エンバク冠さび病における菌体と宿主細胞の接触面 —走査型および透過型電顕による観察—

尾上 孝利*, 谷 利一**, 佐川 寛典*

Takatoshi ONOE*, Toshikazu TANI** and Hirosuke SAGAWA*: The Interfaces
between Fungus and Host Cell in Crown-Rust Infected Oat Leaves
—Scanning and Transmission Electron Microscopic Observations—

Abstract

Ultrastructures of the fungus-host cell association in crown-rusted oat leaves were investigated by scanning and transmission electron microscopy. Intercellular hyphae growing in infected host tissues partially contacted the outer surfaces of the mesophyll cells. The projection of the cell wall of mesophyll cells and adherent material at the region of contact with the intercellular hyphae and mesophyll cells were seen by transmission electron microscopy, and the unclear border region was observed in this area by scanning electron microscopy. Haustorial mother cells were delimited from intercellular hyphae by septa. The tip of the haustorial mother cell which was globular at the center turned down forming a hook-shaped apex by which the haustorial mother cell and the mesophyll cell surface were connected. A penetration peg originated from the haustorial mother cell near the tip. It seemed that passage of penetration pegs through the host cell walls was accomplished by both enzyme and mechanical forces. The scanning electron micrographs showed that the haustorial body was ellipsoid and a neckband was on the tubular neck near the haustorial body.

(Received June 29, 1983)

Key Words: crown rust, ultrastructure, fungus-host cell association.

緒 言

さび病における宿主-寄生者相互関係を形態的に解明する試みは数多くなされている。透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた観察では吸器の微細構造^{1,6,7,12,23}, 吸器形成過程^{8,12}, 吸器をとりまく extrahaustorial membrane (EM) およびこの膜と吸器細胞壁の間の extrahaustorial matrix (EX) の微細構造¹⁰ などが報告され、さらに、電子顕微鏡レベルの細胞化学やオートラジオグラフィによって吸器 neck 部で認められる

neckband (nb) の機能^{3,9} と吸器からの物質のとり込み^{14,15} が研究されている。また、走査型電子顕微鏡 (SEM) では、孢子層形成過程^{5,12} や夏胞子の侵入過程^{12,16}, 罹病葉内部の細胞間菌糸 (Ih) と葉肉細胞との接触および吸器の構造^{2,11,19,23} などが観察されている。これら既報の研究のなかには、同一試料を SEM と TEM で観察し、吸器母細胞 (HMC) や吸器の構造について報告している例もあるが^{1,2,19,20}, 菌体と宿主細胞の接触面を両方法で詳細に検討している例はみあたらない。

本研究では、エンバク冠さび病における罹病性の機

* 大阪歯科大学細菌学教室 Department of Bacteriology, Osaka Dental University, Higashi-ku, Osaka 540, Japan

** 香川大学農学部 Faculty of Agriculture, Kagawa University. Miki-cho, Kida-gun, Kagawa 761-07, Japan

構を解明する研究の一環として、冠さび病罹病組織における Ih と葉肉細胞との接触と吸器形成過程における葉肉細胞壁の貫入状況、さらに吸器と宿主細胞内小器官の接触面などに重点をおいて SEM と TEM で観察し、両像から菌体と宿主細胞の接触状態を解析した。

実験材料および方法

供試材料 エンバク冠さび菌 (*Puccinia coronata* f. sp. *avenae*) のレース226に感染した親和性のエンバク品種 *Pc38* (感染型 4) の生葉を供した。

SEM 観察法 3×5 mm の大きさに切断した葉片を 3% グルタルアルデヒドで固定した。ついで、エタノール系列で脱水し、酢酸イソアミルの段階で、液体窒素中で凍結切断した。切断した試料を液体炭酸ガスを用いて臨界点乾燥を行った後、試料に金を蒸着した¹⁸⁾。観察は日立走査型電子顕微鏡 S450 と明石 Mini-SEM を用いて加速電圧 20~25 Kv で行った。さらに無固定・凍結乾燥法でも試料を作製した¹⁸⁾。3×5 mm に切断した葉片をただちに液体窒素で凍結後、切断した。切断した試料を -70℃ で真空凍結乾燥し、金を蒸着してから SEM で観察した。

TEM 観察法 感染葉をカミソリ刃で 1×2 mm の葉片に細断し、3% グルタルアルデヒド-0.025 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) で 4 時間、室温で前固定した。後固定は 2% オスミウム酸-0.025 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) で 1 時間行い、ついで常法に従ってエタノールとプロピレンオキシド系列で脱水した。試料を低粘性エポキシ樹脂の Spurr resin²⁴⁾ (配合比 vinyl cyclohexene dioxide (ERL) 4206: 10.0 g, diglycidyl ether of polypropylene glycol (DER) 736: 4.0 g, nonyl succinic anhydride (NSA): 26.0 g と dimethylaminoethanol (S-1): 0.4 g) に包埋した。超薄切片はダイヤモンドナイフを装着した Porter-Blum MT 2 型超ミクロトームで作製し、2% 酢酸ウラニウム水溶液と Reynolds の硝酸鉛水溶液²²⁾ で電子染色した。観察は日立 HU 12A 型透過電子顕微鏡を用いて加速電圧 100 Kv で行った。

実験結果

1. 細胞間菌糸と葉肉細胞の接触面

SEM 像: 固定および無固定像ともに Ih は直径 3~4 μm で、表層は概して滑らかで、隔壁があり、葉肉細胞表面と部分的に接触している (Figs. 1~3)。接触

部の境界は明瞭であるが (Figs. 2, 3 矢印 a)、部分的に不明瞭な部位もある (Fig. 2 矢印)。Ih と葉肉細胞を付着させるような構造物は両試料作製法ともに認められない (Figs. 2-4)。しかし、Ih の接触部で葉肉細胞壁がやや陥入している場合が固定 (Fig. 4 矢印) および無固定像 (Fig. 3 矢印) でともに観察される。

TEM 像: 葉肉細胞に接している Ih 細胞壁の電子密度は一般に葉肉細胞壁よりも高く、両者の境界は明瞭である (Figs. 5~7)。Ih が接触すると多くの葉肉細胞壁はやや陥入する (Figs. 5 矢印, 7 矢印 a)。接触部周辺では、葉肉細胞壁がやや突出する場合 (Fig. 6 矢印) と粘着性物質が葉肉細胞壁上に存する場合 (Fig. 7 矢印) がみられる。

2. 吸器母細胞と葉肉細胞の接触面

SEM 像: 両試料作製法ともに HMC は長さ 3~8 μm、直径 2~3 μm で、先端はかぎ型に曲がり、全体に膨んでやや大きい (Figs. 8, 10, 11)。HMC と菌糸の境界には隔壁が認められる (Figs. 8, 11)。HMC はかぎ型の先端部で葉肉細胞と密着しているが (Figs. 8~10)、両者を密着させるような物質は認められなかった (Figs. 8~12)。侵入糸は HMC の先端より少し内側から伸長している (Figs. 11, 12)。固定像で HMC の先端部が接した部分の葉肉細胞壁はやや陥入し (Fig. 8 矢印)、その周囲には明瞭な隆起が認められる (Fig. 9 矢印)。また、無固定像の接触部でも HMC 先端部と葉肉細胞壁は密着し、陥入とわずかな隆起が周囲で観察される (Fig. 10 矢印)。固定像の切断試料によると、膨らんだ HMC は葉肉細胞と接触し、先端から少し内側の部分がやや突出しているようである (Fig. 11 矢印)。HMC 先端より少し内側のところの葉肉細胞壁に穴が開き、HMC は葉肉細胞内の吸器につながっている (Fig. 12)。

TEM 像: HMC と葉肉細胞の接触部の境界は明瞭であり (Figs. 13~15)、接触部周辺で粘着性物質がみられる (Fig. 14 矢印)。侵入糸は HMC 先端より少し内側の部位で観察され (Fig. 14)、その周囲の葉肉細胞壁の電子密度は他の部分よりも高い (Figs. 13 矢印, 14 星印)。また、neck 部細胞壁の電子密度は高く、その周囲の葉肉細胞内には多数の管状構造が認められる (Fig. 14)。侵入糸貫入部では、SEM 像と同様に葉肉細胞壁が陥入し、周辺に小さい隆起が観察される (Fig. 15 矢印 a)。HMC 細胞壁の内層に連続した侵入糸細胞壁は葉肉細胞壁に密着し、その電子密度は葉肉細胞壁よりやや高いが、両者の境界は不明瞭である (Fig. 15 矢印 b)。

3. 吸器と葉肉細胞内小器官

SEM 像：固定および無固定像ともに吸器体は長楕円体で、分枝は認められない (Figs. 12, 16, 18)。吸器は neck 部を支点にして水平 (Fig. 16) または垂直 (Fig. 18) 方向に伸長する。固定像では吸器体の表層に葉肉細胞内小器官の小顆粒や管状構造が付着している (Fig. 16)。nb は固定像において吸器体から少し離れた neck 部でやや膨んで観察される (Fig. 16)。Fig. 17 に示した固定像の吸器断面では葉肉細胞の管状構造が吸器細胞壁と液胞膜の間で観察されるが EM と EX は明瞭に区別できない。なお、無固定像の吸器断面でも同様に EM と EX は識別できなかった。

吸器と葉肉細胞核は、固定像では管状構造を介して隣接しているが、両者の直接の接触は認められない (Fig. 18 矢印)。この結果は無固定像でも同様である。

TEM 像：電子密度の高い nb は吸器体から約 1.0 μm 離れた neck 部で認められる。吸器体は EX と EM でとり囲まれ、EM の外側には葉肉細胞のミトコンドリアや小胞体が見られる (Figs. 13, 19)。吸器細胞壁外層の繊維状構造物が EX 内に多数突出し (Fig. 19)、EM との接触も認められる (Fig. 19 矢印)。EM は葉肉細胞の小胞体と接している場合もある (Fig. 19)。しかし neck 部では EX はみられず、葉肉細胞膜が陥入している (Fig. 15)。吸器周辺で葉肉細胞核は、よく観察されるが、接触はみられない。

考 察

Ih および HMC と宿主細胞壁の接触面は TEM で平面的に、SEM で立体的に観察できる。しかし、接触面における水可溶性物質まで把握するには固定試料だけでなく、感染葉を直接凍結後、凍結乾燥した無固定試料の観察が必要である¹⁸⁾。本研究では固定試料の SEM, TEM 観察の他に無固定試料を SEM で観察した。罹病性関係に限定すると、菌体と宿主細胞の接触に関する従来の観察は、主に HMC と葉肉細胞との接触面に焦点が当てられ、この接触面に粘着性物質が存在することはすでに TEM 観察によって報告されている^{1,7,10,12,13,20,23)}。本研究結果も TEM 像で他さび菌^{1,7,10,12,13,20,23)}と同様の結果を示したが、SEM 像ではこの物質は両試料作製法ともに認められなかった。Ih と葉肉細胞の接触部の TEM 観察では葉肉細胞壁の突出と粘着性物質が認められるが、固定および無固定試料を観察した SEM 像では粘着性物質はみら

れなかった。しかし、SEM 像で、境界の不明瞭な接触部が認められたことは接触部に物質がつまったり、葉肉細胞壁が突出したために、境界が不明瞭になったとも考えられる。Ih と葉肉細胞壁との接触部境界が不明瞭になること、この部位で葉肉細胞壁が突出し粘着性物質が認められること、および葉肉細胞壁の陥入が両観察法で観察されることは、Ih と葉肉細胞壁が部分的に密着していることを示唆している。Ih と葉肉細胞壁との密着は、Ih が宿主細胞間隙を大量に走行する支点となること、また、マイクロオートラジオグラフィの結果が ^3H -グルコースと $^{14}\text{CO}_2$ -同化物は宿主細胞壁を通して吸器形成前の Ih に吸収されることを示している¹⁷⁾、この密着部位から養分吸収が行われている可能性が示唆される。従って Ih と葉肉細胞壁の密着は Ih の伸長にとって重要な因子であると推定される。

インゲンさび菌の TEM 所見^{8,12)}で侵入糸は HMC の先端より少し内側の部位から伸長すると述べられているが、TEM 像から HMC の先端を特定することは困難である。本研究では SEM を用いて HMC と葉肉細胞の接触部の断面を観察したところ、HMC の先端が明瞭に示され、冠さび菌の侵入糸が HMC の先端より少し内側の部分から伸長していることが明らかにされた。TEM 観察によって、侵入糸貫入部位の宿主細胞壁の繊維状構造物に捩れなどの変化が認められないことから侵入糸の貫入には物理的な力に関係なく、酵素による宿主細胞壁の分解が関与すると推定されている^{8,10,12)}。本研究でも、TEM 像で(1)侵入糸と宿主細胞壁の境界が不明瞭であること、(2)貫入部における宿主細胞壁の電子密度が他の部位より高くなることが示された。これらの観察結果は貫入部の宿主細胞壁の変性を示唆しており、貫入には酵素的分解が関与する可能性を示している。TEM 観察によって示された侵入糸貫入部周辺の細胞壁隆起は、宿主細胞壁が酵素によって分解され膨化した結果形成されたとも考えられ、Fig. 9 の SEM 像で示した隆起に相当するものと考えられる。TEM 観察によって HMC の全体像を把握することは困難であるので SEM 観察によって HMC の全体像を詳細に観察したところ(1) HMC の中央部が膨んでいること、(2) HMC の膨圧が一点に集中している像が観察されること (Fig. 11 矢印) (3) HMC の先端がかぎ型に曲っていることなどの結果が得られた。また、(4) SEM と TEM 像で貫入部の細胞壁が陥入していた。これらの結果は、エンバク冠さび菌が宿主細胞壁を貫入する時には酵素的分解のほか

に HMC の物理的な力が関与している可能性を示唆している。なお、冠さび菌の HMC の形態は先に述べたようにコムギ黒さび菌の球根状 (bulbous)²¹⁾ とは異なっていた。

エンバク冠さび菌の吸器体は SEM・TEM 像とも長楕円体で、インゲンさび菌の吸器体でみられる分枝は観察されなかった¹⁹⁾。nb は TEM 像と SEM の固定像で認められ、SEM 像では neck 部で膨んで観察され、インゲンさび菌²⁰⁾ とコムギ黒さび菌¹²⁾ で観察された nb の SEM 像と一致していた。TEM 像において吸器侵入部および吸器周囲で宿主細胞の小胞体が多量観察されることおよび吸器と宿主細胞核が隣接することは他のさび菌^{6,12)} と同様の結果であった。SEM 像の吸器表層で多数観察される管状構造と小顆粒の一部は大きさからそれぞれ小胞体とミトコンドリアと推定される。これら小器官の分布は TEM 所見と SEM 所見でよく一致していた。エンバク冠さび菌の吸器と宿主細胞核が隣接することは TEM 像ですでに報告されているが⁴⁾、両者の直接の接触は SEM (大きさから核と判定)・TEM 像ともに認められなかった。TEM 像では吸器を取り囲む EM と EX が認められ、葉肉細胞内小器官は EM と接していた。SEM 像では固定および無固定像ともに吸器の断面で EM と EX の区別が出来なかった。しかし、コムギ黒さび菌で報告²¹⁾ されているように、吸器細胞壁と液胞

膜の間に宿主細胞内小器官が観察された (Fig. 17)。従って、本研究における SEM 像でも宿主細胞内小器官は EM に付着しているものと考えられる。しかし、SEM を用いて EM と吸器細胞壁表層を詳細に解析するには試料作製法をさらに検討するとともに高分解能 SEM (電界放射型 SEM) を用いて観察する必要がある。

摘 要

走査型 (SEM) および透過型 (TEM) 電子顕微鏡を用いて冠さび菌罹病葉内を観察し、菌体と宿主細胞の接触面の微細構造を検討した。罹病組織内を走行する細胞間菌糸 (Ih) は葉肉細胞と部分的に密着している。TEM 像では接触部周辺で宿主細胞壁の突出と粘性物質が認められ、SEM 像ではこの部位は不明瞭な境界として観察される。吸器母細胞 (HMC) と Ih との間には隔壁がみられ、SEM 所見によると HMC の先端はかき型に曲がり、中央はやや膨んだ形態をしている。HMC はかき型の先端部で葉肉細胞に密着するが、侵入糸は先端よりやや内側から伸長する。侵入糸の宿主細胞壁貫入には酵素的分解と HMC の物理的力が関与する可能性が示唆される。SEM 像によると吸器体は長楕円体で、neck 部にはやや膨んだ環状の neckband がみられる。

引 用 文 献

1. Abu-Zinda, A.A.H., Cobb, A. and Boulter, D. (1975). *Physiol. Plant Pathol.* 5: 113-118.
2. Al-Khesraji, T. O. and Lösel, D. M. (1981). *Ibid.* 19: 301-311.
3. Chong, J. and Harder, D. E. (1980). *Can. J. Bot.* 58: 2496-2505.
4. Chong, J. and Harder, D. E. (1982). *Phytopathology* 72: 1518-1526.
5. Gold, R. E. and Littlefield, L. J. (1979). *Can. J. Bot.* 57: 629-638.
6. Harder, D. E. (1977). *Ibid.* 56: 214-224.
7. Hardwick, N. V., Greenwood, A. D. and Wood, R. K. S. (1970). *Ibid.* 49: 383-390.
8. Heath, M. C. and Heath, I. B. (1975). *Protoplasma* 84: 297-314.
9. Heath, M. C. (1976). *Can. J. Bot.* 54: 2484-2489.
10. Littlefield, L. J. (1972). *Protoplasma* 74: 271-305.
11. Littlefield, L. J. (1974). *Trans. Br. mycol. Soc.* 63: 208-211.
12. Littlefield, L. J. and Heath, M. C. (1979). *Ultrastructure of rust fungi*. Academic Press, New York, San Francisco, London. pp. 3-193.
13. Mendgen, K. and Fuchs, W. H. (1973). *Arch. Microbiol.* 83: 181-192.
14. Mendgen, K. (1979). *Ibid.* 123: 129-135.
15. Mendgen, K. (1981). *Phytopathology* 71: 983-989.
16. 尾上孝利, 谷 利一, 内藤中人 (1972). 香川大農学報 24: 42-47.
17. 尾上孝利, 谷 利一, 内藤中人 (1973). 菌學研究報告 10: 303-312.
18. 尾上孝利, 谷 利一, 佐川寛典 (1982). 香川大農学報 34: 61-71.
19. Pring, R. J. and Richmond, D. V. (1975). *Trans. Br. mycol. Soc.* 65: 291-294.
20. Pring, R. J. (1980). *Physiol. Plant Pathol.* 17: 269-276.

21. Protnikova, Y. M., Littlefield, L. J. and Miller, J. D. (1979). *Ibid.* 14: 37-39.
22. Reynolds, E. S. (1963). *J. Cell Biol.* 17: 208-212.
23. Rijkenberg, F. H. S. and Truter, S. J. (1973). *Phytopathology* 63: 281-286.
24. Spurr, A. R. (1969). *J. Ultrastructure Res.* 26: 31-34.

Abbreviations used: **Host**; C: chloroplast, CW: cell wall, EM: extrahaustorial membrane, ER: endoplasmic reticulum, EX: extrahaustorial matrix, M: mitochondrion, MC: mesophyll cell, N: nucleus, T: tubular structure, TM: tonoplast, V: vacuole. **Fungus**; cw: hyphal cell wall, H: haustorium, hcw: haustorial cell wall, HMC: haustorial mother cell, HN: haustorial neck, hncw: haustorial neck cell wall, Ih: intercellular hypha, m: mitochondrion, nb: neckband, pp: penetration peg, sep: septum.

Procedures of sample preparation for scanning electron microscopy: Sample 1: glutaraldehyde fixation followed by freeze-fracturing in isoamyl acetate, critical-point-drying and gold-coating. Sample 2: non-fixation followed by freeze-drying and gold-coating.

Explanation of figures

Plate I

Figs. 1-4: Scanning electron micrographs of the interface between intercellular hyphae and mesophyll cells.

Fig. 1: Several extensive intercellular hyphae within intercellular spaces of the leaf. Sample 1. $\times 1,000$.

Fig. 2: An intercellular hypha contacting a mesophyll cell. Note that the border between the intercellular hypha and the mesophyll cell is either unclear (arrows) or clear (arrows a). Sample 2. $\times 5,200$.

Figs. 3-4: The cell wall of a mesophyll cell invaginated at the region of contact with intercellular hypha (arrows). Note the clear border seen between the intercellular hypha and mesophyll cell in Fig. 3 (arrow a). Fig. 3: Sample 2. $\times 4,400$. Fig. 4: Sample 1. $\times 15,000$.

Figs. 5-7: Transmission electron micrographs of the interface between intercellular hyphae and the mesophyll cell.

Fig. 5: Intercellular hyphae within the intercellular space of the mesophyll cell. Note that the border between the intercellular hyphae and mesophyll cells is clear and host cell wall is invaginated (arrows). $\times 12,000$.

Fig. 6: An enlarged portion of Fig. 5. Note that the cell wall of the mesophyll cell protrudes at the region of contact with the intercellular hypha (arrow). $\times 92,000$.

Fig. 7: Adherent material on the cell wall of the mesophyll cell observed around the region of contact with the intercellular hypha (arrow). Note that the cell wall of the mesophyll cell is invaginated at the region of contact with the intercellular hypha (arrow a). $\times 25,100$.

Plate II

Figs. 8-12: Scanning electron micrographs of a haustorial mother cell addressed to the surface of a mesophyll cell.

Fig. 8: Cell wall of a mesophyll cell invaginated at a point of contact with a haustorial mother cell (arrow). Note that a septum between the intercellular hypha and the haustorial mother cell is round and protruding. Sample 1. $\times 8,600$.

Fig. 9: Protrusion of the cell wall of a mesophyll cell at a point of contact with the haustorial mother cell (arrows). Sample 1. $\times 26,700$.

Fig. 10: Region of invasion from the haustorial mother cell into the mesophyll cell. Note that the invagination and the ring-like protrusion of the mesophyll cell wall is observed at the point of contact with the haustorial mother cell (arrows). Sample 2. $\times 6,400$.

Fig. 11: The haustorial mother cell on the margin of the cross-fractured mesophyll cell. Note that the turgor pressure of the haustorial mother cell is concentrated at the invasion site of the haustorial mother cell near the top (arrow). Sample 1. $\times 11,000$.

Fig. 12: A haustorium connected by a tubular neck to the haustorial mother cell in the crossfractured mesophyll cell. Note that the penetration peg originated from the

haustorial mother cell near the top and has breached the host cell wall (arrow). Sample 1. $\times 4,200$.

Figs. 13-15: Transmission electron micrographs of the process of invasion from the haustorial mother cell into the mesophyll cell.

Fig. 13: A haustorium in the mesophyll cell. Note that the electron density of the host cell wall at the invasion site is higher than that of other regions (arrows). $\times 9,300$.

Fig. 14: A haustorial mother cell and penetration peg. Note that the electron density of the host cell wall contacting the haustorial mother cell and penetration peg is higher than that of other regions (asterisks). Host tubular structures are found around the haustorial neck, and the adherent material on the host cell wall is observed around the region of contact with the haustorial mother cell (arrows). $\times 37,000$.

Fig. 15: Higher magnification of the penetration site enlarged from Fig. 13. Note that the cell wall of the mesophyll cell protrudes at the margin of the invaded site with the haustorial mother cell (arrows a). The cell wall of penetration peg is higher in electron density than the host cell wall, but the border between penetration peg and host cell wall is unclear (arrow b). The host plasma membrane is invaginated along the haustorial neck. $\times 111,000$.

Plate III

Figs. 16-19: Scanning electron micrographs of haustoria.

Fig. 16: Long-ovoid body and tubular neck of haustorium. Note that the haustorial body hangs horizontally from the haustorial neck. The neckband on the haustorial neck is protruded and round. Host mitochondria and tubular structures adhere to the haustorial body. Sample 1. $\times 8,900$.

Fig. 17: A cross-fractured haustorium in a mesophyll cell. Note that the tubular structure of the mesophyll cell is observed between the haustorial cell wall and host tonoplast, but extrahaustorial membrane seen in the transmission electron micrograph cannot be seen. Sample 1. $\times 17,500$.

Fig. 18: A host cell nucleus adjacent to a haustorium. Note the tubular structure connecting the nucleus and haustorium. The haustorial body hangs vertically from the haustorial neck and host mitochondria are on its surface. Sample 1. $\times 4,400$.

Fig. 19: A transmission electron micrograph of extrahaustorial matrix outside of the haustorial cell wall. Note that the fibrous structures of the haustorial cell wall are fused with the extrahaustorial membrane in the extrahaustorial matrix. The invaginated extrahaustorial membrane touches the haustorial cell wall (arrows) and host endoplasmic reticulum connect with the extrahaustorial membrane. $\times 25,000$.

Plate I

Plate II

Plate III