

## DADES ULTRASTRUCTURALS DE LES GLÀNDULES DE LA CLOSCA DE CHIROCEPHALUS DIAPHANUS (CRUSTACEA: PHYLLOPODA) \*

E. Ribes \*\*

Rebut: juliol 1981

### SUMMARY

#### Morphological study of the shell glands of *Chirocephalus diaphanus* (Crustacea: Phyllopoða)

Some morphological aspects of the shell glands of ***Chirocephalus diaphanus*** are described. These glands, which are of the acinous type and attached to the external wall of the uterus, are constituted by a great number of elementary glandular units formed by the juxtaposition of two big secretory cells. These, of about 55  $\mu\text{m}$  in diameter, present an ovoid nucleus whose diameter is approximately 20  $\mu\text{m}$  and contain several nucleoli and abundant evenly distributed chromatin. The position of the nucleus varies along the secreting cycle, being basal or central according to the load of secreting granuli contained in the cell. In the cytoplasm, particles of  $\beta$ -glycogen and a large amount of ribosomes are noticed, as well as a very well developed ergastoplasm and a considerable amount of secretion granules located in the apical area and originated mainly from the Golgian vesicles.

The intercellular space, situated amongst the apical walls of the cells that form each glandular unit, suffer important modifications during the secreting cycle. So when the cells are loaded with secretion granules, such intercellular space is very reduced and only from time to time some intercellular thickenings provided with microvilli, are noticed where the contents of the secretion granules are poured. These thickenings are preceded by junctional complexes formed by a zonula adhaerens followed by a septal junction.

Generally speaking we can say that the morphology of the shell gland of ***Chirocephalus diaphanus*** is similar to that presented by the shell gland of the rest of the Anostracan species studied.

\* Aquest treball va ésser exposat a la sessió científica ordinària de la ICHN celebrada el maig de 1981.

\*\* Departament de Morfologia Microscòpica. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Avgda. Diagonal, 645. Barcelona, 28.

## INTRODUCCIÓ

Els ous dels crustacis són protegits, habitualment, per una coberta formada per dos embolcalls: un d'extern o «closca» i un altre d'intern o «cutícula». L'embolcall extern és d'origen terciari, car es forma a partir de les secrecions emeses per unes formacions glandulars adossades a la cambra uterina: les glàndules de la closca. Mentre que l'embolcall intern és una formació d'origen blastodèrmic, que apareix enmig de la capa interna de la closca i la superfície dels blastòmers.

Els estudis més detallats dels embolcalls dels ous dels crustacis i de les formacions glandulars que els originen s'han realitzat principalment en les fillòpodes anostracis. Així, las glàndules de la closca s'han descrit a nivell del microscopi fotònic en diferents espècies de fillòpodes: *Chirocephalus diaphanus* (MAWSON & YONGE, 1938), *Chirocephalopsis bundyi* (LINDER, 1959), *Artemia salina* (FAUTREZ & FAUTREZ-FIRLEFYN, 1971). Tan sols dues espècies s'han observat a nivell ultrastructural: *Artemia salina* (ANDERSON *et al.*, 1970; DE MAYER CRIEL, 1973), *Tanymastix lacunae* (GARREAU DE LOUBRESSE, 1978). Aquest treball darrer és molt complet a nivell ultrastructural i autoradiogràfic de l'activitat cíclica de les glàndules de la closca.

Amb el present treball ultrastructural es pretén completar la imatge que MAWSON & YONGE (1938) donaren a nivell de microscòpia fotònica de les glàndules de la closca de *Chirocephalus diaphanus*.

## MATERIAL I TÈCNICA

S'han estudiat exemplars de femelles adultes de *Chirocephalus diaphanus* replegades a llacunes efímeres, de substrat torbós a 172 m d'altitud, a prop de la població de Campmany (Girona), els mesos de març i abril.

L'aparell genital de la femella de *Chirocephalus diaphanus* és format per dos ovaris subrectilinis, dos oviductes i un úter senar.

Els ovaris s'estenen lateralment pels costats del conducte digestiu, des del primer fins al darrer segment abdominal. Al nivell del segon segment abdominal cada ovari s'allarga lateralment i ventralment per un oviducte que acaba a l'úter senar. Les glàn-

dules de la closca es troben adossades externament a la paret de l'úter.

S'han extret, d'aquestes femelles adultes, per dissecció, les glàndules de la closca i s'han fixat per immersió dins la mescla paraformaldehid al 2 % amb glutaraldehid al 2,5 %, en tampó de Sörensen a pH 7,3, a 4° C, per espai d'una hora. Després d'una postfixació d'una hora, amb tetraòxid d'osmi al 2 % en el mateix tampó i per mitjà d'una sèrie alcohòlica es deshidraten les glàndules i es tracten amb òxid de propilè, abans d'incloure-les en araldita.

Els talls semifins, per tal d'ésser observats al microscopi fotònic, es tenyiren amb blau de metilè (RICHARDSON, 1960). Els talls ultrafins per a microscòpia electrònica es contrastaren amb acetat d'uranil (WATSON, 1958) i, després d'una curosa neteja, es passà a un altre contrastament amb citrat de plom (REYNOLDS, 1963). Foren observats amb els microscopis de transmissió Philips EM-200 i EM-301 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona, treballant a 60 Kv.

## RESULTATS

### A) MICROSCÒPIA FOTÒNICA. MORFOLOGIA DE LES GLÀNDULES DE LA CLOSCA

Les glàndules de la closca són del tipus acínos i són formades per una gran quantitat d'unitats glandulars elementals. Dues grossíssimes cèl·lules secretores juxtaposades formen cada una de les unitats glandulars.

Les cèl·lules glandulars, les dimensions de les quals poden arribar a ser considerables (uns 55  $\mu\text{m}$ ), tenen un nucli en forma de ronyó, d'uns 20  $\mu\text{m}$  de diàmetre; la seva posició és variable mentre dura el cicle secretor i conté uns quants nuclèols. El citoplasma és vacuolitzat en gran mesura.

Les cèl·lules de cada unitat glandular estan acoblades per les seves cares apicals, les quals experimenten considerables modificacions morfològiques durant el procés de secreció. A la fase d'excreció, quan les cèl·lules estan ben carregades de grànuls de secreció, l'espai intercellular és molt reduït i les membranes plasmàtiques presenten unes interdigitacions que refor-

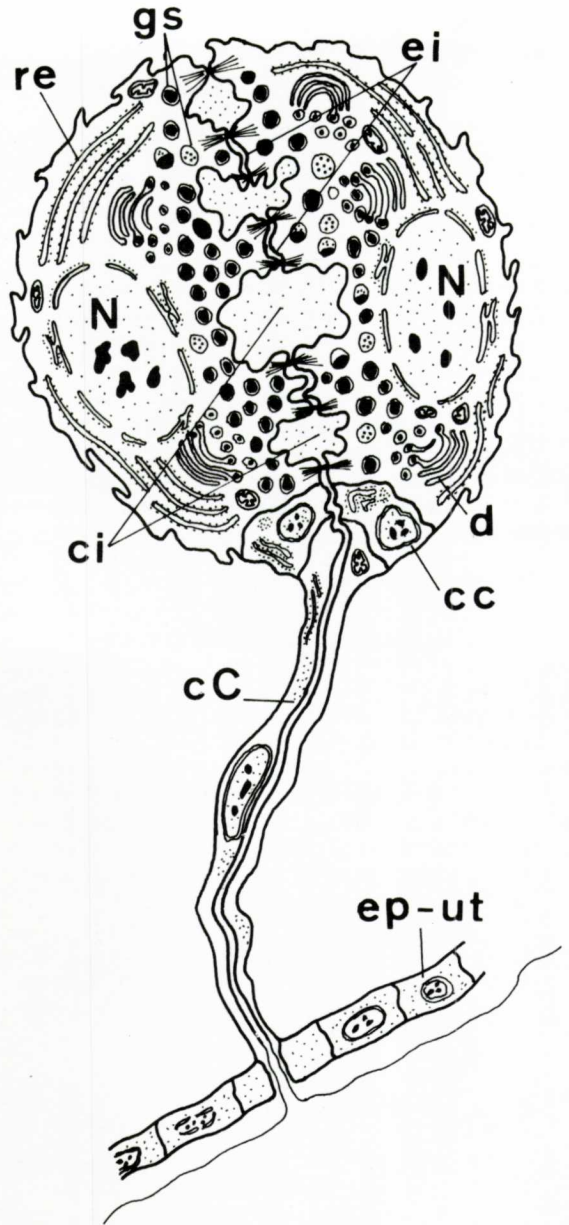
FIG. 1. Representació esquemàtica d'una unitat glandular.  
Diagram of a longitudinal cut of a glandular unit.

CLAU DE SÍMBOLS DE LES FIGURES

cC.	Conducte collector
cc.	Cèl·lula del coll
ch.	Cromatina
ci.	Canalicle intercellular
CS.	Cèl·lula secretora
cu.	Complex d'unió
d.	Dictiosoma
ei.	Espai intercellular
ep-ut.	Epiteli uterí
gs.	Grànul de secreció
m.	Mitocondri
N.	Nucli
nu.	Nuclèol.
re.	Ergastoplasma
us.	Unió septada
za.	Zonula adhaerens

SYMBOL KEY FOR THE FIGURES

cC.	Duct cell
cc.	Neck cell
ch.	Cromatin
ci.	Intercellular canaliculi (lumen)
CS.	Cells of the shell gland
cu.	Junctional complex
d.	Dictiosome
ei.	Intercellular space
ep-ut.	Uterine epithelium
gs.	Secretory granules
m.	Mitochondria
N.	Nucleus
nu.	Nucleolus
re.	Endoplasmic reticulum
us.	Septate junction
za.	Zonula adhaerens



cen la unió d'ambdues cèl·lules, tan sols de trast en trast s'observen uns eixamplaments que constitueixen els canalicles intercellulars, zones on es disposa el contingut dels grànuls de secreció.

Els canalicles intercel·lulars duen els productes de la secreció cap a un conducte collector principal de l'acinus glandular. Aquest conducte, el formen dues cèl·lules: una de petita, rodona, adossada a les cèl·lules secretores, que correspon a la «cèl·lula del coll», descrita per ANDERSON *et al.* (1970), a les glàndules de la closca d'*Artemia salina*, i una altra, de molt més allargada, d'uns 60  $\mu\text{m}$  de longitud, que quan s'invagina origina la major part del conducte collector (fig. 1).

Durant el cicle secretor, amb el microscopi fotogràfic s'aprecien o observen tres fases ben diferenciades: una fase de síntesi, on s'elaboren els grànuls de secreció, una altra fase d'excreció o de descàrrega i una darrera fase de transició entre dos cicles successius.

## B) MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA

### *La superfície cellular*

A la fase de síntesi, les membranes plasmàtiques, que delimiten l'espai intercellular d'una unitat glandular, estan fortament afegides i presenten un gran nombre d'interdigitacions. Al mateix temps, de trast en trast, s'observen unes dilatacions de l'espai intercellular proveïdes de *microvilli* (figs. 2, 3, 4). Aquestes regions dilatades són precedides de complexos d'unió constituïts per una *zonula adhaerens* seguida d'una unió septada (figs. 5, 6).

Durant la fase d'excreció s'observa un increment de la superfície de la membrana plasmàtica que limita les regions dilatades de l'espai intercellular (figs. 2, 3).

### *El nucli*

El nucli és gros, d'uns 20  $\mu\text{m}$  de diàmetre, ovoide o reniforme. La seva situació varia durant el cicle secretor, passant d'una posició central a una altra de basal, quan és desplaçat pels grànuls de secreció (fig. 7).

L'embolcall nuclear presenta nombrosos porus d'uns 600 a 700 Å de diàmetre. La seva membrana externa presenta, com és habitual, un gran nombre de ribosomes adherits a ella.

El nucli posseeix diversos nuclèols constituïts per una zona central, fibrosa, i una altra de perifèrica, granular, ben diferenciada; la cromatina és distribuïda homogeniament (fig. 8).

### *El reticle endoplasmàtic*

Per una part, el reticle endoplasmàtic lliu és poc desenvolupat, i l'ergastoplasma presenta un notable desenvolupament durant el cicle excretor; el que està situat al pol basal és constituït principalment per un conjunt de vesícules llargues i aplanades, a diferència del que està situat a la posició apical, que és format per vesícules curtes i rodones. En ambdós casos s'observa al seu interior un material filamentós (figs. 9, 10, 12).

En l'hialoplasma s'observa una gran quantitat de ribosomes lliures i nombroses partícules de  $\beta$ -glicogen.

### *Els mitocondris*

La majoria dels mitocondris són ovoides, de 0,8 a 1  $\mu\text{m}$  de diàmetre, i les seves crestes són orientades paral·lelament respecte a l'eix major de l'òrganul, encara que en d'altres l'orientació és irregular (figs. 7, 10, 12). A la fase de secreció s'observa un augment lleuger en el nombre de mitocondris.

### *L'aparell de Golgi*

En el citoplasma hi ha nombrosos dictiosomes dispersos. Durant el cicle secretor s'observa com l'aparell de Golgi canvia de situació a l'interior de la cèl·lula; així, a la fase de secreció els dictiosomes es troben perfectament a la zona perinuclear, formats per un conjunt de dues o tres cisternes corbades col·locades una damunt de l'altra; mentre que durant la fase d'excreció, els dictiosomes envaeixen la zona apical de la cèl·lula (figs. 10, 11, 12).

### *Els grànuls de secreció*

Els grànuls de secreció madurs, d'1,7 a 2  $\mu\text{m}$  de diàmetre, presenten una part central densa, més o menys homogènia, envoltada d'una zona perifèrica menys densa de textura grànulo-filamentosa limitada per una membrana (figs. 10, 13, 14). Al mateix temps, enmig dels grànuls de secreció madurs, existeixen uns altres grànuls de

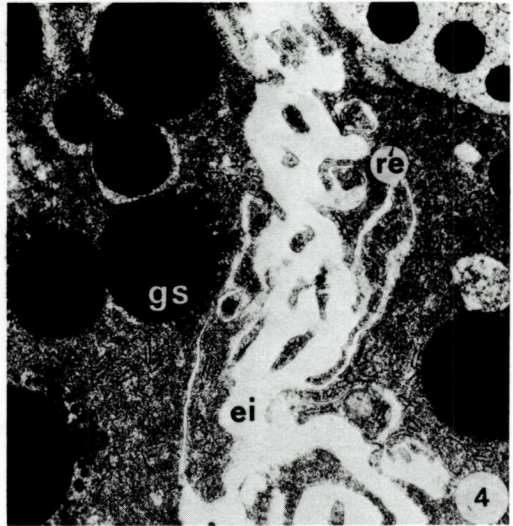
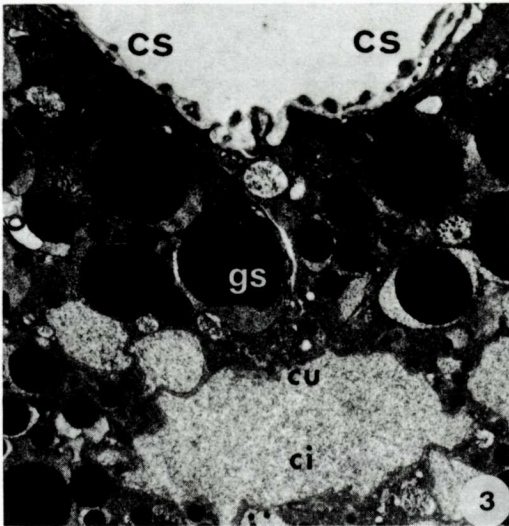
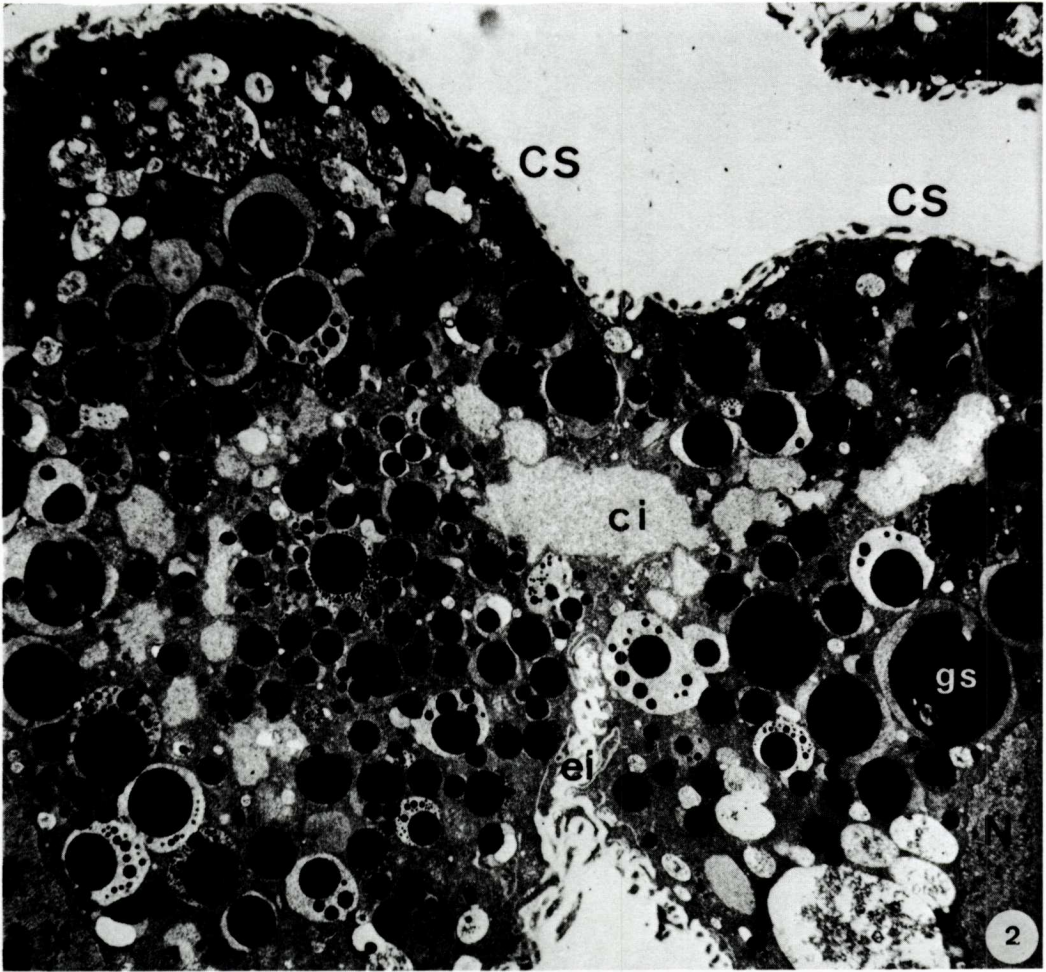


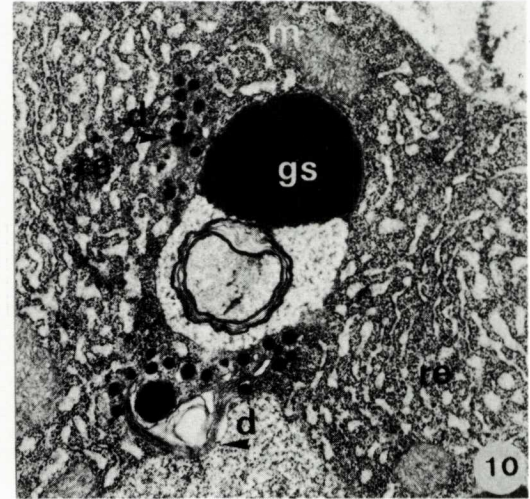
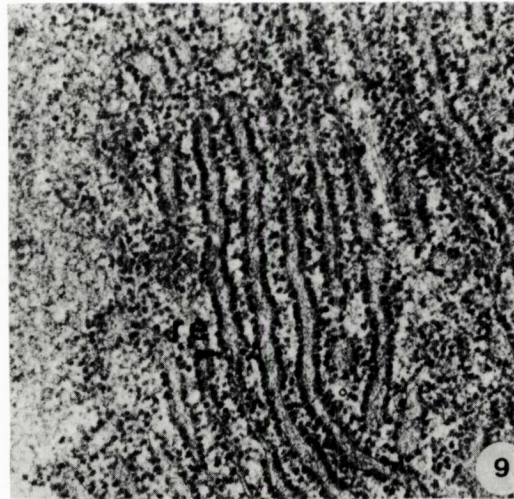
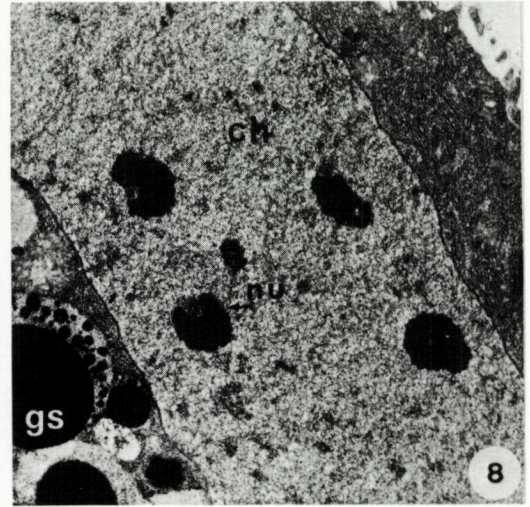
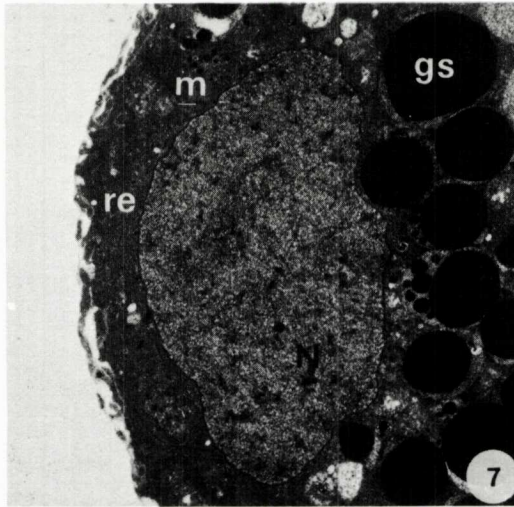
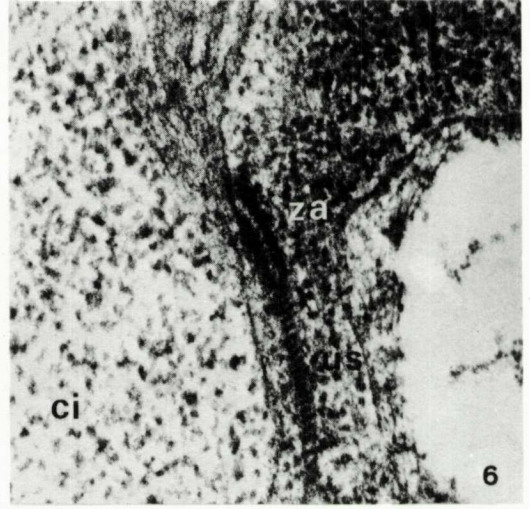
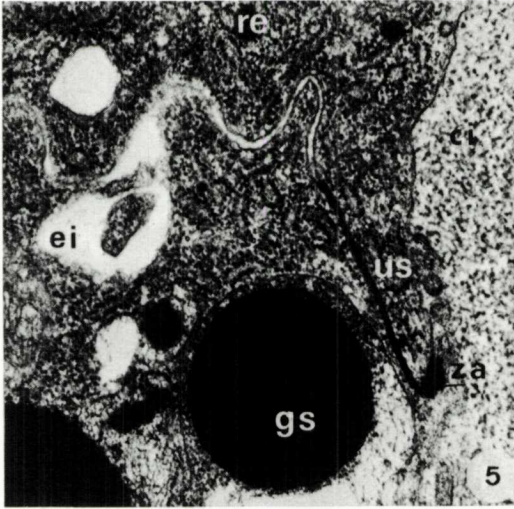
FIG. 2. Unitat glandular a l'inici de la fase d'excreció. Les dues cèl·lules secretores (CS), que constitueixen la unitat glandular, estan afegides per les seves cares apicals. Els grànuls de secreció s'acumulen, preferentment, a la zona apical de la cèl·lula i s'aboquen a l'espai intercellular. La part basal de les cèl·lules és ocupada pels respectius nuclis (3.360 x).

Glandular unit initiating the excretory phase. The two secreting cells constituting the gland unit are united by their apical walls. The secretion granules accumulate preferably in the apical area of the cell and will be poured into the intercellular space at the level of the intercellular canaliculi. The basal part of the cells is occupied by their respective nuclei (3.360 x).

FIGS. 3 i 4. Detalls de la part apical de les dues cèl·lules secretores d'una unitat glandular (fi. 3: 5.290 x; fig. 4: 12.420 x).

Detail of the apical part of the two secreting cells of the shell gland (fig. 3: 5.290 x; fig. 4: 12.420 x).





FIGS. 5 i 6. Detalls d'un complex d'unió. El complex d'unió és format per una *zonula adhaerens* que priva la claror del canalicle, seguida d'una unió septada (fig. 5: 25.760 x; fig. 6: 64.500 x). Detail of a junctional complex. The junctional complex is formed by a zonula adhaerens that closes the canalculus lumen followed by a septate junction (fig. 5: 25.760 x; fig. 6: 64.500 x).

FIG. 7. Part basal d'una cèl·lula secretora d'una unitat glandular (4.140 x). Basal part of a secreting cell of the shell gland (4.140 x).

FIG. 8. Detall del nucli. S'observa la presència de diversos nuclèols i la cromatina distribuïda homogèniament (6.670 x). Detail of the nucleus. Notice the presence of several nucleoli and the evenly distributed chromatin (6.670 x).

FIG. 9. Detall del citoplasma basal de la cèl·lula secretora. Es pot observar l'abundància d'ergastoplasma (48.500 x). Detail of the ergastoplasm distribution in the basal area of a secreting cell (48.500 x).

FIG. 10. Part basal d'una cèl·lula secretora. S'observa la presència de dictiosomes i de grànuls de secreció (13.500 x). Basal part of a secreting cell. Notice the presence of a dictiosome and the secretory granules (13.500 x).



secreció, la part central dels quals és formada per diverses masses denses (fig. 2). Aquests s'assemblen als «grans multigranulars» que DE MAEYER CRIEL (1973) va descriure a *Artemia salina*.

Segons les observacions realitzades, els grànuls de secreció s'originen, preferentment, a partir de les vesícules que es desprenen de la cara de maduració dels dictiosomes (figs. 10, 11, 12).

## CONCLUSIÓ I DISCUSSIÓ

La morfologia de les glàndules de la closca de *Chirocephalus diaphanus*, descrita a l'apartat anterior, es correspon amb la descripció realitzada per MAWSON & YANGE (1938) sobre la mateixa espècie. Al mateix temps, presenta nombroses analogies amb les glàndules de la closca d'*Artemia salina* (ANDERSON *et al.*, 1970; DE MAYER CRIEL, 1973), i amb les de *Tanymastix lacunae* (GARREAU DE LOUBRESSE, 1978). Però a *Artemia salina* s'han de diferenciar, segons DE MAYER CRIEL (1973) dos tipus: les glàndules de la closca «pigmentades», encarregades de secretar els elements necessa-

ris per a la formació de la closca, quan l'animal es troba a la fase ovípara; i les glàndules de la closca «blanques», els productes de secreció de les quals faciliten el desenvolupament dels nauplis a l'úter, el temps que l'animal és ovovivípar.

*Chirocephalus*, espècie ovípara, té un sol tipus de glàndules de la closca. El canvi de coloració que manifesten durant el temps del cicle excretor, es deu a variacions en el nombre de grànuls de secreció que contenen.

Les observacions realitzades manifesten que l'ultraestructura general de les cèl·lules secretores de les glàndules de la closca presenta, generalment, una gran semblança amb les cèl·lules de les glàndules de secreció proteínica, particularment amb la dels insectes: glàndules salivals, glàndules tegumentàries, glàndules sexuals annexes; o amb la dels vertebrats: glàndules mamàries, glàndules seroses com el pàncreas, la paròtida.

Les cèl·lules secretores de les glàndules de la closca, com les cèl·lules d'igual natura de les glàndules anomenades abans, es caracteritzen pel fet de presentar un reticle endoplasmàtic molt desenvolupat, un voluminós aparell de Golgi i gran nombre de grànuls de secreció.

La superfície cel·lular experimenta notables canvis morfològics durant el cicle excretor. A la fase de pre-excreció, l'espai intercel·lular presenta certes zones dilatades, proveïdes de *microvilli*, situació semblant a la que es produeix en els canalicles biliars (MATTER *et al.*, 1969). El temps que dura la fase d'excreció, la membrana dels grànuls de secreció es fusiona amb la membrana plasmàtica que limita les zones dilatades de l'espai intercel·lular, provocant un augment notable de la superfície.

La reabsorció de l'excés de membrana, principalment després de l'excreció, és un problema encara no resolt del tot. Sembla ésser que la reabsorció membranosa es realitza a nivell molecular (GARREAU DE LOUBRESSE, 1978); que llavors les proteïnes de la membrana deuen ésser destruïdes i els fosfolípids deuen passar al citoplasma. Per una altra banda, DE MAYER CRIEL (1970) diu que la superfície apical es retreu com a resultat de l'absorció de nombroses vesícules rugoses.

Les unions cel·lulars, descrites a les cèl·lules secretores de les glàndules de la closca de *Chirocephalus*, a nivell de canalicles intercel·lulars, no discrepen de les estudia-

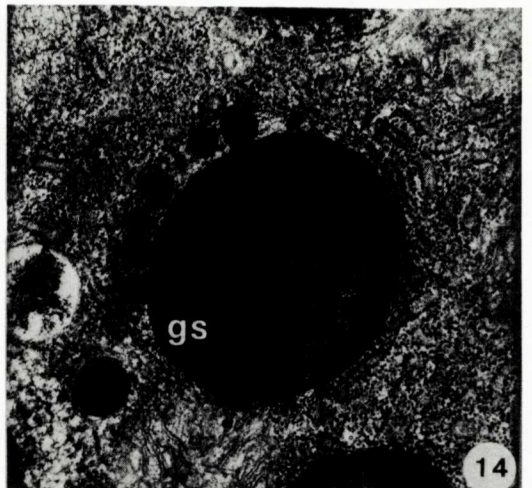
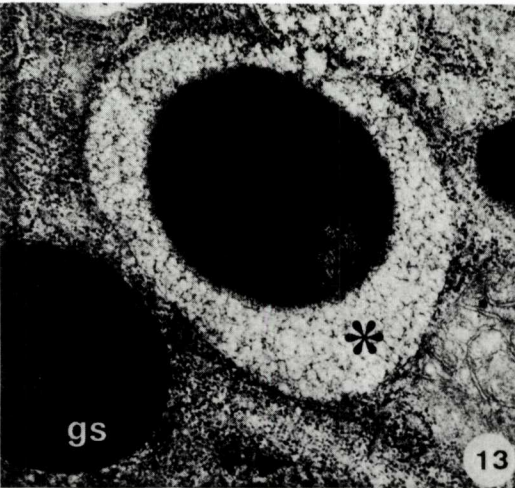
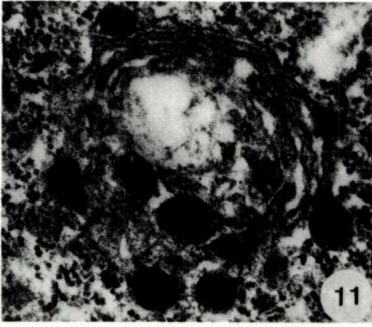




FIG. 11. Detall d'un dictiosoma mostrant la dilatació dels sàculs de la cara de formació (51.600 x). Detail of a dictiosome showing dilatation of the sacks on the formation side (51.600 x).

FIG. 12. Part basal d'una cèl·lula secretora. Complex de Golgi (31.200 x). Section through shell gland unit showing the Golgi complex (31.200 x).

FIGS. 13 i 14. Grànuls de secreció a diferents fases de maduració. Els grànuls madurs es componen d'una part central densa i homogènia, envoltada d'una zona perifèrica granulosa i menys densa (assenyalada amb l'asterisc) limitada, alhora, per una membrana (fletxa; 24.640 x). Secretory granules in different maturation phases. The mature granules are formed by a dense and homogenous central part surrounded by a peripheral granulous and less dense area (asterisc) limited by a membrane (arrow; 24.640 x).



des en altres fil·lòpodes: *Artemia salina* (ANDERSON *et al.*, 1970; DE MAYER CRIEL, 1973), *Tanymastix lacunae* (GARREAU DE LOUBRESSE, 1978).

El complex constituït per una *zonula adhaerens* seguit d'una unió septada, és habitual en els invertebrats i es troba, entre d'altres, a l'epiteli d'*Hydra* (WOOD, 1959), en els epitelis dels intestins d'insectes (NOIROT-TIMOTHÉE & NOIROT, 1973), a diverses glàndules salivals d'insectes (WIENER *et al.*, 1964; OSCHMAN & BERRIDGE, 1970; LAUVERJAT, 1973), a les glàndules tegumentàries dels Miriàpodes (JUBERTHIE-JUPEAU, 1975), a les glàndules multifides dels Gasteròpodes (OVTRACHT, 1967). A les glàndules dels vertebrats, la presència de complexos d'unió, constituïts per unions septades, no és tan freqüent.

A les glàndules de la closca el reticle endoplasmàtic, com s'ha dit abans, és constituït per vesícules allargades i paral·leles entre elles, localitzables majoritàriament a la zona basal de les cèl·lules. Aquest aspecte del reticle és semblant al que hom ha descrit en diverses glàndules d'insectes: glàndules salivals (HARROD & KASTRITSIS, 1972; LAUVERJAT, 1972; AUSTEE, 1975), la glàndula làctica (BONNANFANT-JAÏS, 1974; TOBE *et al.*, 1973), la glàndula de seda (TASHIRO *et al.*, 1976).

L'aparell de Golgi segueix el mateix desenvolupament que el reticle endoplasmàtic pel que fa al cicle secretor interior.

L'origen dels grànuls de secreció, a partir, principalment, de la fusió de les vesícules

que procedeixen de la cara de maduració dels dictiosomes, s'ha constatat igualment a les glàndules de la closca d'*Artemia salina* per part d'ANDERSON *et al.* (1970), els quals, al mateix temps, afegeixen un segon origen a partir del reticle endoplasmàtic llis, i en *Tanymastix lacunae* (GARREAU DE LOUBRESSE, 1978). Un tercer origen dels grànuls de secreció a partir de vesícules rugoses, més amples que les vesícules gòlgianes, s'ha observat a *Artemia salina* per part de DE MAYER CRIEL (1970). Aquest darrer origen dels grànuls de secreció no l'hem observat, encara, en el nostre material.

Un cop formats, els grànuls de secreció presenten una morfologia heterogènia; no presenten la complexitat dels grànuls de secreció d'altres glàndules, com per exemple les glàndules salivals dels insectes (RIZKI, 1967; LAUVERJAT, 1972).

## AGRAÏMENTS

Agraeixo a la doctora Mercè Durfort els seus consells per a l'elaboració d'aquest treball, així com la lectura crítica de l'original.

## BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, E., LOCHHEAD, J. H., LOCHHEAD, M. S. & HUEBNER, E. 1970. The origin and structure of the tertiary envelope in thickshelled eggs of the brine shrimp, *Artemia*. *J. Ultrastruct. Res.*, 32: 497-525.
- AUSTEE, J. H. 1975. An electron microscopical study of the salivary glands of the Tettigoniidae, *Homorochoryphus nitidulus*. *J. Insect Physiol.*, 21: 1073-1080.
- BONNANFANT-JAÏS, M. L. 1974. Morphologie de la glande lactée d'une Glossine, *Glossina austeni* Newst, au cours du cycle de gestation. I. Aspects ultrastructuraux en période de gestation. *J. Microscopie*, 19: 265-284.
- DE MAYER CRIEL, B. 1970. Contribution de vesícules rugueuses à la formation des grains de sécrétion dans la glande coquillière d'*Artemia salina*. *Arch. Biol.*, 81: 491-494.
- DE MAYER CRIEL, B. 1973. La glande coquillière non pigmentée d'*Artemia salina* Leach. *Z. Zellforsch.*, 144: 299-308.
- FAUTREZ, J. & FAUTREZ-FIRLEFY, N. 1971. Contribution à l'étude des glandes coquillières et des coques de l'oeuf d'*Artemia salina*. *Arch. Biol.*, 82: 41-83.
- GARREAU DE LOUBRESSE, N. 1978. Etude ultrastructu-

- rale et radioautographique de l'activité cyclique des glandes coquillières d'un Crustacé Phyllo-pode. *Biol. Cell.*, 31: 59-78.
- GRAF, F. 1978. Les jonctions continues zonaires et maculaires d'un épithélium de crustacé. *Biol. Cell.*, 33: 55-62.
- HARROD, M. J. F. & KASTRITSIS, C. D. 1972. Ultrastructural analysis of the salivary glands of *Drosophila* during the late period. *J. Ultrastruct. Res.*, 40: 292-312.
- JUBERTHIE-JUPEAU, L. 1975. Les glandes tégumentaires de la fossette supra-anale des Scutigere-llidae (Symphyla, Myriapoda). *Tissue & Cell*, 2: 347-356.
- KENDALL, M. D. 1969. The fine structure of the salivary glands of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *F. Z. Zellforsch.*, 98: 399-420.
- LAUVERJAT, S. 1972. Rôle des cellules zymogènes dans les sécrétions salivaires de *Locusta migratoria* (Orthoptères, Acridoidea). *Tissue & Cell*, 4: 301-310.
- LAUVERJAT, S. 1973. Ultrastructure des glandes salivaires de *Locusta migratoria*. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, 114: 129-147.
- LINDER, H. J. 1959. Studies of the fresh water fairy shrimp, *Chirocephalopsis bundyi* (Forbes). Histochemistry of egg shell formation. *J. Morphol.*, 107: 259-284.
- MAWSON, M. L. & YONGE, C. M. 1938. The origin and nature of the egg membranes in *Chirocephalus diaphanus*. *Quart. J. Microsc. Sci.*, 80: 553-565.
- MATTER, A., ORCI, L. & ROUILLER, C. 1969. A study on the permeability barriers between Disse's space and the bile canaliculus. *J. Ultrastruct. Res.*, suppl. 11: 5-71.
- NOIROT-TIMOTHÉE, C. & NOIROT, Ch. 1973. Jonctions et contacts intercellulaires chez les Insectes. I. Jonctions septées. *J. Microscopie*, 17: 169-184.
- OSCHMAN, J. L. & BERRIDGE, M. J. 1970. Structural and functional aspects of salivary fluid secretion in *Calliphora*. *Tissue & Cell*, 2: 281-310.
- OVTRACHT, L. 1967. Ultrastructure des cellules sécrétrices de la glande multifide de l'escargot. *J. Microscopie*, 6: 63-82.
- OVTRACHT, L. 1972. Morphologie de la région golgienne des cellules de la glande multifide de l'escargot au cours du cycle sécrétoire annuel. *J. Microscopie*, 15: 353-376.
- REYNOLDS, E. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17: 208-212.
- RICHARDSON, K. C., JARRET, L. & FINKE, E. H. 1960. Embedding in epoxy resins of ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.*, 35: 313-323.
- RIZKI, T. M. 1967. Ultrastructure of the secretory inclusions of salivary gland cells in *Drosophila*. *J. Cell Biol.*, 32: 531-534.
- TASHIRO, Y., MATSUDURA, S. & HATA, K. 1976. Ultrastructural observations on the organogenesis of the posterior silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 22: 273-283.
- TOBE, S. S., DAVEY, K. G. & HUEBNER, E. 1973. Nutrient transfer during the reproductive cycle in *Glossina austeni* Newst: histology and histochemistry of the milk gland, fat body, and oenocytes. *Tissue & Cell*, 5: 633-650.
- WATSON, M. L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4: 727-729.
- WIENER, J., SPIRO, D. & LOEWENSTEIN, W. R. 1964. Studies on an epithelial (gland) cell junctions. II. Surface structure. *J. Cell Biol.*, 22: 587-598.
- WOOD, R. L. 1959. The intracellular attachment in the epithelium of *Hydra* as revealed by electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 6: 343-352.