig. 6(A))。そこでこの傾斜切片によりらせん状裂目の形成の過程をさらに詳しく追求した。

3.3 S_2 層肥厚の過程とらせん状裂目の形成

45° 傾斜切片のうち 2μ の厚さの切片を位相差顕微鏡で観察し、切片中の10数列の radial file に B~L の記号を付し、その切片を偏光顕微鏡のクロスニコル下で再び検鏡して、それぞれの radial file の中で仮道管の一方の半径壁がそれと反対側よりも明らかに強く光る仮道管を探し出した。この光り方の相違は Fig. 1(B) と Fig. 5 に示したように S_2 層の堆積によって生じるので、形成層側から見てこの光り方の強弱が認められない最後の仮道管を B~L の radial file の中で探しだし、これらを基準点 (0) として S_2 層の肥厚が進行する木部側へ 1~8、形成層側へ -1~-5 の番号を与えた。この番号と radial file の記号によって座標を作り、切片中の仮道管を確実に識別できるようにした (Fig. 6(B))。そしてこれと連続した 0.1μ の超薄切片で同じ場所を電子顕微鏡で観察した。その結果 S_2 層の肥厚はそれが開始してから5列目まででほとんど完了することがわかった。そこでこれらを1列目から逐次観察してその肥厚の過程、とくにらせん状裂目のできかたを細胞壁と細胞質の両面から詳細に追究した。

1列目の、 S_2 層形成開始直後の仮道管の内表面は平滑で (Fig. 7(A))、それに接した原形質膜も部分的な invagination をのぞいてそれと同様であった (Fig. 7(B))。しかしながら2列目

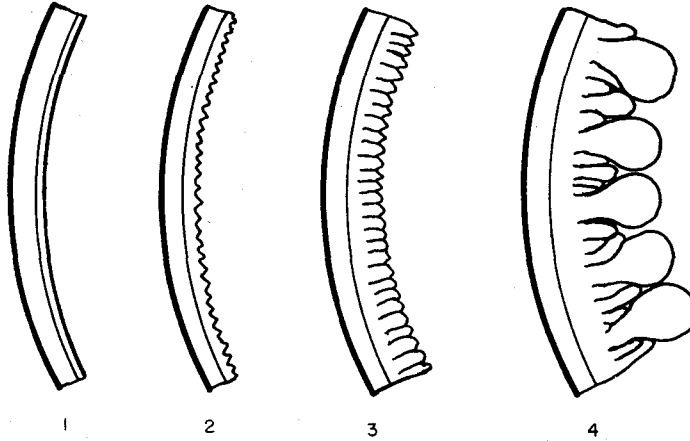


Fig. 14. A diagrammatic representation of the development process of helical ridges and cavities.

の仮道管では S_2 層の肥厚はまだわずかであるのに、その内表面とそれに密着した原形質膜が小さな zigzag の凹凸を示した (Fig. 8)。この様子は走査型電子顕微鏡でさらに明確に示され (Fig. 9)、突出部の先はとがっているのが明らかとなった。この多数の小さな突出部と溝が S_2 層のらせん状のうねと裂目の起源であると判断される。さらに3, 4列目の仮道管では S_2 層の肥厚が急速に進み、前述した突出部は櫛の歯状に内腔側へ生長していた。その内表面とそれに接した原形質膜はやはり前と同様に凹凸を示した。その肥厚したうねの間には深い溝が残されていた (Fig. 10)。うねの生長はその後しだいに不均一になり、肥厚の進んだうねによって押しつまれているうねも数多く見られた。そこでは内腔側から見て溝はあたかも分岐しているかに見えた。 S_2 層肥厚の最終段階である5, 6列目の仮道管になるとこれまでとは少し異なり、それまでの巾のせまい多数のらせん状のうねの中でごく少数のものが急速に肥厚、膨大し、まわりの小さなうねの上におおいかぶさって巨大ならせん状のうねとなっていた (Fig. 11)。この段階では、原形質膜でかこまれた細胞質はこの巨大なうねの隙間に残留し、細胞内腔側から突出した形態を示していた (Fig. 12)。そして分化を終えた仮道管ではらせん状のうねの表面には wart が形成されていた (Fig. 13)。

一方このような詳細な観察の中で Côté³⁾ らが指摘した S_2 層の lamella の割裂のあきらかな証拠は得られなかった。もしこの割裂が生じているとすれば、それは S_2 層の形成のきわめて初期の段階で、今回の観察でも捕えられなかったほどの微細な割裂以外には考えられない。最後に、種々の観察結果から得た S_2 層形成過程におけるらせん状のうねと裂目の発達の様子を Fig. 14 の模式図に示す。

4 考 察

さきにのべた観察結果は圧縮あて材の仮道管の S_2 層に生じるらせん状の裂目が、Wardrop¹⁾ と Davies²⁾ や Côté³⁾ らが主張したような S_2 層の lamella の割裂によるものではなく、 S_2 層形成の初期からの細胞壁成分の不均一な堆積によって生じることを示している。この結果は Caspersen²⁾ と Zinßer³⁾ の主張を支持する。

Wardrop¹⁾ と Davies²⁾ や Côté³⁾ らがこのらせん状裂目を収縮による裂溝と判断した主要な根拠

は、木口あるいは柾目面で切ったらせん状のうねの断面に現れる lamella 構造が、うねの中で同心円的な構造を示す道管のらせん状肥厚の場合とは異なり、むしろ通常の S_2 層の lamella のように仮道管の接線方向に配向していること、そして、らせん状のうねの lamella がその裂目をこえて連らなっているように見えることである。これらの像は裂目が割れによって生じたような印象を強く与える。しかしながらこれらの像の解釈には注意が必要である。なぜなら木口と柾目の切片では、うねの正確な横断面ではなく、 45° の斜めにそいだ断面を観察しているので、本来はうねの中に同心円的な構造があってもそれが傾斜の影響で細胞の放射線方向の lamella 構造が観察されなくなり、接線方向の lamella 構造だけが強調されるからである。またうねの間の lamella のつながりについては、Fig. 1 に示した傾斜の影響が重大な誤解を招く。単純な幾何学的計算から、 0.1μ 厚の切片中で切片面に対して 45° の傾きを持つ構造物は、巾が 0.07μ 以下のものについてはその正確な観察を不可能にする。lamella 構造はもちろんのことであるが、筆者らが観察したらせん状裂目の多くも 0.07μ 以下であった。さらに、このような議論は細胞壁や細胞質の微細構造がよく保存されていることが前提条件になる。筆者らが観察したところ過マンガン酸カリウム固定試料では細胞壁の膨潤によってその lamella が一層きわだって見え、一方らせん状の裂目の構造はこの膨潤によって不明瞭になっていた。この過マンガン酸カリウム固定法は従来の研究に多く用いられてきたが、その固定の影響を慎重に考慮しなければならないであろう。一方、Casperson と Zinßer も木口切片で観察を行なっているが、彼らは S_2 層の肥厚過程の初期の段階でらせん状の裂目がいちやく生じているのを見つけたので上記のような問題点に遭遇せずにすんだものと思われる。

細胞内容物、とくに原形質膜の挙動についても Wardrop と Davies¹⁾ や Côté³⁾ らは注目し、 S_2 層肥厚のある時期に原形質膜が消失する現象を観察しているが、筆者らの観察では原形質膜は常に存在していた。また原形質膜は形成途上の不規則な細胞壁の内表面に密着しており、裂目の奥深くまで入りこんでいた。もしらせん状裂目が割れによって生じた裂溝であるならば、原形質膜がこのようにその奥深くまで入りこむことはできないであろうから、この S_2 層の不均一な肥厚というものは原形質膜を始めとする細胞質によって引き起こされるのであろう。しかしながらその形成の機構については今後さらに研究をすすめるべきではない。細胞壁形成に関与していると考えられるマイクロチュービュール⁷⁾ は引張あて材の G 層形成中の細胞と同様にこの圧縮あて材仮道管でも豊富に存在していた。しかしながらその詳細についてはゴルジ体や ER の現れ方とともに今回は省略する。

最後にこの圧縮あて材仮道管の特異な構造について“らせん状裂目”という用語が用いられているが、これはその形成過程を考慮するとき、それが割れによって生じた印象を与えるので適切な表現ではないと思われる。Wardrop と Davies¹⁾ や Casperson と Zinßer²⁾, Côté³⁾ らは check という表現の代りに cavity という用語を用いており、日本語では“らせん条溝”といった表現がより適しているのではないだろうか。

引用文献

- 1) WARDROP, A. B. and DAVIES, G. W.: The nature of reaction wood. VIII. The structure and differentiation of compression wood. *Aust. J. Bot.*, **12**, 24-38 (1964)
- 2) CASPERSON, G. and ZINBER, A.: Über die Bildung der Zellwand bei Reaktionsholz. III. Zur Spaltenbildung im Druckholz von *Pinus sylvestris* L.. *Holz als Roh- u. Werkstoff*, **23**, 49-55, (1965)
- 3) CÔTÉ, W. A. Jr., KUTSCHA, N. P. and TIMELL, T. E.: Studies on compression wood. VIII. Formation of cavities in compression wood tracheids of *Abies balsamea* (L.) MILL. *Holzforschung*, **22**, 138-144, (1968)
- 4) LUFT, J. H.: Improvements in epoxy embedding method. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, 499 (1961)
- 5) 藤田 稔, 佐伯 浩, 原田 浩: ヨウ素染色によるエポキシ包埋切片の光学顕微鏡的観察法, 京大演報, **43**, 294-302 (1972)
- 6) MAYOR, H. D., HAPTON, J. C. and ROSARIO, B.: A simple method for removing the resin from epoxy-embedded tissue. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 579-582, (1961)
- 7) FUJITA, M., SAIKI, H. and HARADA, H.: Electron microscopy of microtubules and cellulose microfibrils in secondary wall formation of poplar tension wood fibers. *Mokuzai gakkaiishi*. in print.

Résumé

The differentiation of compression wood tracheids, particularly the formation of their helical ridges and cavities, in *Cryptomeria japonica* was studied in detail by polarizing microscopy, scanning and transmission electron microscopy in close examination of fixation artefacts and of the misinterpretation resulting from the inclination of the ridges and cavities in the sections. The differentiating xylem was fixed by potassium permanganate or glutaraldehyde-osmium tetroxide, and embedded in epoxy resin. The inclined sections at an angle of 45 degrees to the fiber axis were used in order to observe the accurate cross view of the helical cavities. Results obtained are as follows: (1) Potassium permanganate fixation caused noticeable swelling of the cell wall lamellae (Fig. 4), whereas glutaraldehyde-osmium tetroxide fixation preserved the fine structure of both the wall and cytoplasm. (2) Although the fine structure of the ridges and cavities was obscured by their own inclination in the case of observations of the conventional cross- and radial-sections, this problem was solved by using so-called "inclined sections". (3) The cavities were clearly found at the very early stage of S₂ layer deposition as the small interspaces among the small and edged helical ridges (Fig. 8, 9). This was also shown by observation of the differentiating radial file of the radial-longitudinal section using a polarizing microscope (Fig. 2). (4) The original ridges were developed toward inside like the teeth of a comb, leaving the cavities between them (Fig. 10). (5) In the final stage of S₂ layer deposition, some of the ridges were extremely developed and the rest of them were suppressed by the developed ones (Fig. 11, 12). (6) Evidence of bursting open of fibrillar lamellae due to the tangential contraction was not observed at all during S₂ layer deposition. (7) The plasma membrane existed in all stages of cell wall development, and they covered the ridge surfaces and penetrated deeply into the cavities (Fig. 12). (8) It is assumed from these observations that cavities do not originate from a tangential contraction of cell wall lamellae but are caused by an irregular deposition of the cell wall substance.

- Fig. 2. A radial section of differentiating tracheids observed under the crossed nicols of polarizing microscope. The tracheids in radial file from A to D are undergoing S_2 layer deposition. Note the tracheid B which has already possessed the helical ridges and cavities at an early stage of S_2 layer deposition.
- Fig. 3. A tangential view of the similar tracheid to B of Fig. 2. Small helical cavities are originated at an early stage of the S_2 layer deposition.
- Fig. 4. Swelled and convoluted cell wall lamellae caused by potassium permanganate fixation. Cytoplasmic organelles are also damaged.
- Fig. 5. An inclined section cut at an angle of 45° to the fiber axis. Helical ridges and cavities are sliced orthogonally in one side (O-side), and parallelly in another side (P-side). Shadowed section after removal of embedding resin (glutaraldehyde-osmium tetroxide fixed).
- Fig. 6. An inclined section of 2μ -thickness observed by polarizing microscope (A) and phase contrast microscope (B). A white line in photo (A) was obtained by tracing the last tracheids in which the difference of birefringence was not recognized between the O-side and P-side. The tracheids (1-8) in xylem side from the white line are depositing S_2 layer, whereas the tracheids (-5 - -1) in the cambium side are depositing P and S_1 layer (B). Individual tracheid (such as K-5) in this section is identified by co-ordinate of radial files from B to L and of tracheid numbers from -5 to 8 (B).
- Fig. 7. The orthogonal side of D-1 tracheid which started S_2 layer deposition. Shadowed after removal of embedding resin (A) and stained section (B). (glutaraldehyde-osmium tetroxide fixed). The inner surface of S_2 layer is smooth (see arrow) (A). The plasma membrane (Pm) is contacted with the inner surface of the S_2 layer (B). M: mitochondria, P; plastid, N: nucleus.
- Fig. 8. The orthogonal side of C-2 tracheid at an early stage of S_2 layer deposition. The inner surface of S_2 layer and the plasma membrane (Pm) showing a zigzag pattern. Stained section (glutaraldehyde-osmium tetroxide fixed). MT: microtubule, P: plastid, V: vacuole.
- Fig. 9. A scanning electron micrograph of the inclined section of 1μ thickness. The edged ridges are already originated in this early stage of S_2 layer deposition (see arrow).
- Fig. 10. The orthogonal side of K-3 tracheid in the inclined section. Most ridges are developing like teeth of a comb and deep cavities are formed between them. The branched cavities are also observed at the top of suppressed ridges (see arrows). Stained section (glutaraldehyde-osmium tetroxide fixed). Pm: plasma membrane, C: cytoplasm, V: vacuole.
- Fig. 11. Cross sections of the helical ridges in the final stage of S_2 layer deposition observed in the orthogonal side of an inclined section. Some of ridges are extremely developing. Shadowed section after removal of embedding resin (glutaraldehyde-osmium tetroxide fixed).
- Fig. 12. An orthogonal side of a tracheid in the similar stage to Fig. 10. Plasma membrane (Pm) covers the inner surface of the wall and deeply penetrates into the cavities (see arrows). C: cytoplasm, V: vacuole.
- Fig. 13. A scanning electron micrograph of a mature tracheid in an inclined section of 1μ thickness. The huge ridges and the small suppressed ridges are observed in the sectional view and warts are deposited on the surface of them.

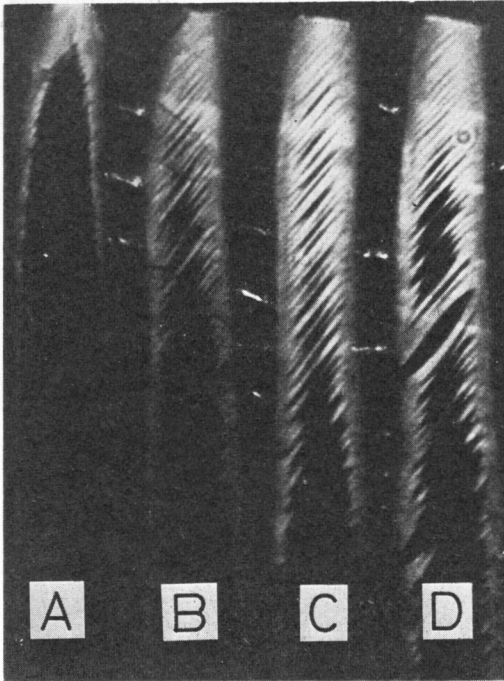


Fig. 2.

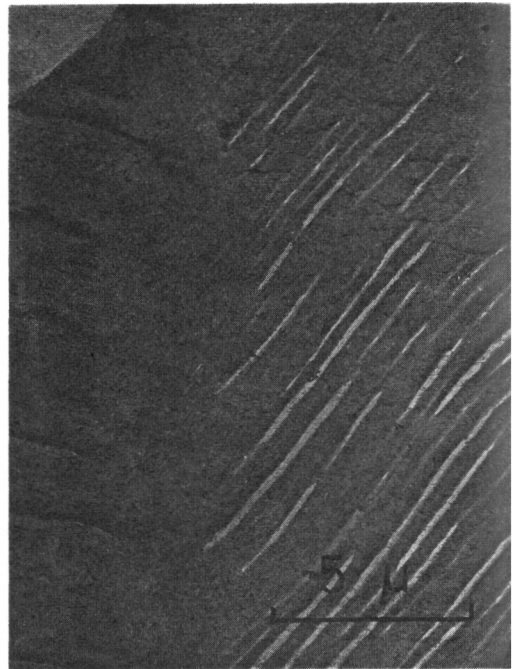


Fig. 3.



Fig. 4.

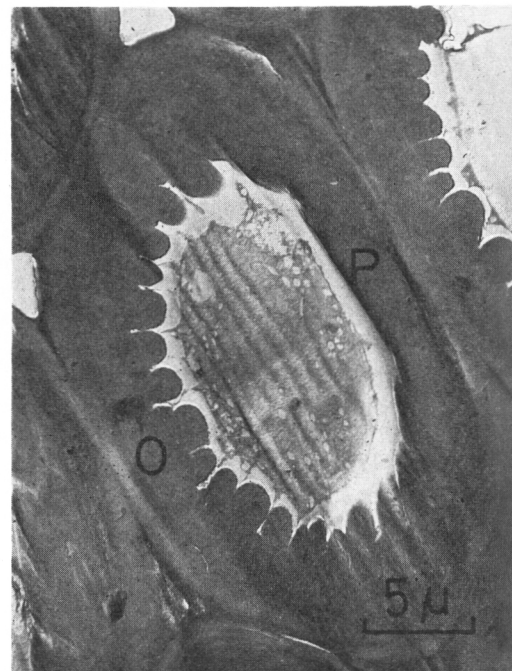


Fig. 5.

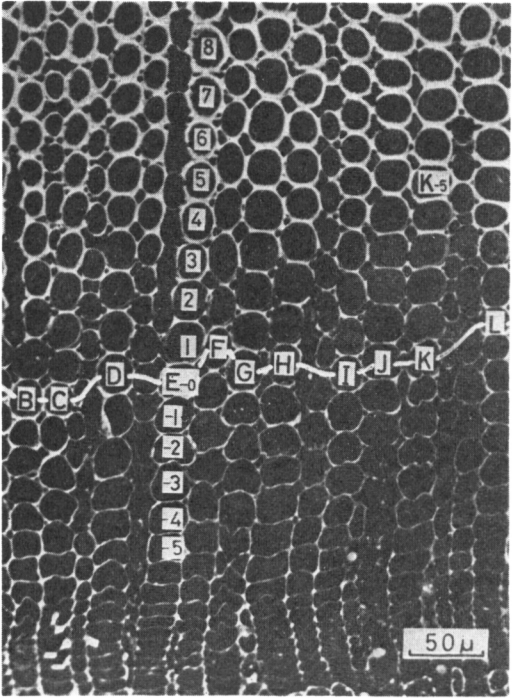
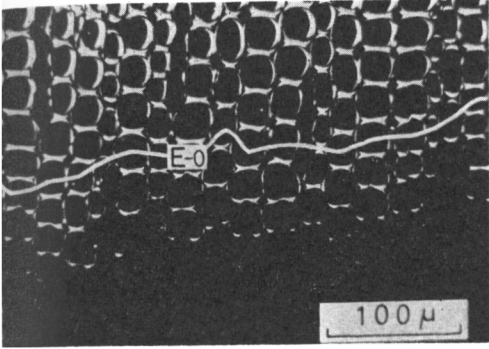
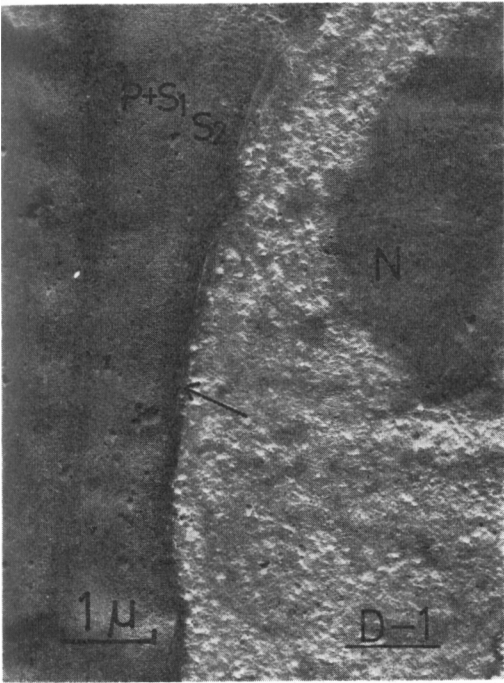
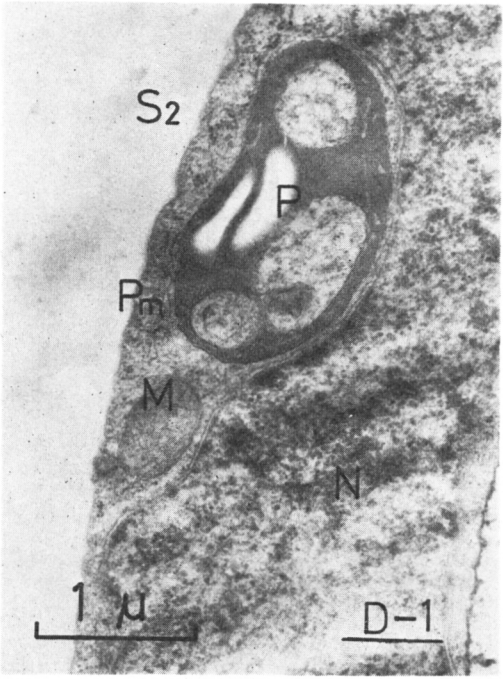


Fig. 6.



(A)



(B)

Fig. 7.

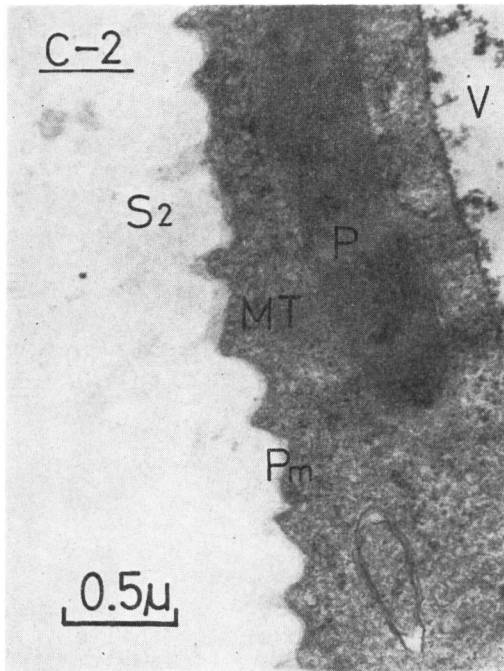


Fig. 8.

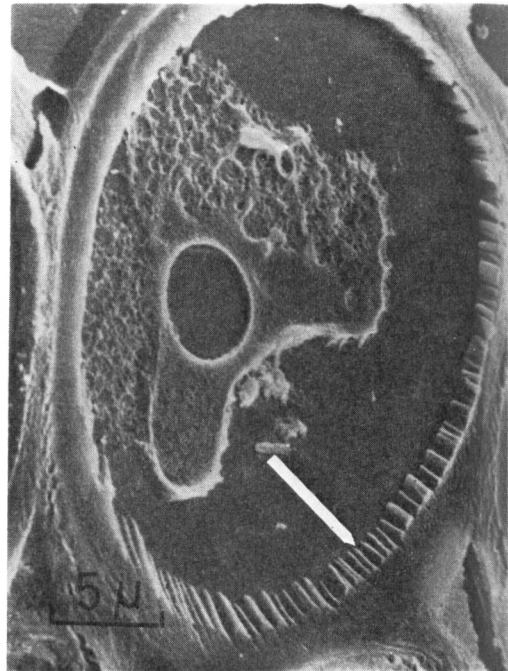


Fig. 9.

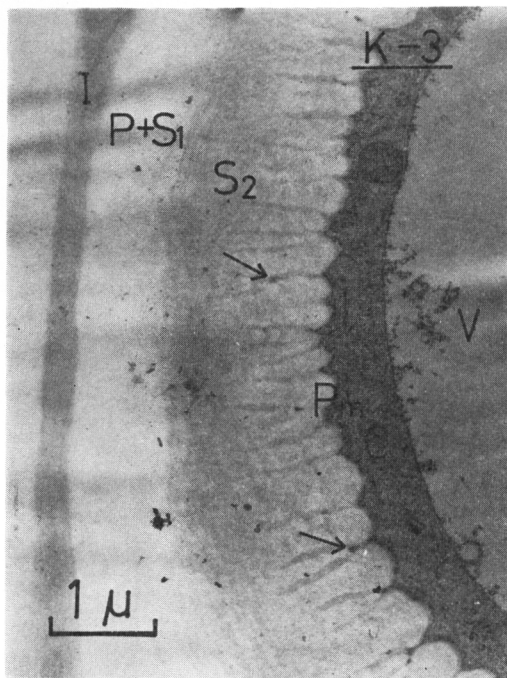


Fig. 10.

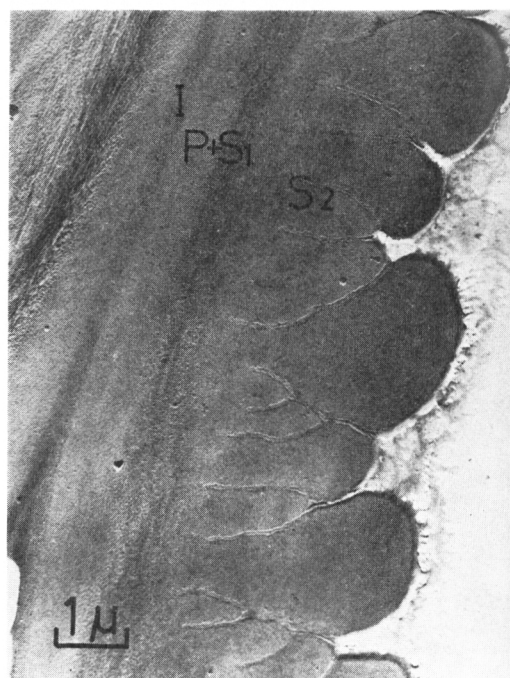


Fig. 11.

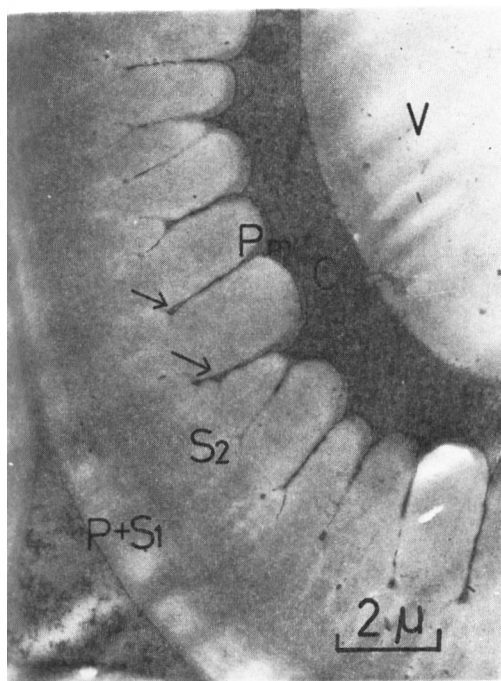


Fig. 12.

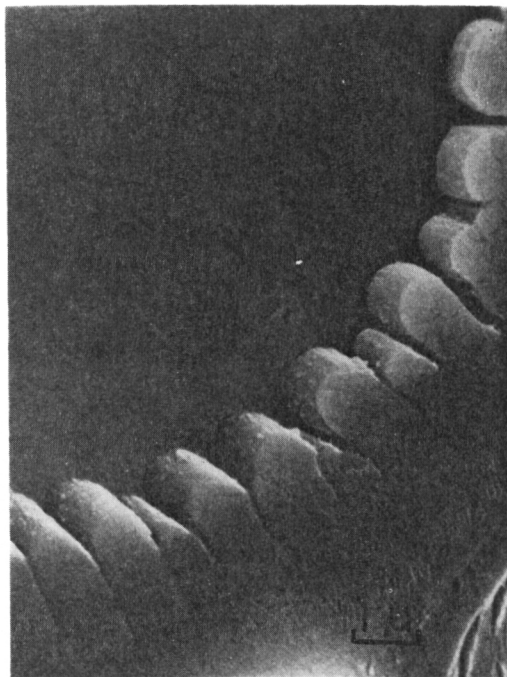


Fig. 13.