

海藻の細胞学的研究法 (II)

西林長朗*・猪野俊平*

T. NISHIBAYASHI and S. INOH: Methods in cytological studies of marine algae (II)

(B) 固定後の処理法

a) 脱水およびパラフィン誘導

前報に列記したいずれかの固定液の中に、材料を適当な時間浸した後は材料をパラフィン中に埋没するためアルコールを用いて脱水する。脱水に先立って、材料は濾過海水で洗わなければならない。この操作は固定液の色が残らなくなるまで充分に行なう。普通、10分毎に5回ぐらい海水をとりかえてたりる場合が多い。この後の脱水の方法は、海藻の生育環境の性質上、陸上植物の場合とはかなり異なっている。原形質の急激な変化を防ぐために、脱水と同時に海水から淡水に徐々に移すように配慮した、次のような手順をとらなければならない。

- (1) 濾過海水による水洗
- (2) 海水 90 cc + 95% アルコール 10 cc……………30分
- (3) 海水 80 cc + 95% アルコール 20 cc……………30分
- (4) 海水 70 cc + 95% アルコール 30 cc……………30分
- (5) 海水 40 cc + 蒸溜水 20 cc + 95% アルコール 40 cc……………40分～1時間
- (6) 海水 20 cc + 蒸溜水 40 cc + 95% アルコール 40 cc……………40分～1時間
- (7) 50% アルコール……………3～10時間
- (8) 70% アルコール……………3～24時間 (この液に浸して材料を保存しても変質しない。)
- (9) 85% アルコール……………3～12時間
- (10) 95% アルコール……………3～12時間
- (11) 無水アルコール I・II……………24時間
- (12) クロロホルム 10 cc + 無水アルコール 30 cc } ……………1時間ずつ
- (13) クロロホルム 20 cc + 無水アルコール 20 cc }

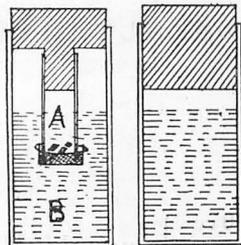
* 岡山大学理学部生物学教室

(14) クロロホルム 30 cc+無水アルコール 10 cc……………1時間

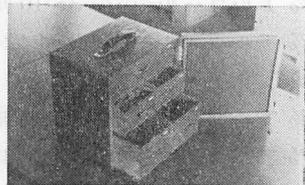
(15) 純クロロホルム I・II……………1~1.5時間

無水アルコールおよびクロロホルムの中に、材料をこれ以上長く入れておくと、材料は硬くなって結果が悪い。上の各操作が終ると、次は固定瓶中のクロロホルムの量を少なくして、その上に融点 42°C ぐらいの軟パラフィンの固まりを削ったパラフィン末を入れて、栓をしてしばらく放置する。次いで栓をしたまま定温器に入れ、数時間後に栓を取ってクロロホルムを追い出す。軟パラフィン中にクロロホルムがなくなった頃に、軟パラフィンは融点 $52\sim 56^{\circ}\text{C}$ の硬パラフィンと置きかえる。できたパラフィン・ケーキは、ミクロトームで厚さ $5\sim 7\mu$ の切片とする。切片は Myers の卵白液で、スライド・ガラスに貼着後、2, 3日間乾燥して染色、脱水を行ない永久プレパラートとする。

海藻を採集後、海浜で直ちに処理すべき操作は、上記の操作のうち、70%アルコールまでの脱水の操作である。薬品の購入の不便な旅行先で固定をする時には、脱水の操作に第1図に示すような二重大型固定瓶を使用するのが便利である。これは7本の大型固定瓶(直径5 cm, 高さ10 cm)を用意し、これに上に記した(2)~(8)の種々の濃度のアルコール液をあらかじめ入れておく。この瓶のコルク栓の下面中央に直径2 cm ぐらいの円筒状の突出部を作り、硝子管 A の栓に適するようにする。この硝子管(直径2 cm, 高さ4 cm)の一端にガーゼを結び付け、この中に固定材料を入れる。液をみだした大型固定瓶 B に、固定材料を入れた硝子管 A を挿入し、一定時間放置後、硝子管 A をコルク栓とともに、次に濃いアルコール液を入れた大型固定瓶に移し、順



第1図
脱水用大型固定瓶



第2図 固定用運搬箱
箱は3段になっていて、下段には固定液、中段には固定瓶、上段には実験器具を入れる。

次この方法をくり返して、70% アルコールまで脱水する。このような大型固定瓶、固定液、多数の固定瓶を運ぶ場合には、第2図の写真のような固定用運搬箱を作って用いると便利で安全である。

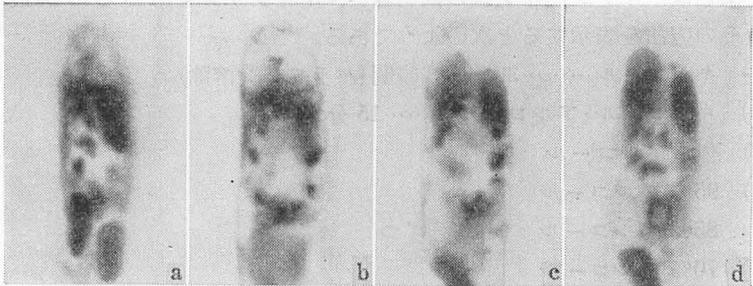
(b) 染色

染色はハイデンハイン氏の鉄明礬ヘマトキシリンを用いるのが最もよい。その方法を表示すると次のようである。

- (1) キシロール……………30分～3時間(パラフィン溶解)
 - (2) キシロール・アルコール……………15分
 - (3) 無水アルコール
 - (4) 95% アルコール
 - (5) 85% アルコール
 - (6) 70% アルコール
 - (7) 50% アルコール
- } 10分ずつ
- (8) 水洗……………30分～1時間
 - (9) 10% 過酸化水素水……………24～48時間(オスミック酸で黒変した材料を漂白する操作で、オスミック酸を含まない固定液を使用した時は省略する。)
 - (10) 水洗……………30分～1時間
 - (11) 4% 鉄明礬水溶液(媒染剤)……………3～20時間
 - (12) 水洗……………1時間
 - (13) 0.5% ヘマトキシリン水溶液……………2～15時間
 - (14) 水洗……………1時間
 - (15) 3% 鉄明礬水溶液(分染)……………数分(検鏡しながら行なう。フレーミング系統の固定液を用いた時は、脱色が速いから注意を要する。)
 - (16) 水洗……………4～15時間
 - (17) 50% アルコール
 - (18) 70% アルコール
 - (19) 85% アルコール
 - (20) 95% アルコール
- } 各15分
- (21) 無水アルコール I・II……………2～3時間
 - (22) キシロール・アルコール……………30分
 - (23) キシロール……………2～3時間

(24) カナダバルサムで封入

以上のような複雑な実験操作をへて、プレパラートはでき上る。染色体を明瞭に観察するには、解像力の高いよい顕微鏡のレンズを用いるとともによいプレパラートが必要であるから、各操作は慎重に行なわねばならない。



第3図 スジメ (*Costaria costata*) の遊走子嚢細胞における第一減数分裂デアキネシス期。a~d: 1つの核を4つの焦点面に分けて撮影したもの。(パラフィン切片, ヘマトキシリン染色) ×1680

体構造の簡単な糸状の海藻の場合には、切片を作る必要はなく、比較的簡単に核の構造が観察される。しかし、藻体は脱水によって収縮し易いので少し工夫を要する。褐藻類の *Ectocarpus siliculosus* (SCHUSSNIG and KOTHBAUER, 1934) では、次のような固定染色がよい。

- (1) 70% アルコールで固定
- (2) 蒸留水で水洗
- (3) 0.5% 鉄明礬……………12 時間
- (4) 蒸留水で水洗
- (5) 0.5% ヘマトキシリン……………24 時間
- (6) 水洗……………15 分
- (7) 2% 鉄明礬で分染
- (8) 15% アルコールから順次 96% アルコールまで脱水
- (9) 無水アルコール……………45 分
- (10) アルコールとオリガヌム油の混合液に浸す
- (11) 薄いカナダバルサムへ入れ、最後に濃いカナダバルサムで封じる。

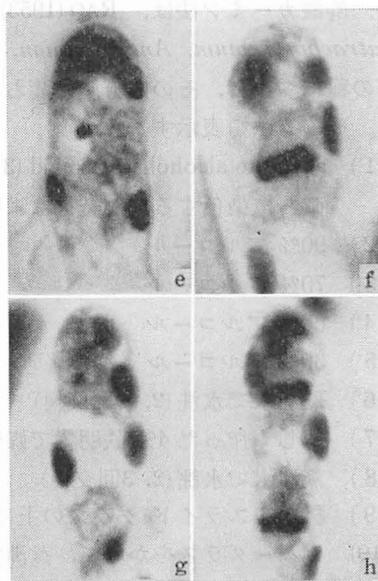
糸状紅藻の *Spermothamnion* では、固定後も低濃度のアルコールに浸すと孢子嚢の膜が膨潤し、細胞の内容も変化するので、DREW (1934) は藻全体

をブラジリン (Brazilin) で染色し、そのまま封埋する次のような方法を用いて成功している。

- (1) 40% ホルムアルデヒド 6 cc + 70% アルコール 100 cc で固定
- (2) 鉄明礬アルコール液
(無水アルコール 20 cc + 4% 鉄明礬 15 cc) 1 時間
- (3) 70% アルコールで洗う 3~4 日
- (4) ブラジリン液 (ブラジリン 0.5 g + 70% アルコール 100 cc) 1 時間
- (5) 70% アルコール 数秒
- (6) 鉄明礬アルコール液 (同上) で脱色
- (7) 70~95% アルコールで洗う
- (8) 無水アルコール
- (9) 無水アルコール 1 cc + キシロール 15 cc
- (10) カナダバルサム 3 cc + キシロール 25 cc + 無水アルコール 2 cc

この後、より濃いバルサムへ次第に移し、最後にバルサムで封入する。

DREW (1945) は紅藻をホルマリン・アルコールで固定した場合、組織が著しく硬くなるので、この軟化法として塩酸で処理する方法を示している。70% アルコール 90 cc に塩酸 10 cc を加えた液に材料を浸して、60°C ぐらいまで加温する。処理時間は種により、また材料の老若によって異なっている。*Gigartina mamillosa* の若い体では 15 分間、*Chondrus crispus* では 5 分間の処理でよい。処理が長すぎると核が染まらなくなり、遂には組織が崩壊する。この後、70% アルコールで洗って、後は普通の方法で脱水してパラフィンに埋蔵する。



第4図 スジメ (*Costaria costata*) の遊走子囊細胞における減数分裂。*e*: シナプシス期。*f*: 第一分裂中期側面視。*g*: 中間期。*h*: 第二分裂中期 (パラフィン切片, ヘマトキシリン染色) ×1680

(C) おしつぶし法

これまでは材料をパラフィン中に封埋して切片を作り、これを鉄明礬へマトキシリンで染色を行なうプレパラートの作り方を述べてきたが、この方法は手順が複雑で、プレパラートができ上がるまでにはかなり長い時間を必要とする。この難点を償うために、近年、海藻についても酢酸カーミンやフォイルゲン反応を用いて染色を行なう、安価で簡便なおしつぶし法が工夫に工夫を重ねて試みられているので、次にこれを紹介する。この方法ではおしつぶしにより、染色体は分散するので観察し易くなる。一方、海藻には染色体の染色性が弱いものが多いので、酢酸カーミン染色の場合にも媒染を行なうなどの特別の考慮が払われている。

a) 酢酸カーミン染色

酢酸カーミン法は、RAO (1953) が紅藻類の *Porphyridium*, *Porphyra*, *Batrachospermum*, *Antithamnion*, *Antithamnionella*, *Griffithsia* など数多くの種について、その四分胞子嚢および四分胞子発芽体に用いて成功している。その方法を表示すると

- (1) absolute alcohol-acetic acid (3:1) で10分～数時間固定する。固定後、直ちに染色する方が結果はよい。
- (2) 90% アルコール
- (3) 70% アルコール
- (4) 50% アルコール
- (5) 30% アルコール
- (6) 蒸留水で水洗 (2, 3回交換)
- (7) 新しく作った4% 鉄明礬で媒染。5～20分間
- (8) 蒸留水で水洗 (2, 3回交換)
- (9) 材料をスライド・ガラスの上に取り、酢酸カーミン液を滴下
- (10) カバーガラスをかけて、煮沸するまで加温 (2, 3回煮沸をくりかえす)
- (11) 指頭でおしつぶす
- (12) カバーガラスの周辺に酢酸カーミン液を補って再び温め、暖かい場所に10分間放置
- (13) 検 鏡

これを永久プレパラートとするには McCLINTOCK の方法を用いるが、永久プレパラートにするよりも、一時プレパラートで検鏡する方が像は鮮明で

ある。吉田忠生氏(1959)も、邦産の *Batrachospermum* の核をこの方法を用いて観察している。しかし、RAO は同じ紅藻類であっても、*Polyides*, *Furcellaria*, *Dumontia* では細胞膜が厚くて、しかも粘液に富んでいるので液が中に入り難く、また核の周囲には多量の紅藻澱粉があるので染まりが悪く、この方法では観察がうまくできないと報告している。AUSTIN(1960)は *Furcellaria fastigiata* の体細胞核分裂および減数分裂をカルノア液 (Carnoy's fluid) で固定した後、鉄明礬で媒染し、酢酸カーミンで染色すると、染色体は深紅色に染まり観察できることを報告している。染色の度合は鉄明礬の濃度と、その後の水洗の程度によっていろいろに変えることができる。脱色は再び鉄明礬に浸すことにより行なわれる。酢酸カーミン中で材料を熱したり、冷したりしても染色の強さは加減できる。さらに、AUSTIN(1956)は紅藻類の多くの種について、acetic alcohol (1:3) で固定した後、酢酸カーミン液または鉄明礬と酢酸カーミンとを混合した液を用いて染色を行ない染色体を観察している。

NAYLOR はこれに少し改良を加えた方法を、褐藻類のコンブ属(1956)およびフークス目植物(1957)に適用して成功している。フークス目植物の頂端細胞や若い生殖器官を用いる場合には、色素体が邪魔をして核が見えなかったり、染まらなかつたりするのを防ぎ、また細胞膜を軟かくしておしつぶし易くするために、過酸化水素水および炭酸ソーダを用いて処理している。材料をカルペチェンコ液で24時間固定した後、水洗を十分に行ない、20% 過酸化水素水に4時間浸す。再び完全に水洗してから、6% 炭酸ソーダ液を滴下したスライド・ガラス上に移す。ここで材料中のアルギン酸塩はアルギン酸ソーダとなり、スライドを徐々に加温するとカバーガラスの重みで材料はおしつぶされる。蒸留水を注いで余分の炭酸ソーダを洗い流してから、酢酸カーミンを注入して十分に染まるまでゆっくりと加温する。このまま検鏡してさしつかえないが、これを永久プレパラートとするには、酢酸アルコール中でカバーガラスを剥がし、脱水してユーパラルに封埋する。漂白の後、直ちに調べることができない時には、45% 酢酸中に酢酸鉄を溶解して淡い琥珀色となった溶液を acetic alcohol (1:3) 液に加えた中に、材料を浸して貯蔵することができる。この液で貯蔵した時には、アルコールで洗って濃い酢酸に移し酢酸カーミン液を滴下しておしつぶせばよい。NAYLOR(1958)はこの方法を *Stictyosiphon tortilis* にも用いて良い結果を得ている。コンブ類の場合には、

成熟した雌配偶体，すなわち卵形成の時期にある配偶体または卵放出後もないものを用いるのがよい。このような配偶体を固定するには，それが附着したスライド・ガラスをそのまま acetic alcohol (1:3) 液に24時間以上浸せばよい。このような長時間の固定を行なうと，色素体が染まらなくなる。媒染剤としての酢酸鉄で処理した後に酢酸カーミン液で染めればよい。*Stictyosiphon tortilis* (NAYLOR, 1958) の発芽体では，多数の分裂像を得るために，acetic alcohol で固定する前に夜通し冷蔵庫に入れて冷してから2時間室温に放置し，その後0.1% コルヒチン溶液で2時間処理している。

VENKATARAMAN and NATARAJAN (1959) は Cladophoraceae に属する *Rhizoclonium hieroglyphicum* の染色体を次のような方法で観察している。いろいろな固定液を使って実験しているが，その中でも acetic alcohol (1:3)，または propionic-alcohol (absolute alcohol 75 cc, propionic acid 25 cc) を用いて固定するのが最もよい。固定に先立って，コルヒチンまたは8-ヒドロオキシキノリンで前処理を行なう。これらの液は染色体を収縮せしめ，紡錘体の働きを不活潑にし，原形質の粘性を低下させるので，前処理によって中期染色体は互に離れて拡がるようになる。コルヒチンで前処理を行なう場合には0.2% の溶液に2時間浸し，その後蒸留水で十分に洗い流す。propionic-alcohol 溶液で2~6時間固定して propiono-carmine で染色しておしつぶす。8-ヒドロオキシキノリンを用いる場合には，0.0015 M 溶液で2~3時間処理すればよい。

KEMP and COLE (1961) はコンブ目植物の一種 *Nereocystis luetkeana* の配偶体を酢酸カーミンで染色を行なって核分裂をきれいに観察している。最初，配偶体をエタノール酢酸 (3:1) で24時間固定する。この固定液に数滴のヨードヨードカリ溶液を加えておくと，色素体の染まるのが妨げられて観察し易くなる。固定後，完全に水洗して2% 鉄明礬に15分間浸して媒染する。その後，再び水洗して余分の鉄明礬を洗い落して酢酸カーミン液で染色する。

最近 EVANS (1962) が *Fucus* の染色体を観察した方法は，材料を acetic alcohol (1:3) で18~24時間固定してその後12時間水洗して，1モルの濃度の塩化リチウムの溶液に15分間浸す。この液で処理すると材料は軟くなり，細胞はばらばらになる。15分間水洗した後，水の中でおしつぶして酢酸鉄を含む酢酸カーミン液を注ぎ加温して検鏡する。また低調海水に藻体を浸すことによって，多くの分裂像が得られることを報告している。

以上、海藻の酢酸カーミン染色おしつぶし法による染色体の観察法を紹介してきたが、固定液としては酢酸とエタノールを1:3の割合で混合した液を用いるのが、最も安全なようである。海藻の染色体は一般に染まり難いので、鉄明礬または酢酸鉄で媒染を行ない、その後で酢酸カーミンを用いて染色する。酢酸カーミン液に鉄明礬を混じた液を用いてもよい。固定液中に数滴の鉄明礬を加えるのも一法である。また加温すれば一層濃く染まるようになる。核板に並んだ中期染色体を観察し易くするには、コルヒチンまたは8-オキシキノリンで前処理するとよい。コンブ目植物の配偶体で、色素体が染まるのを防ぐには、固定時間を長くしたり、ヨードヨードカリ溶液を数滴固定液に加える。藻体の組織が硬くておしつぶしがたいときには、固定後に材料を20% 過酸化水素水に浸せばよい。コンブ目およびフークス目植物の組織細胞を用いる場合には、6% 炭酸ソーダ液や1モルの塩化リチウム溶液で処理すれば、組織は軟くなる。

b) フォイルゲン染色

フォイルゲン反応を利用して海藻の核を観察するには、あらかじめ材料を1:3の割合に混じた酢酸アルコール (WALKER, 1954; KRISHNAMURTHY, 1959), またはホルマリン・アルコール (DREW, 1934; RAO, 1956), ホルマリン酢酸アルコール (WESTBROOK, 1928; RAO, 1956), カルペチェンコ液 (NAYLOR, 1958, '59) などで固定する。固定時間は、コンブ類の配偶体を酢酸アルコールで固定する場合には、2~3時間でよい。フークス目植物の葉体の頂端部とか生殖器托を、カルペチェンコ液を用いて固定する時には12~18時間がよい。NAYLOR (1959) は酢酸アルコールを固定液に用いると、液中のアルコールが細胞膜を堅くして液の透過を妨げるので、結果がよくないことを報じている。

固定後は流水で完全に水洗する。特にホルマリンを含む固定液で固定を行なった場合には、ホルマリンを完全に除去しなければならない。ホルマリンが残っていると、これが試薬と反応して細胞が一様に赤色に染まり核反応が不明瞭になる。その後、材料を蒸留水中に移し、60°Cの温度になるまで温める。次に同じく60°Cに温めた1規定塩酸に材料を浸して加水分解する。加水分解の時間は種によりまた用いた固定液の種類によって異なっている。酢酸アルコールを固定液として用いた場合、コンブ類の配偶体では10分間の加水分解でよい (WALKER, 1954)。チシマクロノリの精子形成の核分裂では

6~8分、果孢子形成では10~15分である(KRISHNAMURTHY, 1959)。普通、5~20分ぐらいの加水分解が適当であるが、カルペチェンコ液のようにクロム酸を含有する固定液で固定した場合には、一般に長時間(15~45分)の加水分解が必要である。

加水分解が終ると、塩酸から材料を取り出して、冷却した蒸留水の中に一度浸してから、作製したばかりのシッフ氏指薬(Schiff's reagent)(フクシン1gを200ccの熱湯に溶解し、50°Cまで冷して濾過する。それに1N HCl 20ccを加え、25°Cになるまで冷してから無水亜硫酸ソーダ1gを加える。この液を約24時間冷暗所に密閉し、液が黄色になってから使用する。)中に3~12時間浸す。亜硫酸水を3回ほど交換して漂白を行なった後、必要な部分をカミソリで切り取ってスライド・ガラスの上に置く。亜硫酸水を滴下してから、カバーガラスをかけて上から力を加えておしつぶす。これを永久プレパラートにするには、亜硫酸水中でカバーガラスを剝し、順次、高濃度のアルコールに移して無水アルコールまで脱水してからユーパラルで封じる。永久プレパラートにする時には、前もって貼着剤を塗布しておかねばならない。

材料の組織が硬くおしつぶしがたいときとか、組織中に存在する色素体の色素のために核の観察が困難な場合には、固定後、加水分解を行なう前に過酸化水素水で漂白すればこの難点が除かれる。漂白の時間は用いる材料の種類によって異なるが、普通20%過酸化水素水で3~4時間である。漂白の操作を施したときには、加水分解の時間は短かくてよいので7~10分が適当である。

文 献

- 1) ABE (TOMITA), K. (1932): Befruchtung und Kernteilung bei *Coccophora Langsdorffii* (TURN.) GREV. Sci. Rep. of Tōhoku Univ. Biol. 7, 43-47.
- 2) ABE, K. (1933): Mitosen im Antheridium von *Sargassum confusum* AG. Sci. Rep. of Tōhoku Univ. Biol. 8, 259-262.
- 3) ABE, K. (1936): Kernphasenwechsel von *Heterochordaria abietina*. Sci. Rep. of Tōhoku Univ. Biol. 11, 239-241.
- 4) ABE, K. (1938): Entwicklung der Fortpflanzungsorgane und Keimungsgeschichte von *Desmarestia viridis* (MÜLL.) LAMOUR. Sci. Rep. of Tōhoku Univ. Biol. 12, 475-482.
- 5) ABE, K. (1939): Mitosen im Sporangium von *Laminaria japonica* ARESCH. Sci. Rep. of Tōhoku Univ. Biol. 14, 327-329.
- 6) ABE, K. (1940): Meiotische Teilung von *Dictyosiphon foeniculaceus*. Sci. Rep. of Tōhoku Univ. Biol. 15, 317-320.
- 7) AUSTIN, A. P. (1956): Chromosome Counts in the Rhodophyceae. Nature 178, 370-371.
- 8) AUSTIN, A. P. (1960): Life history and reproduction of *Furcellaria fastigiata* (L.) LAM. I. The haploid plants

and the development of the carposporophyte. II. The tetrasporophyte and reduction division in the tetrasporangium. Ann. Bot. N. S. **24**, 257-274, 296-310. 9) CARTER, P. W. (1927): The life-history of *Padina pavonia*. I. The structure and cytology of the tetrasporangial plant. Ann. Bot. **41**, 139-159. 10) CHAMBERLAIN, C. J. (1924): Method of plant histology. Univ. of Chicago. 11) DREW, K. M. (1934): Contributions to the cytology of *Spermothamnion Turneri* (MERT.) ARESCH. I. The diploid generation. Ann. Bot. **48**, 549-573. 12) DREW, K. M. (1937): *Spermothamnion Snyderae* FARLOW, a Floridean Alga bearing Polysporangia. Ann. Bot. N. S. **1**, 463-476. 13) DREW, K. M. (1939): An investigation of *Plumaria elegans* (BONNEM.) SCHMITZ with special reference to triploid plants bearing parasporangia. Ann. Bot. N. S. **3**, 347-367. 14) DREW, K. M. (1945): Use of hydrochloric acid for softening algal tissues for microtome sections. Nature **156**, 479. 15) EVANS, L. V. (1962): Cytological studies in the genus *Fucus*. Ann. Bot. N. S. **26**, 345-360. 16) HEINE, E. M. (1932): New Zealand species of *Xiphophora* with some account of the development of the oogonium. Ann. Bot. **46**, 557-569. 17) HIGGINS, E. M. (1931): A cytological investigation of *Stypocaulon scoparium* (L.) KÜTZ., with especial reference to the unilocular sporangia. Ann. Bot. **45**, 345-353. 18) HIROE, M. and S. INOH (1954): Cytological studies on the Fucaceous plants IV. On the mitotic division in the antheridium of *Sargassum Horneri* (TURN.) AG. (Preliminary note). Bot. Mag. Tokyo **67**, 190-192. 19) HIROE, M. and S. INOH (1954): Cytological studies on the Fucaceous plants V. On the mitotic division in the embryo of *Sargassum patens* C. AG. Biol. Jour. Okayama Univ. **2**, 1-6. 20) HIROE, M. and S. INOH (1956): Cytological studies on the Fucaceous plants VI. On the meiotic division in the antheridium of *Sargassum tortile* C. AG. (Preliminary note). La Kromosomo **27-28**, 942-947. 21) HOLLENBERG, G. J. (1939): Culture studies of marine algae. I. *Eisenia arborea*. Amer. Jour. Bot. **26**, 34-41. 22) INOH, S. (1935): Embryological studies on *Pelvetia Wrightii* YENDO and *Fucus evanescens* AG. Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. V, **5**, 6-23. 23) INOH, S. (1936): On tetraspore formation and its germination in *Dictyopteris divaricata* OKAM., with special reference to the mode of rhizoid formation. Sci. Pap. of Inst. of Algal. Res. Fac. Sci. Hokkaido Univ. **1**, 213-219. 24) INOH, S. (1937): An embryological study on *Cystophyllum crassipes* J. AG. Bot. and Zool. **5**, 1821-1829. 25) INOH, S. (1947): Development of algae. Hokuryukan, Tokyo. 26) INOH, S. (1948): Algae and experiments. TIKARASHOBO, Tokyo. 27) INOH, S. and M. HIROE (1954): Cytological studies on the Fucaceous plants I. On the somatic mitosis in the embryo of *Sargassum piluliferum* C. AG. (Preliminary note). La Kromosomo **21**, 760-763. 28) INOH, S. and M. HIROE (1954): Cytological studies on the Fucaceous plants II. On the meiotic division in the antheridium of *Hizikia fusiformis* OKAMURA. (Preliminary note). La Kromosomo **21**, 764-766. 29) INOH, S. and M. HIROE (1954): The cytological study on the Fucaceous plants III.

On the meiotic division in the antheridium of *Sargassum piluliferum* C. AG. (Preliminary note). La Kromosomo **21**, 767-769. 30) INOH, S. and T. NISHIBAYASHI (1954): On the mitosis in the sporangium of *Undaria pinnatifida* (HARV.) SUR. Biol. Jour. Okayama Univ. **1**, 217-225. 31) ISHIKAWA, M. (1921): Cytological studies on *Porphyra tenera* KJELLM. Bot. Mag. Tokyo **35**, 206-218. 32) KEMP, L. and K. COLE (1961): Chromosomal alternation of generations in *Nereocystis luetkeana* (MERTENS) POSTELS and RUPRECHT. Can. J. Botany **39**, 1711-1724. 33) KRISHNAMURTHY, V. (1959): Cytological investigations on *Porphyra umbilicalis* (L.) KÜTZ. var. *laciniata* (LIGHTF.) J. AG. Ann. Bot. N. S. **23**, 147-176. 34) KUNIEDA, H. (1928): On the development of the sexual organs and embryogeny in *Sargassum Horneri* AG. Jour. Coll. Agric. **9**, 383-396. 35) KYLIN, H. (1918): Studien über die Entwicklungsgeschichte der Phaeophyceen. Svensk Bot. Tidskr. **12**, 1-64. 36) MCKAY, H. H. (1933): The life-history of *Pterygophora californica* RUPRECHT. Univ. California Publ. Bot. **17**, 111-148. 37) MYERS, M. E. (1928): The life-history of the brown alga, *Egregia Menziesii*. Univ. California Publ. Bot. **14**, 225-246. 38) NAYLOR, M. (1956): Cytological observations on three British species of *Laminaria*: a preliminary report. Ann. Bot. N. S. **20**, 431-437. 39) NAYLOR, M. (1957): An acetocarmine squash technique for the Fucales. Nature **180**, 46. 40) NAYLOR, M. (1958): Some aspects of the life history and cytology of *Stictyosiphon tortilis* (RUPR.) REINKE. Acta Adriatica **3**, 8-22. 41) NAYLOR, M. (1958): The cytology of *Halidrys siliquosa* (L.) LYNGB. Ann. Bot. N. S. **22**, 205-217. 42) NAYLOR, M. (1959): Feulgen reaction in the Fucales. Nature **183**, 627. 43) NIENBURG, W. (1910): Die Oogonentwicklung bei *Cystoseira* und *Sargassum*. Flora **101**, 167-180. 44) NIIZEKI, S. (1957): Cytological study of swarmer formation in *Enteromorpha Linza*. Natural Science Report of the Ochanomizu University **8**, 45-51. 45) NISHIBAYASHI, T. and S. INOH (1956): Morphogenetical studies in Laminariales I. The development of zoosporangia and the formation of zoospores in *Laminaria angustata* KJELLM. Biol. Jour. Okayama Univ. **2**, 147-158. 46) NISHIBAYASHI, T. and S. INOH (1957): Morphogenetical studies in Laminariales II. The development of zoosporangia and the formation of zoospores in *Costaria costata* (TURN.) SAUNDERS. Biol. Jour. Okayama Univ. **3**, 169-181. 47) NISHIBAYASHI, T. and S. INOH (1960): Morphogenetical studies on Laminariales V. The formation of zoospores in *Undaria undarioides* (YENDO) OKAMURA. Biol. Jour. Okayama Univ. **6**, 83-90. 48) NISHIBAYASHI, T. and S. INOH (1961): Morphogenetical studies on Laminariales VI. The formation of zoospores in *Chorda filum* (L.) LAMOUR. Biol. Jour. Okayama Univ. **7**, 126-132. 49) OKABE, S. (1929): Meiosis im Oogonium von *Sargassum Horneri* (TURN.) AG. Sci. Rep. Tōhoku Univ. Biol. **4**, 661-669. 50) OKABE, S. (1930): Mitosen im keimenden Embryo von *Sargassum Horneri* (TURN.) AG. Sci. Rep. Tōhoku Univ. Biol. **5**, 757-762. 51) RAMANATHAN, K. R. (1939): The morphology, cytology, and alternation of genera-

tions in *Enteromorpha compressa* (L.) GREV. var. *lingulata* (J. AG.) HAUCK. Ann. Bot. N. S. **3**, 375-398. 52) RAO, C. S. P. (1953): Acetocarmine as a nuclear stain in Rhodophyceae. Nature **172**, 1197-1198. 53) RAO, C. S. P. (1956): The life-history and reproduction *Polyides caprinus* (GUNN.) PAPENF. Ann. Bot. N. S. **20**, 211-230. 54) SCHUSSNIG, B. und E. KOTHBAUER (1934): Der Phasenwechsel von *Ectocarpus siliculosus*. Oesterr. Bot. Zeitschrift **83**, 81-97. 55) SIMONS, E. B. (1906): A morphological study of *Sargassum filipendula*. Bot. Gaz. **41**, 161-182. 56) STRASBURGER, E. (1897): Kernteilung und Befruchtung bei *Fucus*. Jahr. wiss. Bot. **30**, 351-374. 57) TAHARA, M. (1929): Ovogenesis in *Cocophora Langsdorfii* (TURN.) GREV. Sci. Rep. Tōhoku Univ. Biol. **4**, 551-556. 58) VENKATARAMAN, G. S. and K. V. NATARAJAN (1959): Propiono-carmine squash technic and chromosome spreading in algae. Stain Technology **34**, 233-234. 59) WALKER, R. I. (1931): Fertilization and embryo development in *Hesperophycus Harveyanus*. La Cellule Recueil de Cytologie et D'histologie Generale, **40**, 175-188. 60) WALKER, F. T. (1954): Chromosome number of *Laminaria digitata* LAMOUR. Ann. Bot. N. S. **18**, 113-118. 61) WESTBROOK, M. A. (1928): Contributions to the cytology of tetrasporic plants of *Rhodomenia palmata* (L.) GREV. and some other Florideae. Ann. Bot. **42**, 149. 62) YABU, H. (1957): Nuclear division in the sporangium of *Alaria crassifolia* KJELLM. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. **8**, 185-189. 63) YABU, H. (1958): On the nuclear division in tetrasporangia of *Dictyopteris divaricata* (OKAM.) OKAM. and *Dictyota dichotoma* LAMOUR. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. **8**, 290-296. 64) YABU, H. and A. IMAI (1957): On nuclear division in the antheridium of *Fucus evanescens* and *Pelvetia Wrightii*, and on four-egged oogonium of *Pelvetia Wrightii*. Bull. Japanese Soc. Phycology **5**, 44-49. 65) YABU, H. and J. TOKIDA (1960): Nuclear and cell divisions in zoospore formation of *Ulva pertusa* KJELLMAN. Bot. Mag. Tokyo **73**, 182-185. 66) YAMANOUCHI, S. (1909): Mitosis in *Fucus*. Bot. Gaz. **47**, 173-196. 67) YOSHIDA, T. (1959): Life-cycle of a species of *Batrachospermum* found in northern Kyushu, Japan. Jap. Journ. Bot. **17**, 29-42.