

琉球大学学術リポジトリ

イシサンゴにおける組織適合性の発現とその遺伝的制御

| | |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: 出版者: 日高道雄 公開日: 2009-07-27 キーワード (Ja): 組織適合性, イシサンゴ, キメラ, アロザイム, 自他認識, 刺胞動物, サンゴ キーワード (En): ALLOZYME, CHIMERA, HISTOCOMPATIBILITY, CORALS 作成者: 日高, 道雄, Hidaka, Michio メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/20.500.12000/11488 |

目的

海産の無脊椎動物には無性生殖により群体を形成するものが多い。単体性の動物は一般的には他固体と癒合することはないが、群体性動物は同種のもう一つの群体と癒合することがあるという点で、単体性の動物と異なる。イシサンゴでは、アロザイムの電気泳動パターンが異なる群体同士でも癒合する場合があることが知られている(e.g., Heyward and Stoddart, 1985)。またハナヤサイサンゴでは、互いに組織非適合を示す2つの群体から採取したプラヌラを、定着したばかりの早い時期に接触させると癒合してしまうことが知られている(Hidaka, 1985a)。しかし、遺伝的に異なる群体同士の癒合によって生じたキメラ群体がどのような性質を示すのかについてはほとんど研究されていない。

群体性のホヤである *Botryllus schlosseri* では、組織適合性を支配する対立遺伝子のうち1つが同じならば、遺伝的に異なる群体同士でも一時的に癒合することが知られている(Rinkevich and Weismann, 1989)。また、群体性ヒドロ虫の *Hydractinia* 属では、雄と雌の群体が癒合したキメラでは、性的に成熟したときに雄性配偶子だけが作られ、キメラ全体に雄性が広がるという報告がある(Buss and Shenk, 1990)。

遺伝的に異なるイシサンゴ群体同士が癒合することによって生じたキメラ群体は、将来どのようなようになるのだろうか。次の4つの場合が考えられる。(1) ある時期になると2つの群体に分離する。(2) 境界面で細胞の混合は起こらず、両群体は遺伝的差異を保持しながら共存する。(3) 境界面を越えて細胞の混合が起こり、両群体の中間的な遺伝子型をもつキメラ群体が生じる。

(4) キメラ群体を構成する一方の群体が他方を吸収し、一方の遺伝子型のみを示す群体となる。これら4つの仮説のどれが正しいのかを調べるためには、アロザイムの電気泳動法が有効である。つまり、異なるアロザイムパターンを示しながら癒合する群体を見つけだし、それらの群体のアロザイムパターンと癒合によって生じたキメラ群体の示すアロザイムパターンを比べればよい。

本研究では、イシサンゴのキメラ群体の性質を調べるために以下の研究を行った。(1) アザミサンゴの4つの色彩変異型を用いて接触実験を行い、キメラ群体を得ることを試みた。(2) 癒合したと思われるペアーについて、骨格まで癒合しているかどうかを走査電子顕微鏡により確かめた。(3) 組織適合性反応、覆いかぶせ(overgrowth)、スーパー触手の形成などに着目して、接触させたペアーを長期間観察し、さらに刺胞射出反応の有無と組織適合性反応との関係について調べた。(4) サンゴ自身の酵素とサンゴ体内に共生する共生藻の酵素の電気泳動パターンを区別することを試みた。(5) 以上の結果に基づき、キメラ群体を構成する2つの群体で、異なる電気泳動パターンを示す酵素を見つけ、キメラ群体の遺伝的組成を明らかにすることを試みた。

材料と方法

アザミサンゴ *Galaxea fascicularis* の4つの色彩変異型 (G t, ポリプは茶色で外側にのびる触手が緑色; G s, セプタ上の触手のみが明るい緑色; B, ポリプ全体が淡い茶色; B Y, 全体的に茶色だが口の周りが黄色) に属する群体を瀬底島の琉球大学熱帯海洋科学センター前のリーフより採集し、材料とした。B Y以外の色彩変異型はHidaka and Yamazato (1985) に記載されている。

(1) 接触実験

各色彩変異型について3群体の計12群体を用い、それぞれの群体が他のすべての群体と組み合わせるように、全部で66通りの組み合わせについて接触実験を行った。異なる群体より単離した2つのポリプを、スライドグラス上で互いに側壁が接触するように輪ゴムで固定した。各組み合わせについてこのようなポリプペアを3セット作った。これらのペアを、熱帯海洋科学センターのサンゴ飼育水槽中で、約2cm間隔で水平に並べて飼育した。接触反応は、随時実体顕微鏡下で観察し、写真撮影を行った。

(2) 接触部骨格の観察

接触実験で観察された3つの接触反応(癒合、非癒合、非適合癒合)を示すポリプペアの接触部の骨格を走査電子顕微鏡(日立S-530)で観察した。各接触反応について3~4ペアをサンプルし、10%ハイターで組織を溶かし、骨格の試料を作成した。

(3) 刺胞射出反応組織適合性反応

組織適合性反応における自他識別と刺胞射出反応における自他識別の関係を調べるため、接触実験に用いた12群体を材料として互いに刺胞を射出し合うかどうかを調べた。刺激として用いたポリプの側壁に、反应用ポリプの触手先端を約1秒間接触させた後徐々に遠ざけた。この時触手先端が刺激用ポリプに粘着すれば、刺胞が射出したとした(Lubbock, 1980; Ertman and Davenport, 1981; Hidaka and Miyazaki, 1984)。最低3本の触手が粘着した場合刺胞射出有りと判定し、少なくとも5本の触手で粘着がみられない場合を刺胞射出無しとした。

(4) サンゴと共生藻の酵素の電気泳動パターンの区別

アザミサンゴの単離ポリプを液体窒素に約5秒間つけて凍結した後、ポリプの上半分をペンチで切り取り、氷上に置いた呈色板上にとる。抽出液(0.1ml mercaptoethanol, 10g sucrose, 25mg NADP in 100ml distilled water)(Stoddart, 1983) 3~5滴を加え、ホモジナイズした。試料を遠心(12,000rpm、10分、4°C)し、上清を濾紙にしみこませて水平式デンブ電気泳動にかけた。

上記の方法で得られた電気泳動パターンが、サンゴ体内に共生する共生藻の酵素に由来するのではないことを示すため、下記の実験を行った。先ず単離したポリプを1カ月間暗黒下、流海水中で飼育し、共生藻密度の低いポリプを作り、上と同様の方法で電気泳動にかけ、バンドが薄くなるかどうかを調べた。

次に、アザミサンゴのポリプより、ウオーターピックにより組織をはがしとり、ホモジナイズした後遠心により共生藻を集めた。単離した共生藻を冷濾過海水により3回洗浄した後、ペレットに抽出液3滴を加え、冷やしながら超音波破碎した。試料を遠心し、上清を電気泳動にかけ、サンゴの抽出液のバンドパターンと比較した。

(5) 接触実験に用いた群体のアロザイムパターン

今回接触実験に用いた12群体のすべてについて、18種類の酵素について染色を試みた。電気泳動に用いた緩衝液、染色を試みた酵素を表1に示す。電気泳動の方法および染色法は、Murphy et al (1990)によった。ただしGPIの染色法はNichols and Ruddle (1973)によった。

結果および考察

(1) 接触実験

アザミサンゴの4つの色彩変異型に属する群体間の接触反応には、癒合、非癒合、非適合癒合の3種の反応が見られた(表2)。各組合わせについてそれぞれ3ペア作成したが、同じ組み合わせでは3例とも同じ接触反応を示した。BYを除いて、同じ色彩変異型に属する群体同士は常に癒合した。異なる色彩変異型に属する群体同士は、少数の例外を除いて非癒合を示した。例外としてBに属する群体とBY2群体とは癒合した。またGtとGsの群体同士は、組織は癒合しているものの、境界部に白い筋のはいる反応を示した。今回この反応を非適合癒合と呼ぶこととした。

癒合したポリプペアは、成長した共肉部から多数のポリプが出芽して1つの群体のようになり、もとの境界線がどこであったかわからなくなった(Fig. 1)。色彩の異なるポリプ同士が癒合した場合には、群体内の一部の領域には一方の色彩のポリプのみが見られ、他の領域には他方の色彩のポリプが見られた。このように明確な境界線はないものの、キメラを構成するもとの群体の占めるおよその範囲を色彩によって知ることが可能である。また、少数ではあるが、出芽によって生じた若いポリプの色彩が中央を境に異なっている例も観察された。

非癒合のペアでは、最初境界部に骨格の壁が垂直に形成される(Fig.2A)。しかしこの壁は通常ペアの一方に向かって伸びはじめ、一方の群体が他方を覆いかぶせる結果となる(Fig.2B, C)。覆いかぶせが見られる場合は、同じ組み合わせでは3例とも同じ群体由来のポリプが他方を覆いかぶせた。従って覆いかぶせには優劣の序列があると考えられる。

非適合癒合を示したGsとGtのペアでは、境界部に白い線が

(2) 組織適合性反応、刺胞射出反応、スーパー触手形成の関係

同じ色彩変異型に属する群体間では、刺胞射出反応は起こらなかった。異なる色彩変異型に属する群体間では、互いに刺胞を射出する場合としない場合とが見られた(表3)。GsとGtの群体同士、BとBYの群体同士は互いに刺胞を射出しなかった。

癒合、非適合癒合の組み合わせでは、刺胞射出は起こらず、非癒合の場合には、刺胞射出の起こる組み合わせと起こらない組み合わせのあることが分かった。このことは、組織適合性反応の奉加しほう射出反応よりも感度が高いことを意味し、Hidaka (1985b)の報告と一致する。

スィーパー触手は、癒合、非適合癒合を示すペアーでは形成されなかった。非癒合を示すペアーでは、多くの場合スィーパー触手が形成された。互いに刺胞を射出しないペアーでも、スィーパー触手が形成される場合があった。

(3) 境界部骨格の走査電子顕微鏡による観察

癒合および非適合癒合を示すペアーでは、骨格も癒合していた(Figs. 4, 5)。癒合、非適合癒合のどちらのペアーにおいても接触させた2つのポリプの側壁の骨格は、境界部で連続しており、fasciculusからなる表面構造を示した。境界部のポリプ基部に近い部分では、共同骨格の特徴である泡状の骨格が、2つのポリプの間の窪みを埋めるように形成された(Figs. 4, 5)。

非癒合のポリプペアーでは、境界部に最初垂直な隆起ができる。この隆起の先端を実体顕微鏡で観察すると、両方の群体の組織が接触している。ピンセットで両方の群体の組織を引き離すと、間にある骨格の壁が見えてくる(Fig. 6)。このような骨格の壁を走査電子顕微鏡で見ると、少なくとも先端部では1枚の壁のように見える(Fig. 7A)。この骨格の壁先端部は、成長速度の速い方の群体により分泌されたと考えられる。すなわちこの段階でも、成長の早い群体が他方を覆いかぶせ始めているためと考えられる。しかし両ポリプが接触した当初は、両方の群体がそれぞれ反対側から炭酸カルシウムを分泌して骨格の壁を形成していたと考えられる。実際に、両方の群体の分泌した骨格が離れている場合も観察された。また骨格の壁の基部の断面は結晶の配列の異なる2層からなっているように見える(Fig. 7B)が、このことも両方の群体が互いに間に骨格を分泌して1枚の壁を形成していることを示唆している。

境界部の骨格の壁の成長端では、隔壁先端などの非常に早く成長している部分にのみ見られる紡錘形の結晶が見られる(Fig. 7A)。他の共同骨格周辺部ではこのような紡錘形結晶は見られず、境界部の骨格の壁の成長端では、他の共同骨格周辺部に比べて骨格形成が活発であることを示している。

(4) サンゴと共生藻の酵素の電気泳動パターン

暗黒下で3週間飼育したアザミサンゴのポリプでは、共生藻密度が $0.27 \times 10^6/\text{cm}^2$ と自然光下で飼育したポリプの共生藻密度 $1.3 \times 10^6/\text{cm}^2$ の5分の1に減少していた (t-検定、 $p < 0.005$)。暗黒下で1カ月間飼育した白化ポリプと通常のポリプを同じように処理して電気泳動にかけ、ロイシルアラニルペプチダーゼの染色を行った。その結果バンドの濃さは、白化ポリプと通常ポリプとで変わりなかった。グリシルロイシルペプチダーゼやエステラーゼでも同様な結果が得られた(Fig. 8A)。もしこれらのバンドが共生藻の酵素に由来するものならば、白化ポリプのバンドは薄くなると予想される。しかしそのようなことはなかったので、検出されたバンドはサンゴの酵素に由来するものと考えられる。

Table 1. List of enzymes and buffers used for electrophoresis.

| 酵素名 | 略称 | E. C. no. | bandとbuffer |
|---------------------------------|------|--------------|---------------|
| LEU-TYR Peptidase | LTP | 3. 4. -.- | ○ A |
| LEU-VAL Peptidase | LVP | 3. 4. -.- | ○ A |
| LEU-PRO Peptidase | LPP | 3. 4. -.- | ○ C, ○ B |
| LEU-ALA Peptidase | LAP | 3. 4. -.- | ◎ C |
| GLY-LEU Peptidase | GLP | 3. 4. -.- | ○ C, ○ B |
| LEU-PHE Peptidase | LPhP | 3. 4. -.- | ○ C, ○ B |
| LEU-LEU-LEU Peptidase | LLLp | 3. 4. -.- | ○ C, ○ B |
| Purine-nucleoside-Phosphorylase | NP | 2. 4. 2. 1 | ○ C, △ A |
| Glucose-6-phosphate Isomerase | GPI | 5. 3. 1. 9 | △ (A=B=C) |
| Esterase(Nonspecific) | EST | 3. 1. 1. - | △ (C>B) |
| LEU-GLY-GLY Peptidase | LGGP | 3. 4. -.- | × (A, C) |
| Superoxide Dismutase | SOD | 1. 15. 1. 1 | × (A, C) |
| Malate Dehydrogenase | MDH | 1. 1. 1. 37 | × (A, B, C) |
| Glutamate Dehydrogenase | GDH | 1. 4. 1. 3 | × (A, B) |
| Phosphoglucomutase | PGM | 5. 4. 2. 2 | × (B, C) |
| Mannose-6-phosphate Isomerase | MPI | 5. 3. 8. 1 | × (A, B) |
| Phosphogluconate Dehydrogenase | PGDH | 1. 1. 1. 44 | × (B) |
| Xanthine Dehydrogenase | XDH | 1. 1. 1. 204 | × (C) |

buffer system A: Tris-borate-EDTA I, B: Tris citrate I,
 C: Tris-HCl(不連続系)

◎:多型がでた, ○:解釈可能なバンドがでたが多型はでなかった(結果のよいbufferの順に並べた), △:バンドは現れるが解釈できない [()内には試みたbufferについて、結果が同じ場合は=, 優劣がある場合は(優>劣)のように>で示した], ×:バンドが薄すぎるか全く現れない.

Table 2. Results of contact experiments between polyps isolated from colonies of various color morphs.

| | Gt1 | Gt2 | Gt3 | Gs1 | Gs2 | Gs3 | B1 | B2 | B3 | BY1 | BY2 | BY3 |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gt1 | | ○ | ○ | △ | △ | △ | × → | × → | × → | × → | × → | × → |
| Gt2 | | | ○ | △ | △ | △ | × → | × → | × → | × → | × → | × → |
| Gt3 | | | | △ | △ | △ | × → | × → | × → | × → | × → | × → |
| Gs1 | | | | | ○ | ○ | × → | × → | × → | × → | × → | × → |
| Gs2 | | | | | | ○ | × → | × → | × → | × → | × → | × → |
| Gs3 | | | | | | | × → | × → | × → | × → | × → | × → |
| B1 | | | | | | | | ○ | ○ | × → | ○ | × → |
| B2 | | | | | | | | | ○ | × → | ○ | × → |
| B3 | | | | | | | | | | × → | ○ | × → |
| BY1 | | | | | | | | | | | × → | × → |
| BY2 | | | | | | | | | | | | × → |
| BY3 | | | | | | | | | | | | |

○, Fusion; △, Incompatible fusion; ×, Non-fusion. Arrows(→) mean that colonies in the vertical column overgrew colonies in the horizontal column. The equality sign indicates filling.

Table 3. Nematocyst discharge responses between polyps of *Galaxea fascicularis* used for the contact experiments.

| 反応用 ポリブ | 刺激用ポリブ | | | | | | | | | | | |
|------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|------|------|------|
| | G t 1 | G t 2 | G t 3 | G s 1 | G s 2 | G s 3 | B 1 | B 2 | B 3 | BY 1 | BY 2 | BY 3 |
| G t 1 | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| G t 2 | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| G t 3 | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| G s 1 | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| G s 2 | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| G s 3 | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| B 1 | + | ± | + | + | ± | + | - | - | - | - | - | - |
| B 2 | + | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| B 3 | + | + | + | + | ± | + | - | - | - | - | - | - |
| BY 1 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| BY 2 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| BY 3 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |

刺激用ポリブの側壁を反応用ポリブの触手に接触させた後、遠ざけ、触手が側壁に付着するかしないかを観察した。反応用ポリブの少なくとも異なる3本の触手が相手に強く付着した場合を+、少なくとも5本の触手が相手に付着しなかった場合を-、触手の相手に対する反応が弱いために付着しているのか判断がつかない場合を±とした。G s 2のコロニーについては、接触実験においてovergrowthで勝ち残った小さなポリブを代わりに用いた。



A



B



C

Fig. 1. Fusion between polyps isolated from different colonies. A, fusion of polyps isolated from B1 and B3 colonies. 85 days after setting. X2. B, interface region of fused polyps. The polyps were isolated from B3 (left) and BY2 (right) colonies. 50 days after setting. X10. C, an enlarged view of B. X10.

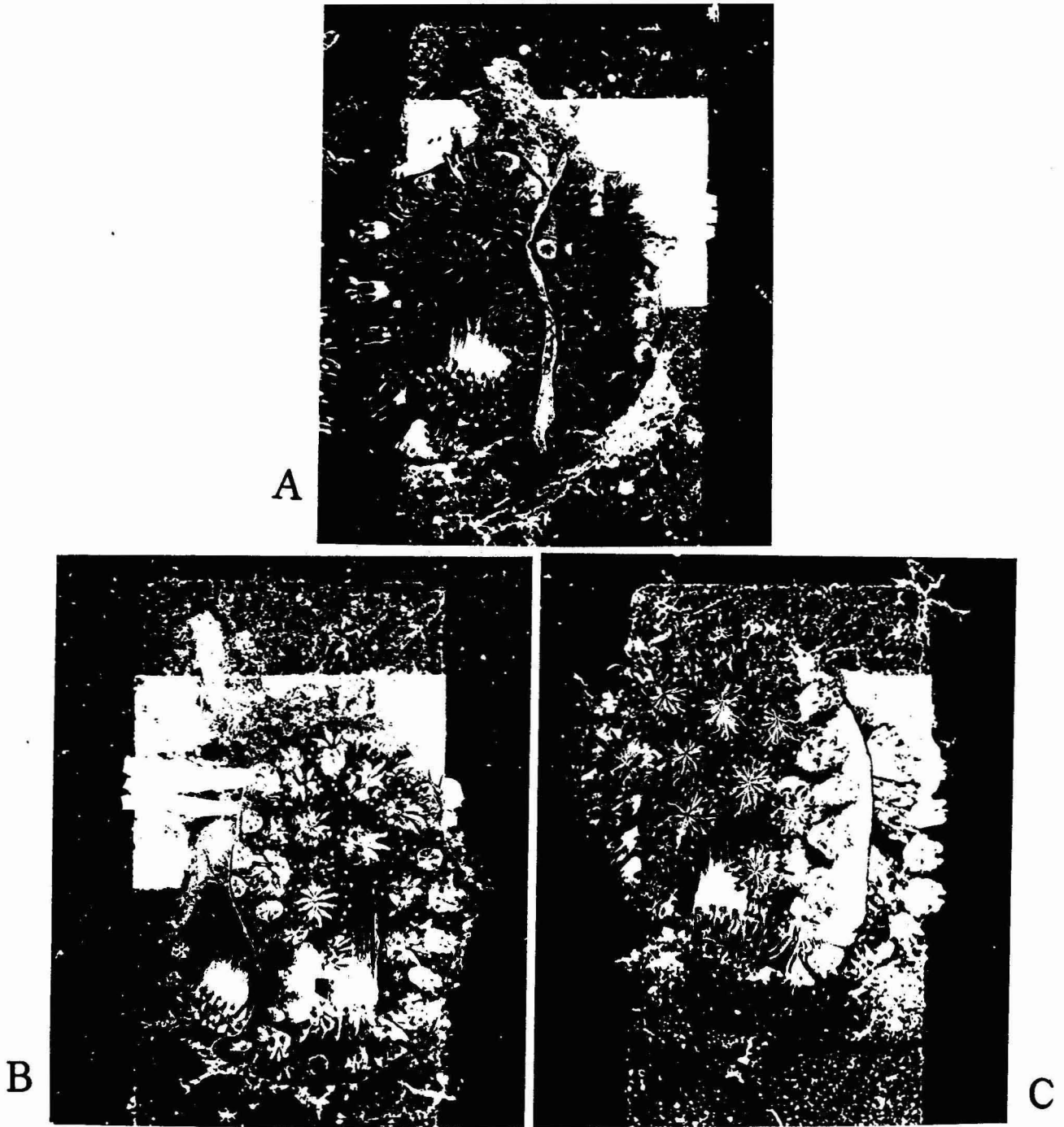


Fig. 2. Non-fusion responses between polyps isolated from different colonies. A, Filling response between polyps isolated from Gt3 and BY3 colonies. A vertical skeletal ridge was formed at the interface. B, Overgrowth response. BY3 colony (right) overgrew B2 colony. C, Overgrowth response. B3 colony (left) overgrew BY1 colony. All photographs were taken 79 days after setting. X2.



A



B



C

Fig. 3. Incompatible fusion between polyps isolated from colonies belonging to Gs and Gt color morphs. **A**, Incompatible fusion between Gt2 (left) and Gs2 (right) colonies. The chimeric colony was divided by a white line into two regions. Young polyps in each region have a color pattern characteristic to the original isolated polyp. **B**, interface region of a pair (Gt3-Gs2) showing incompatible fusion. X10. **C**, An enlarged view of **B**. X15. Note that no or only a few zooxanthellae are observed in the white zone.



Fig. 4. Scanning electron micrographs of the skeleton of a polyp pair (B2-B3) that showed fusion response. Skeletons of the paired polyps fused and vesicular exothecal dissepiments characteristic to coenosteum of *Galaxea fascicularis* were formed at the interface region. 35 days after setting.



Fig. 5. Scanning electron micrographs of the skeleton of a polyp pair (Gt1-Gs1) that showed incompatible fusion response. Skeletons of the paired polyps fused and vesicular exothecal dissepiments were formed at the interface region as in fused pairs. **A**, 35 days after setting. **B**, 45 days after setting.

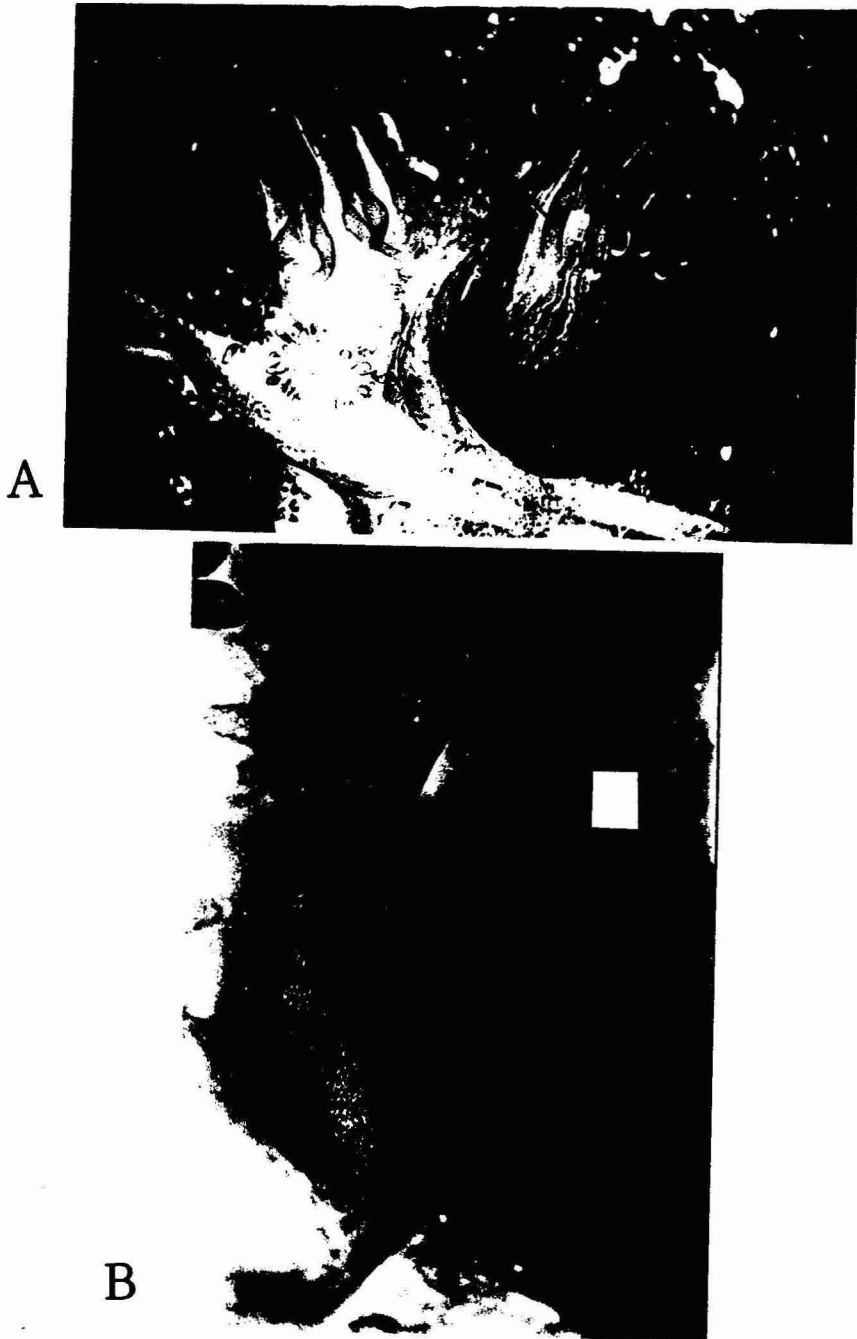


Fig. 6. Contact zone of a non-fused pair. A, a non-fused pair (B2-BY1) with a skeletal ridge at the interface. 35 days after setting. B, an enlarged view of the contact zone of the pair shown in A. Growing margins of both tissues appeared to touch each other. If the tissues were gently separated with forceps, a skeletal ridge was observed at the interface of the tissues.

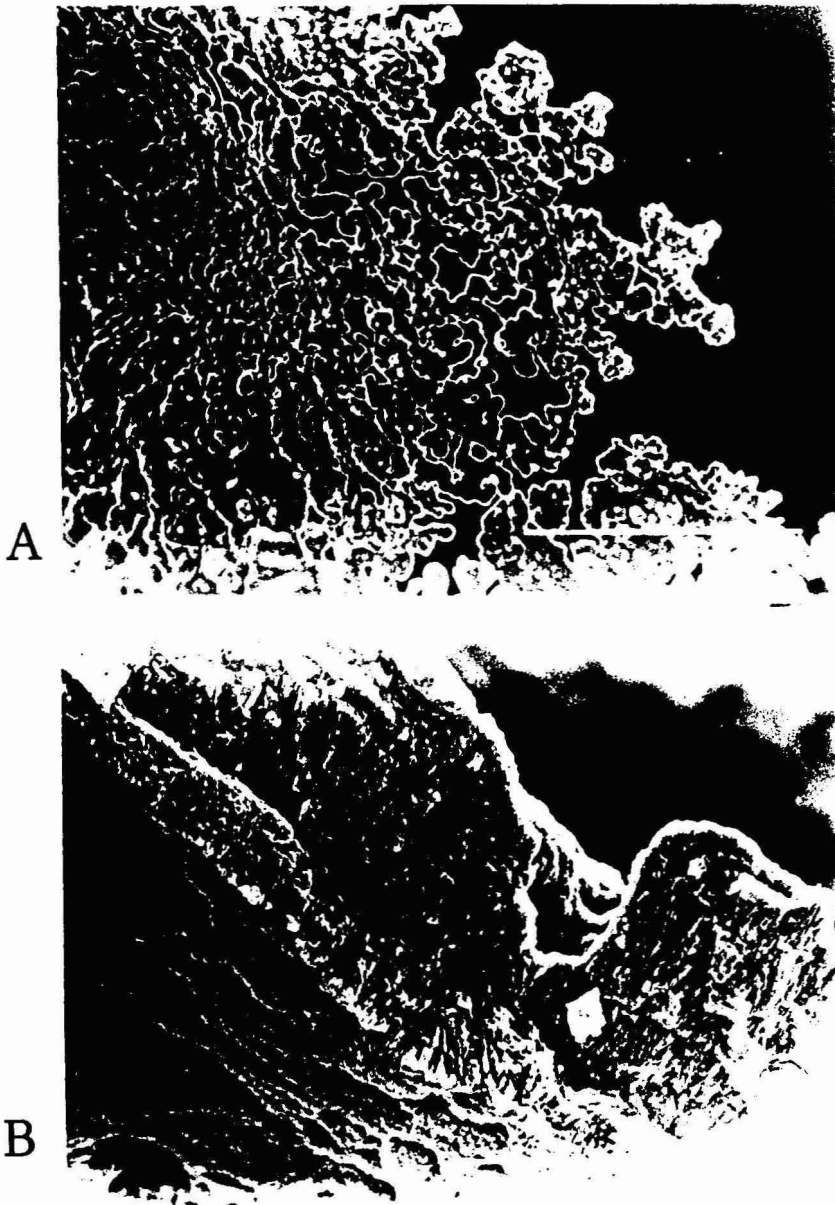


Fig. 7. Scanning electron micrographs of the skeletal ridge formed at the interface of a non-fused pair (B2-BY1). **A**, margin of the skeletal ridge. Fusiform crystals are deposited at the growing edge of the skeletal ridge to form a thin, fenestrated skeletal plate. This indicates that active calcification occurs at edges of the skeletal ridge. **B**, broken surface of a skeletal ridge. The basal part of the skeletal ridge is composed of two layers of skeletons. This indicates that both of the paired polyps secrete calcium carbonate to form the skeletal ridge at the interface.

単離した共生藻を超音波処理し、電気泳動にかけ、グルコース6リン酸イソメラーゼの染色を行ったところ、サンゴのバンドとは異なる位置にバンドが出現した(Fig. 8B)。単離した共生藻を超音波処理すると抽出液の色が褐色になるが、超音波処理により共生藻の細胞壁が破壊され、内部の光合成色素が漏れ出るためと思われる。共生藻の酵素も同様に、超音波処理して初めて抽出されると考えられる。これらの結果から、今回用いたホモゲナイズの方法では、共生藻の酵素は抽出されず、サンゴの酵素のみが抽出されたと考えられる。

(5) 接触実験に用いた群体の電気泳動パターン

今回接触実験に用いた12群体について、18種類の酵素について電気泳動パターンを得ることを試みた。染色を試みた18種の酵素のうち、解釈可能なバンドが得られたのはLTP、LVP、LPP、LAP、GLP、LPhP、LLP、NPの8酵素であった。LAPでは、BY3がヘテロ、他の11群体がホモのパターンを示した(Fig. 9A)。しかし他の7酵素では、12群体とも同じホモのパターンを示した(Fig. 9B, C, D)。したがって、キメラ群体の遺伝組成を調べるために使用可能な酵素を見つけることはできなかった。

もし、異なる電気泳動パターンを示す2群体が癒合または非適合癒合を示せば、得られたキメラ群体のいろいろな部位の電気泳動パターンを調べることにより、キメラ群体の性質を明らかにできたことと思われる。すなわち、最初に挙げたように、キメラ群体内で、キメラを構成するそれぞれの群体の細胞が混在するのか、分離共存しているのか、それとも競合し合うのかなどという興味深い問題を解明する糸口がつかめたことと思われる。

今後の課題としては、調べる酵素(遺伝子座)の数を増やすことによりキメラ群体を構成する群体間の遺伝的差異を検出することを試みる。またあらかじめ電気泳動パターンの違うことがわかっている群体を用いて接触実験を行いキメラ群体を得ることを試みる。さらに、遺伝的変異の検出感度の高い、DNAの塩基配列や、RFLPによるキメラ群体の遺伝的解析を試みたい。

謝辞

本研究を協同で行った大学院生の安富祖研君に感謝する。

引用文献

- Ertman SC and D Davenport (1981) Tentacular nematocyst discharge and "self-recognition" in *Anthopleura elegantissima* Brandt. Biol. Bull., 161: 366-370.
- Heyward AJ and JA Stoddart (1985) Genetic structure of two species of *Montipora* on a patch reef: conflicting results from electrophoresis and histocompatibility. Mar. Biol., 75: 117-122.
- Hidaka M (1985a) Tissue compatibility between colonies and between newly settled larvae of *Pocillopora damicornis*. Coral

- Reefs, 4: 111-116.
- Hidaka M (1985b) Nematocyst discharge, histoincompatibility, and the formation of sweeper tentacles in the coral *Galaxea fascicularis*. Biol. Bull., 168: 350-358.
- Hidaka M and I Miyazaki (1984) Nematocyst discharge and surface structure of the ordinary and sweeper tentacles of a scleractinian coral, *Galaxea fascicularis*. Galaxea, 3: 119-130.
- Hidaka M and K Yamazato (1985) Color morphs of *Galaxea fascicularis* found in the reef around the Sesoko Marine Science Center. Galaxea, 4: 33-35.
- Lubbock R (1980) Clone-specific cellular recognition in a sea anemone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 6667-6669.
- Murphy RW, Sites JW, Buth Jr DG and CH Haufler (1990) Proteins 1: Isozyme electrophoresis. In: Hillis DM and C Morits (eds) Molecular Systematics. Sinauer Associates Inc., pp45-126.
- Nichols EA and Ruddle FH (1973) A review of enzyme polymorphism, lineage and electrophoretic conditions for mouse and somatic cell hybrids in starch gels. J. Histochem. Cytochem., 21: 1066-1081.
- Rinkevich B and IL Weissman (1989) Variation in the outcomes following chimera formation in the colonial tunicate *Botryllus schlosseri*. Bull. Mar. Sci. 45: 213-227.
- Stoddart JA (1983) Asexual reproduction of planulae in the coral *Pocillopora damicornis*. Mar. Biol., 76: 279-284.

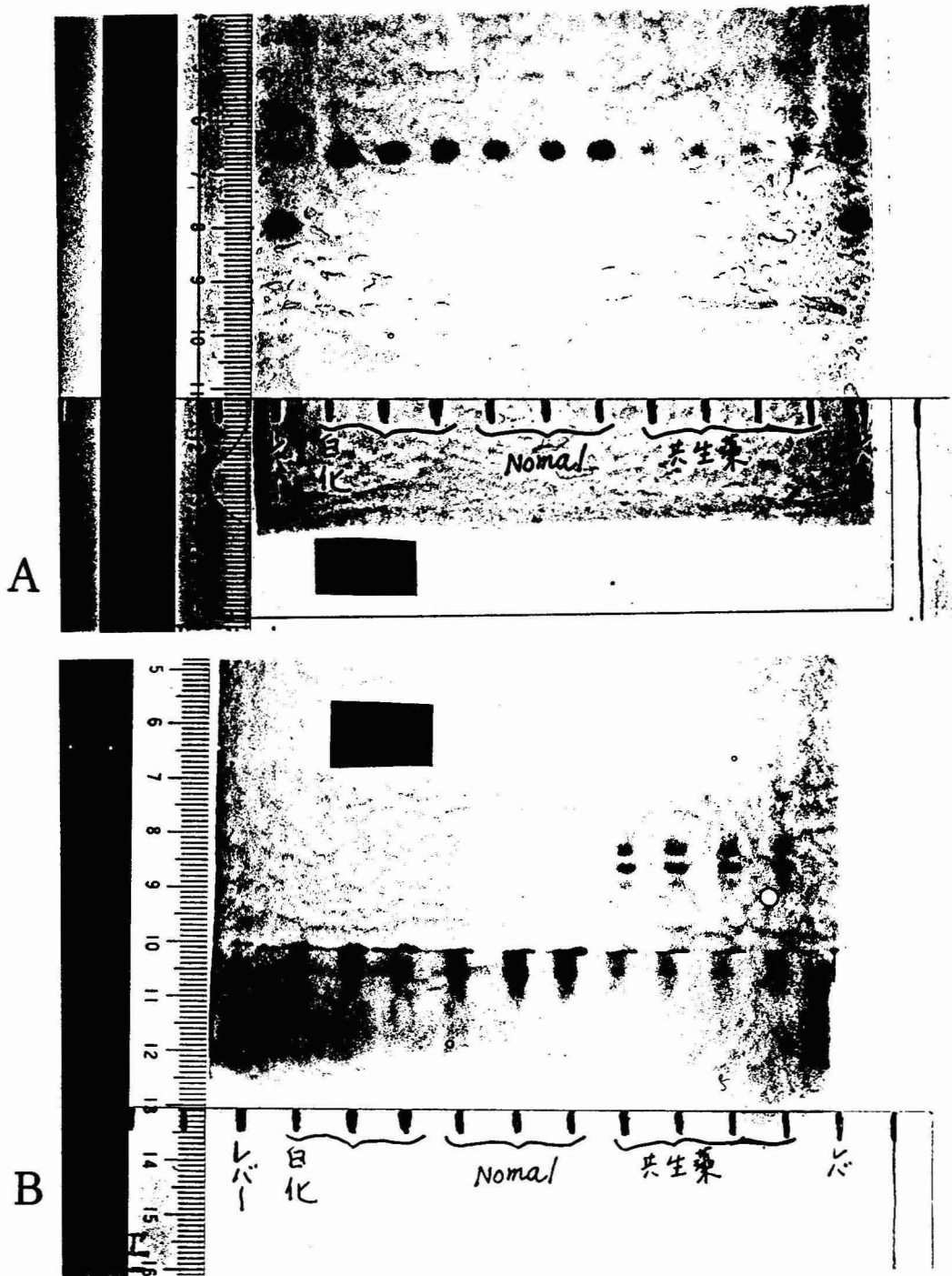


Fig. 8. Zymograms of a bleached polyp, a normal polyp and isolated zooxanthellae. A, Leucyl-alanine peptidase. B, Glucose-6-phosphate isomerase.

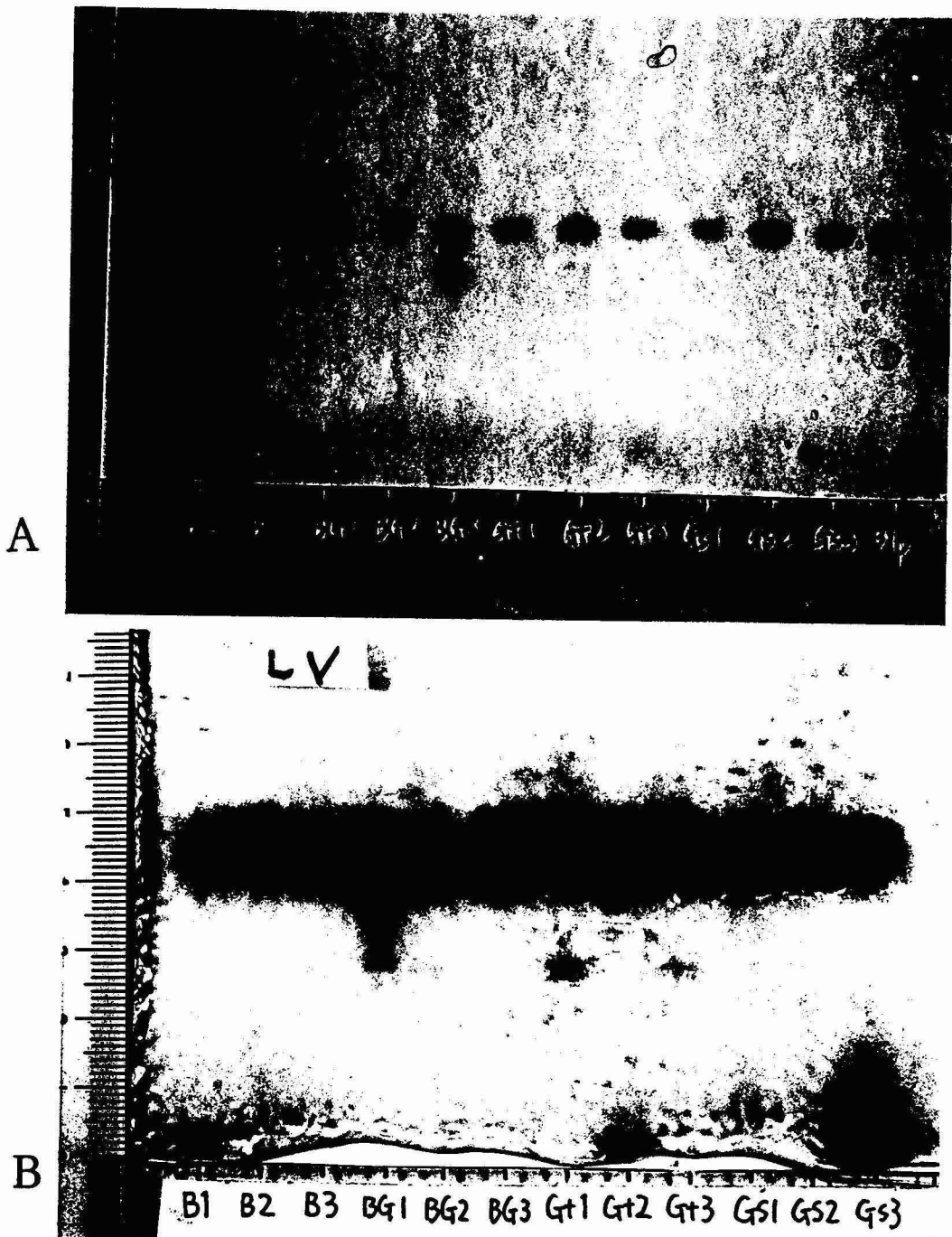


Fig. 9. Zymograms of tissue extract of *Galaxea cascicularis* colonies used for contact experiments. **A**, Leucyl-alanine peptidase. **B**, Leucyl-valine peptidase. **C**, Leucyl-tyrosine peptidase. **D**, Leucyl-glycine peptidase.

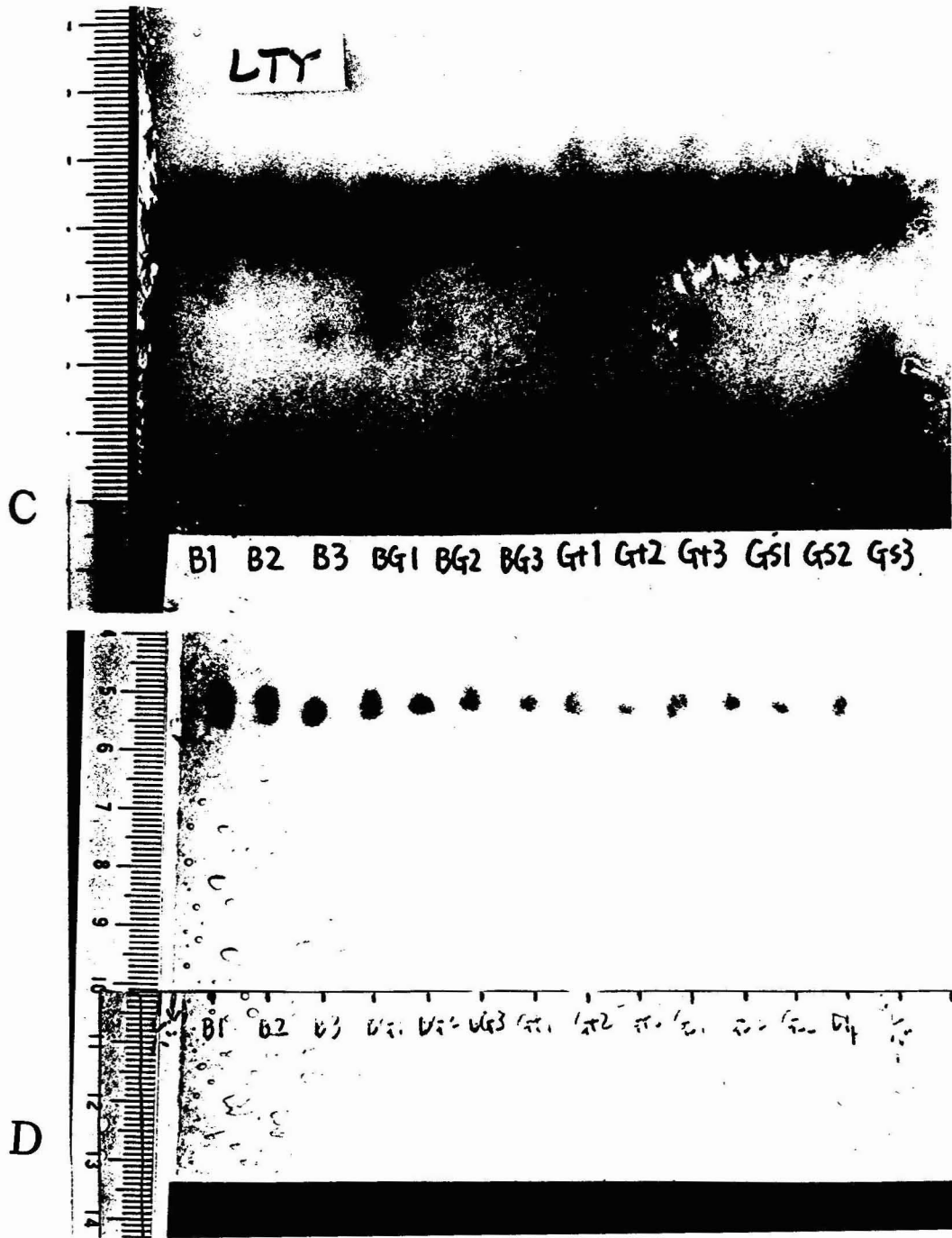


Fig. 9. Continued.