

LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER VENTRALDRÜSEN VON *EPHEMERA DANICA* MUELL. (EPHEMEROPTERA: EPHEMERIDAE) WAHREND DER METAMORPHOSE

HELMUT KAISER

Zoologisches Institut der Universität Basel, Rheinsprung 9, 4051 Basel, Switzerland

(Accepted 3 April 1978)

Abstract—During postembryonic development, the ventral glands of *Ephemera danica* increase in size until the last nymphal instar, and start to diminish prior to the subimaginal moult. The ultrastructural examination demonstrates that degeneration of the glands is initiated by the release of cytoplasm from the gland cells. In the subimagines, these cells contain only small amounts of remaining cytoplasm and a few mitochondria, but increasing numbers of lysosome-like bodies. The nuclear chromatin is condensed. Spherical, pycnotic nuclei are the main characteristics of imaginal glands.

In the earliest stages investigated, the formation of large vesicles of the endoplasmic reticulum and their release into the glandular cavity were observed, indicating secretion. In the gland cells of early last nymphal instars, the large number of mitochondria and tubules of the agranular endoplasmic reticulum suggests a high rate of hormone production. The only sexual variation observed in the ventral glands of the stages studied was their larger size in the females.

Index descriptors (in addition to those in title): Ecdysial glands, ultrastructure.

EINLEITUNG

BEI EINIGEN Ephemeriden-Arten wurden die Ventraldrüsen lichtmikroskopisch untersucht. Die Befunde weichen aber bei den verschiedenen Autoren (Pflugfelder, 1947; Arvy und Gabe, 1950, 1952, 1953 a, b; Kaiser, 1977, unpubl. Diss.) teilweise voneinander ab. Deshalb erschien es wünschenswert, diese Organe mit dem Elektronenmikroskop genauer zu beobachten und die raschen Veränderungen während der kurzen Subimaginal- und Imaginalstadien zu untersuchen.

MATERIAL UND METHODEN

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen standen Schnittserien von insgesamt 27 Tieren zur Verfügung. Die elektronenmikroskopischen Ergebnisse wurden an den Ventraldrüsen von 11 Tieren gewonnen.

Jeweils im Herbst wurden die jüngeren Nymphenstadien gefangen und sofort präpariert. Um die letzten drei Entwicklungsstadien zu erhalten, wurde eine grössere Anzahl von Nymphen im März oder April gefangen und zur weiteren Aufzucht in das Zoologische Institut gebracht. Da die Tiere in den Zuchtgefässen einzeln aufgezogen wurden (vgl. Kaiser, 1977, unpubl. Diss.), war ihr Alter bei der Präparation relativ genau bekannt. Unter Zuchtbedingungen betrug die Lebensdauer der letzten Nymphen ca 4 Wochen, die der Subimagines 15-30 hr und die der Imagines 24-36 hr.

Die mehrtägige Fixierung der Tiere erfolgte in einem Glutaraldehyd/Formaldehyd/Pikrinsäure-Gemisch (Ito und Karnovsky, 1968). Die 7 µm dicken Paraplastschnitte wurden mit Paraldehydfuchsin, Hämalaun und Pikroindigocarmin gefärbt (vgl. Kaiser, 1977, unpubl. Diss.). Zur Volumenbestimmung diente die Methode der Flächenintegration mit Hilfe eines Quadratnetzes (Weibel und Elias, 1967).

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Ventraldrüsen in einigen Fällen aus dem Kopf herauspräpariert. Meist gelang es jedoch, grosse Teile des Kopfes zu entfernen, ohne dass dadurch die Ventraldrüsen und ausserdem auch die Corpora allata und Corpora cardiaca beschädigt wurden. Auf diese Weise war es

möglich, Ultradünnschnitte herzustellen, die alle drei Organe enthielten. Der Vergleich mit früheren Aufnahmen der Corpora allata und cardiaca (Kaiser, 1977, unpubl. Diss.) erlaubte es, den Fixierungszustand dieser beiden Organe und damit auch der Ventraldrüsen zu beurteilen.

Die Präparation und Fixierung erfolgte in dem erwähnten Gemisch von Ito und Karnovsky (pH 7.2; ca 1060 mOsm; 2 hr). Die Objekte wurden über Nacht in isotonischem Cacodylatpuffer ausgewaschen und anschliessend in OsO_4 nachfixiert (pH 7.2; 2% in 0.2m Cacodylatpuffer; 2 hr). Nach einstündigem "block staining" in Uranylacetat (2% in 70%-igem Aceton) kamen die Präparate über eine Acetonreihe in Propylenoxid und danach über Nacht in ein Epon/Propylenoxid-Gemisch. Die Eponschnitte (Luft, 1961) wurden vor der Untersuchung im Elektronenmikroskop mit Bleicitrat kontrastiert (Reynolds, 1963).

ERGEBNISSE

(a) Lichtmikroskopie

Um den Entwicklungsverlauf der Ventraldrüsen während der Metamorphose zu verfolgen, wurden Volumenmessungen durchgeführt. Die in Abb. 1 eingetragenen Werte

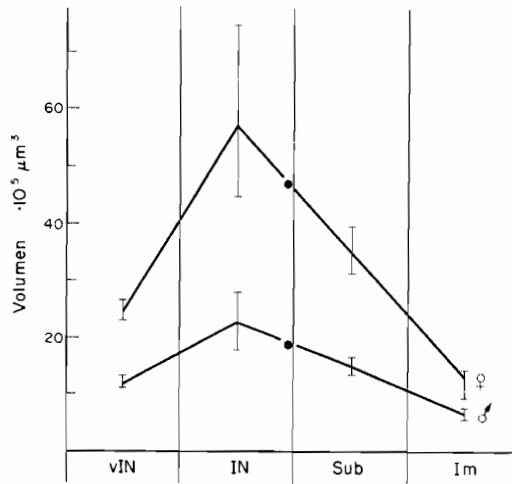


ABB. 1. Das Volumen der Ventraldrüsen während der letzten Entwicklungsstadien. Die beiden Einzelwerte (Punkte) wurden bei Tieren gemessen, die kurz vor der Subimagoalhütung standen. v1N = vorletztes Nymphenstadium; 1N = letztes Nymphenstadium; Sub = Subimago; Im = Imago.

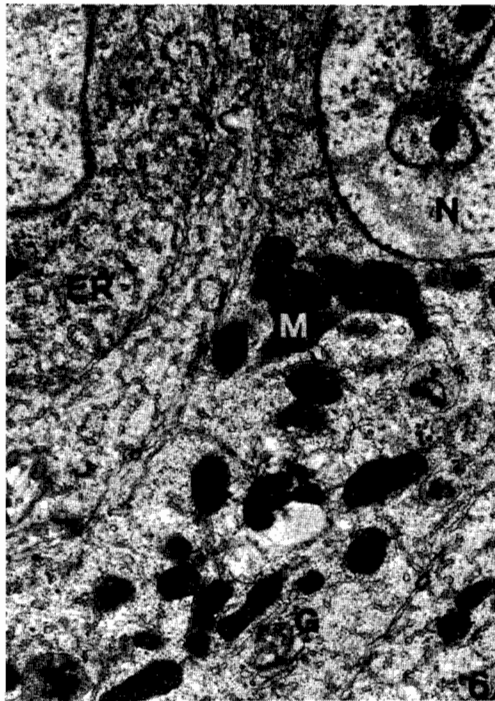
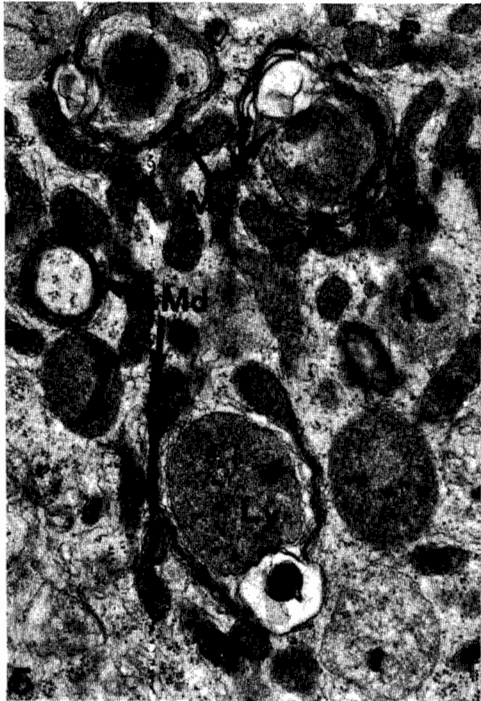
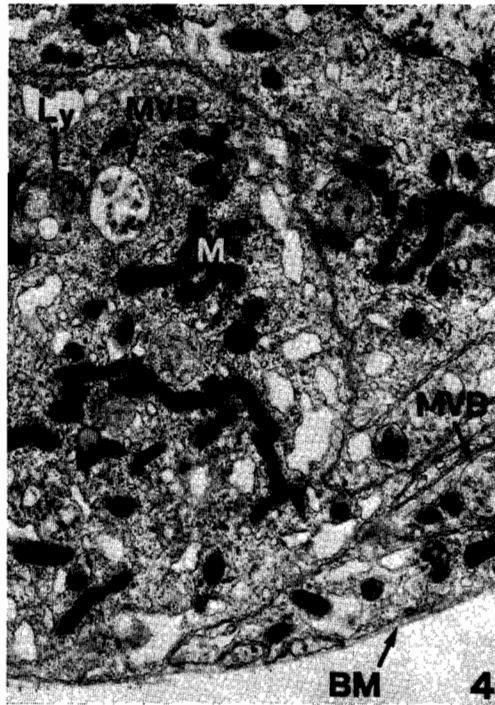
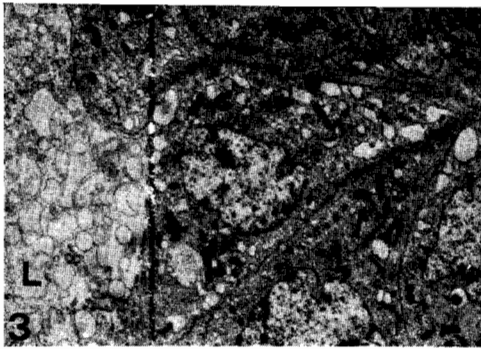
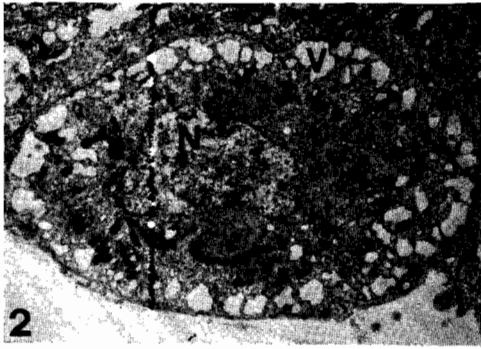
ABB. 2. Ventraldrüsenzelle einer eineinhalb-jährigen Nymphe. An der Peripherie haben sich zahlreiche Vakuolen ausgebildet. N = Zellkern; V = Vakuole. $\times 5000$

ABB. 3. Von den Zellen werden Vakuolen ins Drüsenlumen abgegeben. Eineinhalb-jährige Nymphe. L = Lumen der Ventraldrüse. $\times 5000$

ABB. 4. Stärker vergrößerter Ausschnitt aus einer Ventraldrüse. Eineinhalb-jährige Nymphe. BM = Basalmembran; Ly = lytische Strukturen; M = Mitochondrien; MVB = multivesikuläre Körper. $\times 14,500$

ABB. 5. Ausschnitt aus einer Ventraldrüsenzelle einer letzten Nymphe. Es sind Mitochondrien zu erkennen, die Cytoplasmabezirke umschliessen oder sich um vermutlich lytische Strukturen legen. Ly = lytische Struktur; M = Mitochondrien; Md = wahrscheinlich degenerierende Mitochondrien. $\times 20,000$

ABB. 6. Ventraldrüse einer jüngeren letzten Nymphe. Die Membran der Kerne ist oft stark eingefaltet. Im Cytoplasma fällt das kräftig ausgebildete tubuläre, glatte ER auf. ER = tubuläres, glattes ER; G = Golgi-Apparat; M = Mitochondrien; N = Zellkern. $\times 17,500$



geben das Gesamtvolumen wieder, enthalten also auch die kleinen Hohlräume, die häufig im Innern der Drüsen auftreten. Die beim letzten Nymphenstadium speziell angegebenen Punkte stammen von besonders alten letzten Nymphen, die kurz vor der Subimaginalhäutung standen. Diese weit unter dem Durchschnitt liegenden Werte nähern sich stark denen der Subimagines. Das bedeutet, dass sich die Ventraldrüsen vom mittleren letzten Nymphenstadium an—also kurz vor der Metamorphose—zu verkleinern beginnen. Der Volumentrückgang lässt sich auf eine starke Reduktion der Cytoplasmamenge zurückführen.

Die Grössenveränderungen während der einzelnen Entwicklungsstadien laufen bei beiden Geschlechtern vollkommen gleich ab. Die weiblichen Tiere besitzen dabei immer etwa doppelt so grosse Ventraldrüsen wie die Männchen.

(b) *Elektronenmikroskopie*

Jüngerer Nymphenstadium (ca 18 Monate alt). Abb. 2 zeigt eine typische Ventraldrüsenzelle, wie sie bei Tieren dieses Alters häufig anzutreffen ist. Die Oberfläche der Kerne ist leicht gewellt und nur selten straker eingebuchtet. Neben einem Nucleolus enthalten die Kerne viel fein verteiltes Chromatin, das sich stellenweise zu etwas dichteren Strukturen zusammenlagert. Im Cytoplasma befinden sich neben vielen unregelmässig angeordneten Mikrotubuli und Ribosomen vor allem zahlreiche Mitochondrien. Sie sind langgestreckt, gelegentlich auch verzweigt und ihre Matrix ist auffallend elektronendicht. Recht häufig sind 2 weitere Organellen anzutreffen: Es handelt sich um multivesikuläre Körper und um lysosomenartige Strukturen, die in ihrem Inneren oft Bruchstücke anderer Organellen erkennen lassen (Abb. 4).

Das auffälligste Merkmal der Zellen dieses Stadiums sind aber zahlreiche vesikuläre Erweiterungen des endoplasmatischen Reticulums (ER), die sich besonders an der Peripherie häufen (Abb. 2). Stellenweise schliessen sich die Vesikel zu grossen Gruppen zusammen, die ins Drüsenlumen austreten (Abb. 3).

Wo die Ventraldrüsen-Zellen gegen das Aussenmedium abgegrenzt sind, werden sie von einer sehr dünnen Basalmembran bedeckt (Abb. 4).

Letztes Nymphenstadium. Die Zellen dieses Stadiums fallen vor allem durch die zahlreichen Mitochondrien auf (Abb. 7). Diese Organellen stehen oft mit Tubuli des glatten ER in Verbindung, die besonders bei jüngeren letzten Nymphen in grosser Zahl das Cytoplasma durchziehen (Abb. 6). Das Innere der Tubuli ist etwas elektronendichter als das umliegende Zellplasma. Grössere Erweiterungen des ER, wie sie für die Drüsenzellen der eineinhalbjährigen Tiere typisch sind, lassen sich nur selten beobachten. Dafür sind wesentlich mehr Golgi-Körper zu erkennen, und auch die Zahl der Lysosomen ist anscheinend grösser. Wie bei den jüngeren Nymphen enthält das Cytoplasma auch in diesem Stadium zahlreiche freie Ribosomen. Die an das Haemocoel grenzenden Zellmembranen zeigen starke Einfal-

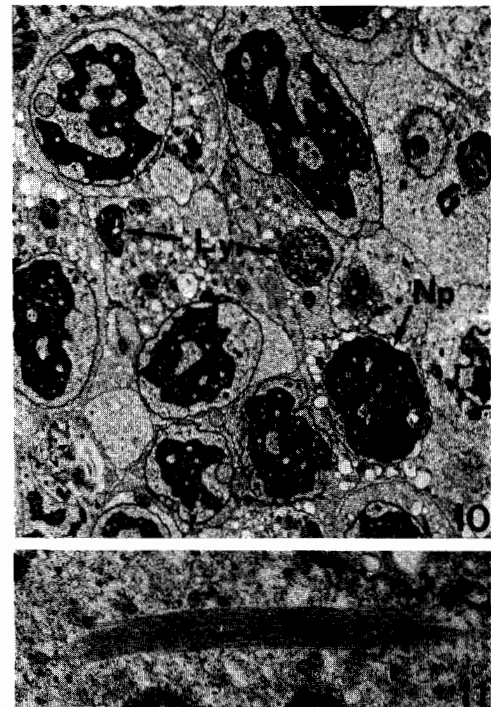
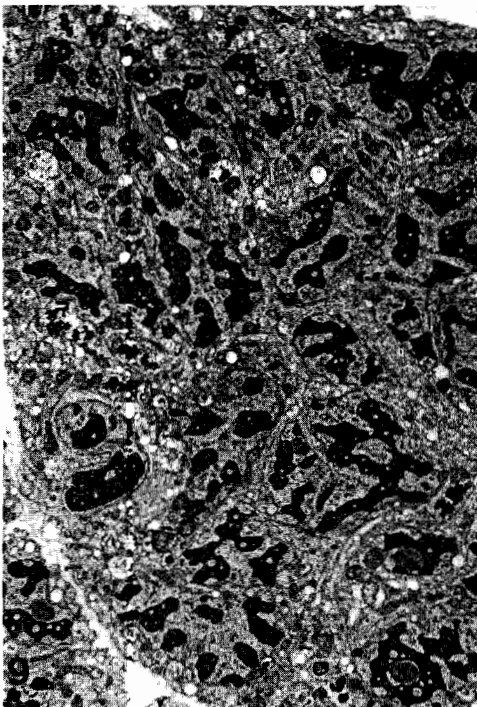
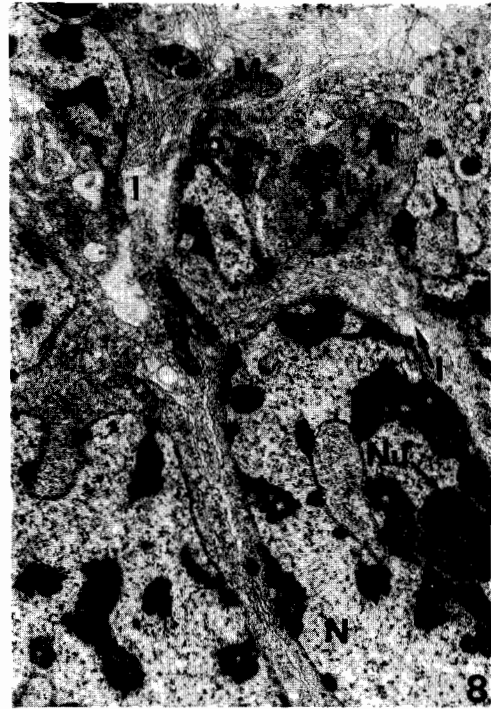
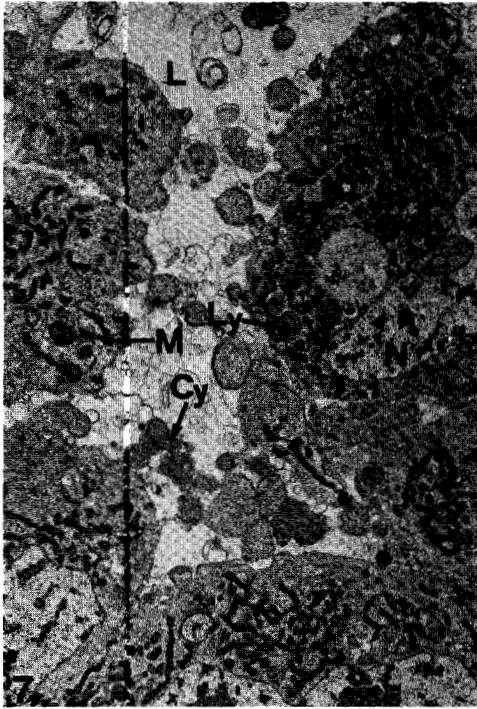
ABB. 7. Ventraldrüse einer letzten Nympe mit zahlreichen Mitochondrien. Ins Drüsenlumen werden Cytoplasmateile abgegeben. Cy = abgeschnürtes Cytoplasma; L = Lumen der Drüse; Ly = lytische Strukturen; N = Zellkern. $\times 4500$

ABB. 8. Ventraldrüse einer ca 12 hr alten Subimago. Das Chromatin der Kerne hat sich zu grösseren Klumpen verdichtet. Die Zellen enthalten nur noch wenig Cytoplasma. I = Interzellularspalt; M = Mitochondrien; N = Zellkern; Nu = Nucleolus. $\times 10,000$

ABB. 9. Ventraldrüse einer 4 hr alten Imago. Das Chromatin der Kerne schliesst sich zu immer grösseren Komplexen zusammen. $\times 4000$

ABB. 10. Ventraldrüse einer über 12 hr alten Imago. Ly = lytische Strukturen; Np = pyknotischer Kern. $\times 4000$

ABB. 11. Mikrotubuli-Bündel in der in Abb. 10 gezeigten imaginalen Ventraldrüse. $\times 20,000$



tungen, und auch die Kerne haben durch starke Einstülpungen der Membran ihre Oberfläche vergrössert (Abb. 6, 7).

Bei etwas älteren letzten Nymphen fällt auf, dass viele Mitochondrien dünner und länger werden. Die Enden dieser Organellen kommen sich immer näher, bis sie schliesslich miteinander verschmelzen. Aus diesen Gebilden entwickeln sich Lamellenkörper. Nicht selten erfolgt der Zusammenschluss der Mitochondrien-Enden um eine lysosomenartige Struktur herum (Abb. 5). Vermutlich beobachten wir hier die Degeneration von Mitochondrien.

Von zahlreichen Ventraldrüsen-Zellen schnüren sich Teile des Cytoplasmas ab. Diese ribosomenreichen Bläschen enthalten nie Mitochondrien. Sie werden ins Drüsenlumen abgestossen (Abb. 7).

Subimago. Nach der Metamorphose zeigen die Ventraldrüsen ein stark verändertes Aussehen (Abb. 8). Das lässt sich auf die drastische Verringerung sowohl der Cytoplasmamenge als auch der Zahl der Mitochondrien zurückführen. Die noch verbliebenen Mitochondrien sind meist weniger langgestreckt als bei den früheren Stadien und enthalten eine hellere Matrix (Abb. 8). Die Zahl der Lysosomen und multivesikulären Körper hat sich deutlich erhöht. Zwischen den Zellen sind teilweise recht breite Interzellularspalten ausgebildet (Abb. 8). Die Zellmembranen falten sich an vielen Stellen ein, wodurch immer mehr "Hohlräume" und "leere" Vesikel im Cytoplasma entstehen.

Die Kerne zeigen ähnliche Umrisse wie bei den letzten Nymphenstadien. In ihnen befinden sich aber zahlreiche sehr elektronendichte Chromatinklumpen, die fast immer hellere, bläschenartige Zonen enthalten. In den Nucleoli sind meist mehrere dunkle, gelegentlich auch hellere Stellen zu erkennen. Als erstes Anzeichen beginnender Kernpyknosen kann das manchmal zu beobachtende Verschmelzen mehrerer Chromatinklumpen gelten (Abb. 8).

Imago. Das restliche Cytoplasma der Ventraldrüsen frisch geschlüpfter Imagines hat sich stark aufgelockert. Die Chromatinklumpen in den Zellkernen verschmelzen immer mehr zu grösseren Komplexen (Abb. 9).

Bei älteren Imagines (Abb. 10) haben die pyknotischen Kerne eine kugelförmige Gestalt angenommen und sind weitgehend mit einer stark elektronendichten Substanz angefüllt. Das Zellplasma ist mit zahlreichen "leeren" Vesikeln durchsetzt und enthält lytische Strukturen von gelegentlich beachtlicher Grösse. Nicht selten sind Bündel von dicht nebeneinanderliegenden Mikrotubuli zu sehen (Abb. 11), die in den anderen Stadien nicht vorkommen.

An einigen Stellen der Ventraldrüsen dieser älteren Imagines beginnen sich bereits die Zellen voneinander zu lösen. Bei Tieren, die noch einige Stunden älter sind, lassen sich die Häutungsdrüsen nicht mehr als zusammenhängende Organe erkennen.

DISKUSSION

Wie bei den von Arvy und Gabe (1950, 1952, 1953 a,b) untersuchten Ephemeriden sind auch bei *E. danica* die ersten Anzeichen einer Degeneration an den Ventraldrüsen letzter Nymphen zu erkennen. Neben einer Verdichtung des Chromatins bei älteren letzten Nymphen fällt vor allem der Austritt von zahlreichen Cytoplasmabezirken ins Drüsenlumen auf. Es ist noch unklar, was mit den abgeschnürten Cytoplasmateilen geschieht, doch erscheint es möglich, dass sie von den nicht selten im Lumen anzutreffenden Haemocyten phagozytiert werden.

Ob auch der Abbau von Mitochondrien, der in diesem Stadium häufig beobachtet wurde, mit der Degeneration der Drüsen zusammenhängt, oder ob es sich dabei um

Vorgänge handelt, die bei jedem Häutungszyklus ablaufen, lässt sich noch nicht entscheiden. Dass die ringförmig zusammengeschlossenen Mitochondrien wirklich degenerieren und nicht besonders aktive Organellen sind (Idelman, 1964; vgl. auch Beaulaton, 1968), ist anzunehmen, weil sie sich anschliessend zu Lamellenkörpern entwickeln. Die erhöhte Zahl von Golgi-Körpern weist möglicherweise ebenfalls auf den bevorstehenden Drüsenabbau hin. In den Häutungsdrüsen von *Locusta* konnte nämlich verfolgt werden, wie sich aus Golgi-Vesikeln lytische Strukturen entwickeln (Cassier und Fain-Maurel, 1968; Fain-Maurel und Cassier, 1968).

Der rasche Zerfall der Ventraldrüsen von *E. danica* während des Subimaginal- und Imagonalstadiums verläuft sehr ähnlich wie bei den Häutungsdrüsen anderer Insekten (Normann, 1965; Scharrer, 1966; Osinchak, 1966; Cassier und Fain-Maurel, 1968, 1969, 1970; Blazsek *et al.*, 1975). Das häufige Erscheinen von Mikrotubuli-Bündeln unterstützt die von anderen Autoren bereits geäusserte, aber nicht näher erklärte Vermutung, wonach diese Organellen eine wichtige Rolle bei Degenerationsprozessen spielen könnten (vgl. Cassier und Fain-Maurel, 1969).

Die Annahme, dass die Ventraldrüsen von *E. danica* kurz vor der Metamorphose ihre stärkste Aktivität erreichen, wird durch den Verlauf der in Abb. 1 gezeigten Kurven unterstützt. Bereits Arvy und Gabe (1950, 1952, 1953 a, b) vermuteten dies aufgrund von volumetrischen und histologischen Befunden an anderen Ephemeriden. Bei den von ihnen in diesem Stadium beschriebenen Sekretkörnern dürfte es sich allerdings eher um verschiedene lysosomenartige Strukturen gehandelt haben. Im Elektronenmikroskop zeigen sich jedenfalls keine sekretorischen Granula.

Der auffällige Grössenunterschied zwischen den Ventraldrüsen weiblicher und männlicher Tiere liefert keine Hinweise auf eine unterschiedliche Sekretion. Da die Weibchen allgemein grösser als die Männchen sind und dieser Geschlechtsunterschied auch bei den *Corpora allata* und *cardiaca* festzustellen ist (Kaiser, 1977, unpubl. Diss.), kann angenommen werden, dass das grössere Volumen der Drüsen weiblicher Tiere nicht auf einen besonderen Aktivitätszustand zurückzuführen ist.

Über die eigentlichen Sekretionsvorgänge in den Ventraldrüsen-Zellen von *E. danica* können lediglich erste Vermutungen angestellt werden. Wie weit sie zutreffen, lässt sich erst durch eine Untersuchung klarstellen, die die Entwicklung der Ecdysialdrüsen bei jüngeren Nymphen während einer gesamten Häutungsperiode verfolgt.

Die Bilder von Drüsen eineinhalb-jähriger Nymphen zeigen möglicherweise ein Stadium, bei dem grössere Sekretmengen, die sich in Vakuolen angesammelt haben, ins Drüsenlumen austreten (Abb. 2, 3). Die "leer" erscheinenden Vakuolen enthalten kein Glykogen, wie es bei anderen Insekten beobachtet wurde (z.B. Arvy und Gabe, 1950; Romer, 1971). Mit einer cytochemischen Untersuchung nach Thiery (1967) konnte nachgewiesen werden, dass bei sämtlichen verfügbaren Stadien Glykogenablagerungen fehlen. (Eine günstige Kontrolle dieses bei *E. danica* erhaltenen Resultats wurde durch die *Corpora allata* ermöglicht, die sich auf den gleichen Schnitten befanden. Zahlreiche Stellen in diesen Organen reagierten positiv.)

Auf den Aufnahmen von jüngeren letzten Nymphen zeigen die Ventraldrüsen-Zellen ein völlig anderes Aussehen. Über die Bedeutung der starken Einfaltungen der Kernmembranen (Abb. 6) wie auch der an das Haemocoel grenzenden Cytoplasmamembranen (auf den Abb. nicht sichtbar) lässt sich noch nichts aussagen. Vermutlich beobachten wir in diesem Stadium eine Phase starker Hormonsynthese. Mit der grossen Zahl von Mitochondrien und dem kräftig ausgebildeten tubulären, agranulären ER (Abb. 6) wird man

nämlich stark an steroidogene Zellen von Wirbeltieren (z.B. Christensen und Fawcett, 1966; Berchtold, 1969), aber auch an die Häutungsdrüsen einiger Insekten erinnert (siehe Romer, 1971). Ob bei Insekten ein Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Ultrastruktur der Häutungsdrüsen (die teils eher auf Proteinsynthese, z.B. Joly *et al.*, 1969, teils auf Steroidsynthese, z.B. King *et al.*, 1966, hinweist) und der Produktion von Hormonen oder Prohormonen besteht (vgl. Bollenbacher *et al.*, 1977), ist zur Zeit noch nicht untersucht. Es wäre interessant, festzustellen, wo speziell solche Tiere ihr Häutungshormon produzieren, deren Ecdysialdrüsen nicht das Bild typischer steroidproduzierender Organe zeigen.

Danksagung. Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der EM-Station des Schweizerischen Tropeninstitutes, die mich bei der Arbeit am Elektronenmikroskop unterstützten. Ebenfalls mochte ich Herrn Prof. Dr. H. Nüesch und Herrn Dr. R. Stocker für ihre Hilfe herzlich danken.

LITERATUR

- ARVY, L. et M. GABE. 1950. Données histophysiological sur les formations endocrines rétro-cérébrales chez les Ecdyonuridae (Ephéméroptères). *Bull. Soc. Zool. Fr.* **75**: 267–85.
- ARVY, L. et M. GABE. 1952. Particularités morphologiques des formations endocrines rétro-cérébrales chez *Ecdyonurus dispar* (Curt.) et chez *Ecdyonurus torrentis* Kimmins. *Bull. Soc. Zool. Fr.* **77**: 229–30.
- ARVY, L. et M. GABE. 1953a. Données histophysiological sur la neurosécrétion chez quelques Ephéméroptères. *Cellule* **56**: 203–22.
- ARVY, L. et M. GABE. 1953b. Contribution à l'histologie des glandes endocrines céphaliques chez la larve de *Prosopistoma foliaceum* Fourcroy. *Bull. Soc. Zool. Fr.* **78**: 451–61.
- BEAULATON, J. A. 1968. Modifications ultrastructurales des cellules sécrétrices de la glande prothoracique de vers à soie au cours des deux derniers âges larvaires. I. Le chondriome, et ses relations avec le réticulum agranulaire. *J. Cell. Biol.* **39**: 501–25.
- BERCHTOLD, J. P. 1969. Contribution à l'étude ultrastructurale des cellules interrénales de *Salamandra salamandra* L. (Amph. Urodèle). *Z. Zellforsch.* **102**: 357–75.
- BLAZSEK, I., A. BALÁZS, V. J. A. NOVÁK and J. MALÁ. 1975. Ultrastructural study of the prothoracic glands of *Galleria mellonella* L. in the penultimate, last larval and pupal stages. *Cell Tissue Res.* **158**: 269–80.
- BOLLENBACHER, W. E., S. L. SMITH, J. J. WIELGUS and L. I. GILBERT. 1977. Evidence for an α -ecdysone cytochrome p.450 mixed function oxidase in insect fat body mitochondria. *Nature (Lond.)* **268**: 660–63.
- CASSIER, P. et M.-A. FAIN-MAUREL. 1968. Origine golgienne et évolution des corps vacuolaires impliqués dans la dégénérescence des glandes de mue de *Locusta migratoria migratorioides* (R. & F.). *C. R. Acad. Sci. Paris D* **266**: 1290–92.
- CASSIER, P. et M.-A. FAIN-MAUREL. 1969. Nouvelle observation sur la genèse et la localisation de microtubules dans l'ergastoplasme chez le criquet migrateur, *Locusta migratoria migratorioides* (R. & F.). *C. R. Acad. Sci. Paris D* **268**: 537–39.
- CASSIER, P. et M.-A. FAIN-MAUREL. 1970. Contrôle plurifactoriel de l'évolution postimaginale des glandes ventrales chez *Locusta migratoria* L. Données expérimentales et infrastructurales. *J. Insect Physiol.* **16**: 301–18.
- CHRISTENSEN, A. K. and D. W. FAWCETT. 1966. The fine structure of testicular interstitial cells in mice. *Amer. J. Anat.* **118**: 551–72.
- FAIN-MAUREL, M.-A. et P. CASSIER. 1968. Etude infrastructurale des glandes de mue de *Locusta migratoria migratorioides* (R. & F.). I. Evolution cyclique au cours des stades larvaires et genèse du produit de sécrétion, l'ecdysone. *Arch. Zool. Exp. Gen.* **109**: 445–76.
- IDELMAN, S. 1964. Description d'une transformation mitochondriale observée dans la cortico-surrénale du rat. *J. Microsc. (Paris)* **3**: 437–46.
- ITO, S. and M. J. KARNOVSKY. 1968. Formaldehyde-glutaraldehyde fixatives containing trinitro compounds. *J. Cell Biol.* **39**: 168a, b.
- JOLY, L., P. JOLY et A. PORTE. 1969. Remarques sur l'ultrastructure de la glande ventrale de *Locusta migratoria* L. (Orthoptère) en population dense. *C. R. Acad. Sci. Paris D* **269**: 917–18.
- KAISER, H. 1977. Das endokrine System der Eintagsfliege *Ephemera danica* Müll. während der Metamorphose: eine licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung. Dissertation. Cratander AG, Basel.

- KING, R. C., S. K. AGGARWAL and D. BODENSTEIN. 1966. The comparative submicroscopic morphology of the ring gland of *Drosophila melanogaster* during the second and third larval instars. *Z. Zellforsch.* **73**: 272–85.
- LUFT, J. H. 1961. Improvements on epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**: 409–14.
- NORMANN, T. C. 1965. The neurosecretory system of the adult *Calliphora erythrocephala*. I. The fine structure of the corpus cardiacum with some observations on adjacent organs. *Z. Zellforsch.* **67**: 461–501.
- OSINCHAK, J. 1966. Ultrastructural localization of some phosphatases in the prothoracic gland of the insect *Leucophaea maderae*. *Z. Zellforsch.* **72**: 236–48.
- PFLUGFELDER, O. 1947. Über die Ventraldrüsen und einige andere inkretorische Organe des Insektenkopfes. *Biol. Zentralb.* **66**: 211–35.
- REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**: 208–12.
- ROMER, F. 1971. Die Prothoracaldrüsen der Larve von *Tenebrio molitor* L. (Tenebrionidae, Coleoptera) und ihre Veränderungen während eines Häutungszyklus. *Z. Zellforsch.* **122**: 425–55.
- SCHARRER, B. 1966. Ultrastructural study of the regressing prothoracic glands of blattarian insects. *Z. Zellforsch.* **69**: 1–21.
- THIÉRY, J. P. 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microsc. (Paris)* **6**: 987–1018.
- WEIBEL, E. R. und H. ELIAS. 1967. *Quantitative Methoden in der Morphologie*. Springer, Berlin.