

ULTRAESTRUCTURA DE LA CAPSULA OVIFERA DE *Concholepas concholepas* (BRUGIERE, 1789) (GASTROPODA: MURICIDAE)

ORLANDO GARRIDO¹ y CARLOS S. GALLARDO²

ABSTRACT: Garrido, O. & C.S. Gallardo. 1993. Ultrastructure of the egg capsule of *Concholepas concholepas* (Brugière, 1789) (Gastropoda: Muricidae). *Revista de Biología Marina, Valparaíso* 28(2): 191-201.

The egg-capsule structure of the snail *Concholepas concholepas* was studied with electron microscopy. According to microstructural characteristics of the capsule-wall components, six layers or laminae were identified. They include: a) a thin finely fibered outer lamina, corrugatedly folded which probably serves as a barrier to invasion by microorganisms, b) four middle fibered layers, the most noticeable of them being an intermediate vacuolated lamina whose functions could be related to structural support and water retention and c) a thin layered sac that completely surrounds the albumen or capsular fluid in which the embryos are contained. The three most external layers also participate in the build up of the escape aperture rim, the stalk and the basal plate of the capsule.

Our findings are also compared with the pattern of laminar structure found in other muricean gastropods in order to discuss if there is a common wall structure in the egg-capsules of this selected family.

Key words: Egg-capsules, egg-capsules ultrastructure, *Concholepas concholepas*, gastropods.

RESUMEN: Garrido, O. & C.S. Gallardo. 1993. Ultraestructura de la cápsula ovífera de *Concholepas concholepas* (Brugière, 1789) (Gastropoda: Muricidae). *Revista de Biología Marina, Valparaíso* 28(2): 191-201.

La cápsula ovífera del caracol marino *Concholepas concholepas* es estudiada a nivel ultraestructural utilizando técnicas convencionales de microscopía electrónica de transmisión y barrido. Se analizan 4 regiones de la ovicápsula: cuerpo capsular, opérculo, pedúnculo y base cementada al sustrato.

En la pared del cuerpo capsular, se diferencian 6 capas o láminas que desde la superficie hacia el interior comprenden: a) una delgada cubierta externa fibrilar y con repliegues superficiales, que actuaría como barrera contra la invasión de microorganismos, b) cuatro capas fibrilares intermedias, siendo la más notable de ellas una lámina central vacuolada o estrato esponjoso que actuaría como soporte estructural y medio de retención de agua y c) un saco tenue interior que contiene el albumen con los embriones en suspensión. El opérculo consta de un tapón muco-fibroso rodeado parcialmente sólo por las cubiertas más externas del cuerpo capsular, las mismas que basalmente constituyen el pedúnculo ovicapsular. La base de adherencia al sustrato consta de una secreción cementante fibrilar en la cual se internan ramificaciones del estrato esponjoso peduncular.

Nuestros hallazgos son comparados con la estructura laminar encontrada en cápsulas de otros gastrópodos muricáceos y se discute el patrón estructural de la pared ovicapsular que en general caracteriza a caracoles de la familia Muricidae.

Palabras claves: Cápsulas ovíferas, ultraestructura ovicapsular, *Concholepas concholepas*, gastrópodos.

¹ Instituto de Embriología, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

² Instituto de Zoología, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

INTRODUCCION

La encapsulación provee un mecanismo eficiente para el desarrollo bentónico de huevos y embriones de algunos invertebrados marinos. Particularmente en gastrópodos prosobranquios, tal estrategia ha alcanzado una de sus mayores diversificaciones en la radiación adaptativa de dichos moluscos. Aún cuando están constituidas por material orgánico inerte, las cápsulas ovíferas poseen una morfología y patrón estructural que se ajusta a los roles funcionales que dichas estructuras deben cumplir. El conocimiento de la composición y estructura de sus paredes resulta básico para cualquier proposición sobre el origen, rol funcional y relaciones evolutivas de los diferentes patrones estructurales observados. Sin embargo gran parte de la información morfológica existente se refiere a características macroscópicas de cápsulas y oviposturas como se destaca en las revisiones hechas por Webber (1977) y más recientemente por Pechenik (1986). Una descripción de la estructura externa de ovicápsulas de Neogastropoda es hecha también por Bandel (1975, 1976, 1982) y por D'Asaro (1986); este último autor (D'Asaro 1991) ha hecho una acabada revisión descriptiva de las oviposturas de Muricidae reunidas en la colección de Gunnar Thorson.

Pocos estudios se han preocupado de conocer la micro- y ultraestructura de las cápsulas ovíferas. El primer trabajo conocido sobre el tema es el de Dulzetto (1950) en *Murex trunculus* Linné. Posteriormente destaca el trabajo de Tamarin y Carriker (1967) en *Urosalpinx cinerea* (Say) quienes describen una ovicápsula de cuatro láminas compuestas de

moléculas semejantes a proteínas y ligadas en una matriz similar al colágeno.

Estudios histoquímicos sobre la pared capsular y sus capas han sido realizados por Bayne (1968) y Gruber (1982). Investigaciones sobre el origen y ultraestructura de proteínas capsulares son las efectuadas por Flower *et al.* (1969) y Flower (1973) mientras que la estructura física y química de la pared ovicapsular de *Ilyanassa obsoleta* Say es descrita por Sullivan & Maugele (1984).

D'Asaro (1988) hace un estudio comparado entre especies de diferentes familias de neogastropodos en un intento por definir patrones estructurales ovicapsulares que distingan a especies de una determinada familia o taxón superior. Para caracoles muricáceos confirma la existencia de una pared ovicapsular formada por 4 láminas estructurales de similar origen y función. Sin embargo los antecedentes comparados que él utiliza incluyen aún muy pocas especies y si bien los estudios aportan descripciones micromorfológicas, muchas de ellas se basan en técnicas de limitada definición ultraestructural. Observaciones más detalladas sobre la naturaleza y grado de afinidad entre los componentes de la ovicápsula, requieren de los antecedentes que en este sentido pueda aportar la microscopía electrónica. Un estudio ultraestructural de este tipo es el que presentamos aquí para el caso del caracol Muricidae *Concholepas concholepas*. Los objetivos son revisar críticamente el esquema estructural dado para especies de Muricidae y proponer además algunas hipótesis sobre el posible rol funcional de los distintos componentes estructurales que en este caso se observan.

MATERIAL Y METODOS

Las cápsulas ovíferas de *C. concholepas* fueron colectadas en el Laboratorio de Metri (costa oriental del Seno de Reloncaví: 41°36'S, 72°43'W), durante el 26 de agosto y 13 de septiembre de 1991; dicho material proviene tanto de oviposturas depositadas en estanques de cultivo como del ambiente natural. Las cápsulas fueron desprendidas cuidadosamente y transportadas al laboratorio en Valdivia colocándolas en una caja térmica con agua de mar a baja temperatura.

Se seleccionó ovicápsulas en estadio inicial, estadios intermedios y en fase terminal. En el laboratorio el material fue procesado de acuerdo a la siguiente rutina. Cada cápsula fue seccionada en 4 niveles distintos a fin de comparar su microestructura (por microscopía electrónica de transmisión "MET" y de barrido "MEB") en diferentes partes de la misma: región opercular, región media o cuerpo capsular, región peduncular y base de adherencia cementada al sustrato. Aparte fueron tratadas cápsulas enteras para estudio en MEB. Posteriormente se fijaron las cápsulas por dos horas en una mezcla formada por 2,5% de glutaraldehído, 10% para-formaldehído y 2% acroleína, tamponada a pH 7,2 con fosfato 0,2 M (Rodríguez 1969). Después de lavar con el mismo fosfato tampón, los tejidos fueron postfijados por dos horas en tetróxido de osmio tamponado al 1%. Para estudios de MET el material fue embebido en una mezcla de epon-araldita (Richardson *et al.* 1960). Secciones ultrafinas fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo (Glauert 1965). Para MEB el material fue deshidratado en acetona, secado a punto crítico y ba-

ñado en oro. Observaciones de la ultraestructura fueron hechas usando un microscopio electrónico Philips 300 (MET) y un Hitachi H-700 (MET y MEB).

RESULTADOS

Como es típico en muricáceos y muchos neogastrópodos, la morfología macroscópica de la ovicápsula de *C. concholepas* incluye un cuerpo capsular con un opérculo en su extremo superior y un pedúnculo inferior cementado al sustrato (Gallardo 1973; Fig.1). La pared capsular contiene en su interior un saco tenue y transparente que contiene el albumen en el cual están inmersos los embriones en desarrollo (Fig. 2A). Las cápsulas ovíferas no presentaron diferencias ultraestructurales en relación al estadio de desarrollo de los embriones que contenían en cada caso. Por lo tanto, la descripción ultraestructural que viene a continuación incluye indistintamente tanto ovicápsulas tempranas (embriones en gastrulación) como terminales (larvas en estadio de preclósión).

REGION DEL CUERPO CAPSULAR:

Esta zona define bien lo que es la estructura general de la ovicápsula, por lo cual se describe en primer lugar. Un carácter más particular en cambio, adopta esta estructura en regiones más específicas como son el opérculo, pedúnculo y base cementante. La Fig.2B (corte transversal en MEB de un área como la indicada en el recuadro de Fig. 2A) ilustra claramente las capas que componen la pared del cuerpo capsular. De acuerdo a estas observaciones hemos distinguido seis estratos distintos que considerados desde afuera hacia adentro incluyen:

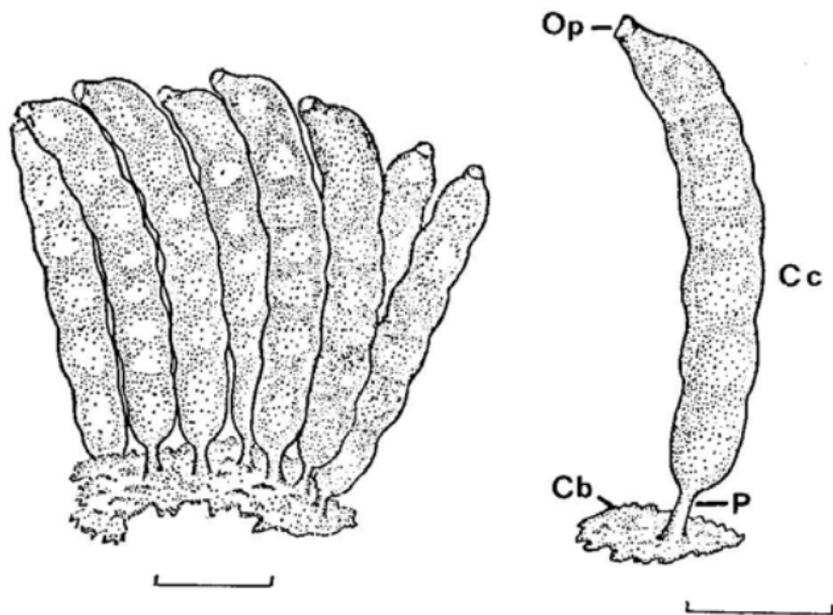


Fig. 1. *C. concholepas*. Cápsulas ovíferas, indicando las partes que caracterizan a cada una de estas estructuras. Op, opérculo; Cc, cuerpo capsular; P, pedúnculo; Cb, cemento basal. Escala: 5 mm (Modificado de Gallardo 1973).

a) CAPA 1 O CUBIERTA EXTERNA (FIG. 2B-1): presenta una estructura fibrilar homogénea con un espesor medio de 2,55 μm . Típicamente posee una serie de repliegues cuya altura promedio es de 7,3 μm y sigue un patrón reticular cuyo aspecto en superficie se ilustra en la Fig. 3A y a través de un corte transversal, en la Fig. 2C. Las depresiones dejadas por estas estrías son colonizadas por gran cantidad de microorganismos marinos (diversos protozoos entre otros; Fig. 2C, flechas).

b) CAPA 2 O ESTRATO COMPACTO ESTRIADO EXTERNO (FIG. 2B-2): su espesor aproximado es de 5,9 μm en promedio. Es de estructura fibrilar compacta siendo muy característica la presencia de estriaciones

periódicas en que se alternan una banda densa de 45 nm de espesor con una banda clara de 25 nm; esta última presenta a su vez en su parte media, una banda densa de 15 nm de espesor (Fig. 2F).

c) CAPA 3 O ESTRATO ESPONJOSO MEDIO: por su gran espesor (55,8 μm en promedio) incluye una parte importante de la pared ovicapsular. Lo más característico es su aspecto esponjoso determinado por una red fibrilar de trabéculas que dejan entre sí vacuolas o lagunas interconectadas (Figs. 2B-3 y 2C-3). Dichas trabéculas presentan una estructura ramificada en distintas direcciones espaciales y mostrando en cada una de sus ramas un pa-

trón de bandas fibrilares estriadas (Fig. 2E). Desde afuera hacia adentro esta capa muestra una tendencia a alternar bandas de lagunas pequeñas con bandas de lagunas relativamente más grandes (Fig. 2B).

d) **CAPA 4 O ESTRATO COMPACTO ESTRIADO INTERNO:** su espesor promedio es de aproximadamente $6,8 \mu\text{m}$ (Fig. 2B-4). Presenta una estructura fibrilar compacta con estriaciones periódicas compuestas de bandas densas y claras que tienen las mismas dimensiones que en el estrato compacto estriado externo (Fig. 2F).

e) **CAPA 5 O ESTRATO LAXO:** su espesor medio es de $3,4 \mu\text{m}$ y está formado por largos repliegues que unen el estrato estriado interno con la cubierta o saco del albumen que tapiza internamente el lumen ovicapsular (Figs. 2B-5 y 2D-5). Las prolongaciones presentan un contenido fibrilar de mediana densidad electrónica.

f) **CAPA 6 O SACO DEL ALBUMEN:** Su espesor promedio aproximado es de sólo $2,8 \mu\text{m}$ (Fig. 2B-6). Presenta densidad electrónica mediana y se observan estriaciones con bandas densas y claras similares a las encontradas en los estratos estriados externo e interno.

REGION OPERCULAR:

En esta región de la cápsula ovífera, la pared capsular aparece prolongándose hasta dicha zona en forma de una copa que envuelve parcialmente una secreción o tapón muco-fibroso, componente fundamental del opérculo. En ese punto, la pared capsular mantiene sus cubiertas más externas mientras que hacia el interior el estrato esponjoso se delamina o

separa envolviendo el tapón muco-fibroso por su base y paredes laterales. Por lo tanto, sólo en la parte basal del tapón, el estrato esponjoso es seguido por el estrato compacto estriado interno, el estrato laxo y el saco del albumen. El hemisferio distal del tapón opercular queda así libre sin presentar envoltura alguna de la pared ovicapsular (Fig. 3B).

REGION PEDUNCULAR:

El pedúnculo ovicapsular es un tallo compuesto básicamente por dos capas que pueden considerarse como una prolongación de sus similares en la pared del cuerpo capsular. Desde la superficie hacia el interior es posible distinguir: a) una cubierta externa ($1,2 \mu\text{m}$ de espesor promedio) (Fig. 3C-1) de la cual sobresalen repliegues superficiales ($2,5 \mu\text{m}$ de altura media) menos prominentes que los observados para esta misma capa en la región del cuerpo capsular, y b) una zona interna con características estructurales semejantes a las del estrato esponjoso descrito para la pared del cuerpo capsular (Fig. 3C-3).

REGION DEL CEMENTO BASAL:

Incluye dos componentes que, desde afuera hacia adentro, son: a) una sustancia cementante compuesta por una matriz fibrilar de baja densidad electrónica y que carece de estriaciones periódicas, y b) una matriz esponjosa con fibras estriadas y que constituye una prolongación del estrato esponjoso medio presente ya en el pedúnculo. En la zona de contacto con el cemento basal, el estrato esponjoso presenta una serie de prolongaciones que se internan a modo de raíces en dicha sustancia adhesiva.

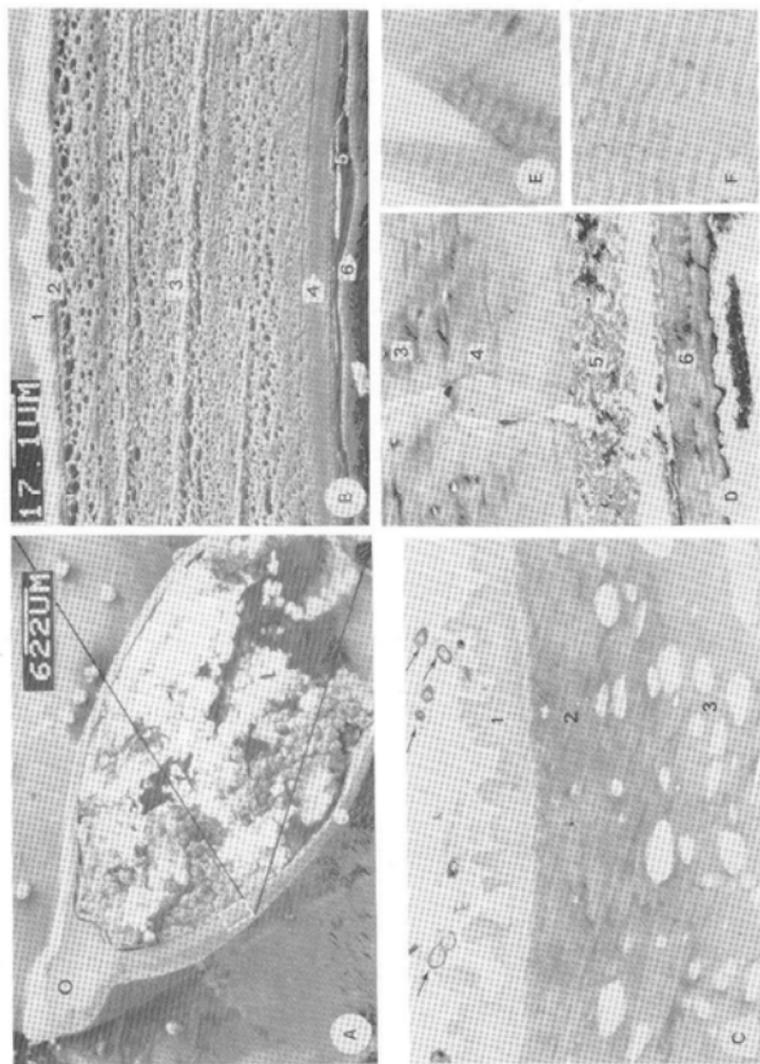


Fig. 2. *C. conchilepas*. Ultraestructura de la oviductápsula. A, (MEB) corte a nivel de la región opercular y distal del cuerpo capsular. O, opérculo; L, larvas intracapsulares. B, (MEB) estratos o capas de la pared oviductápsula (detalle del recuadro en Fig. 2A.). 1, cubierta externa; 2, estrato compacto estriado externo; 3, estrato esponjoso medio; 4, estrato compacto estriado interno; 5, estrato laxo; 6, saco del albumen. C, (MET, 3000 X) corte de la pared capsular a nivel de sus capas más superficiales. Números como en Fig. 2B. D, (MET, 3000 X) corte de la pared capsular a nivel de las capas más internas. Números como en Fig. 2B. E, F, (MET, 3000 X) vista de las estriaciones periódicas en fibras del estrato esponjoso (E) y de los estratos compacto estriados (F).

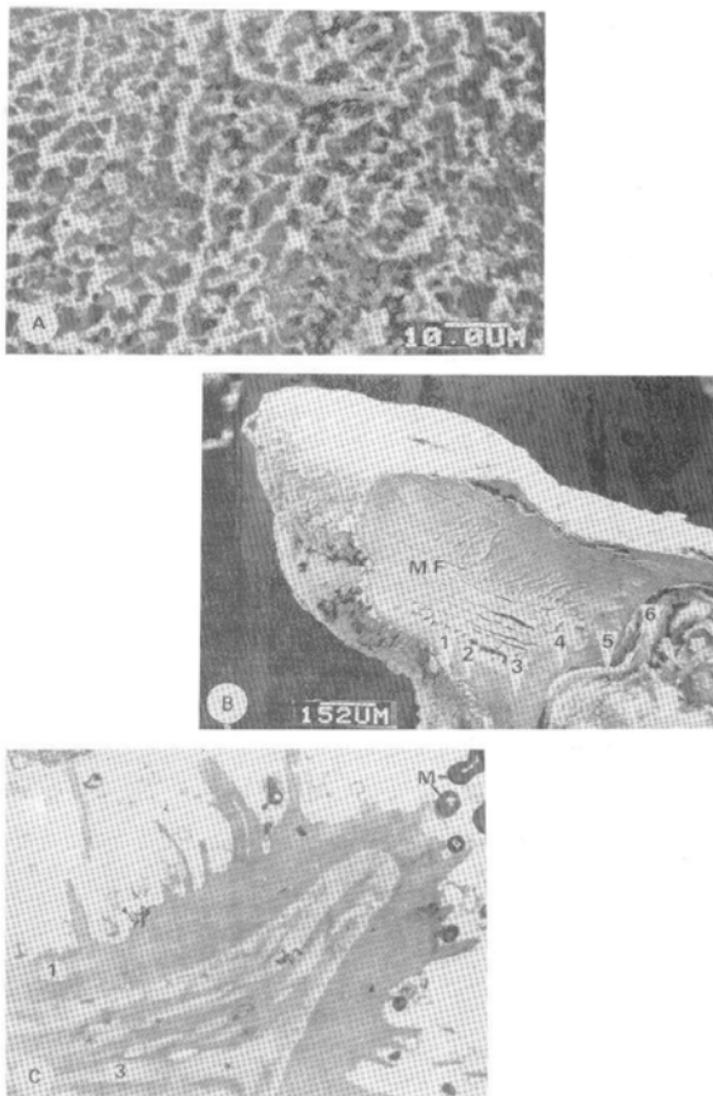


Fig. 3. *C. concholepas*. Ultraestructura de la ovicápsula. A, (MEB) vista superficial de la cubierta externa mostrando el patrón reticular en la orientación de los repliegues. B, (MEB) corte de la región opercular. Número de los estratos igual que en Fig. 2B; MF, tapón muco-fibroso. C, (MET, 7500 X) corte transversal a través de un repliegue de la región peduncular. 1, cubierta externa; 3, estrato esponjoso; M, microorganismos.

DISCUSION

El patrón de estratificación en capas o láminas, mostrado por la pared ovicapular de *C. concholepas*, se ajusta en general al observado en otros gastrópodos muricáceos según las descripciones dadas por D'Asaro (1988) para especies de esta familia. Hay coincidencia en la estratificación general y espesor relativo de los estratos fundamentales que componen dicha pared.

D'Asaro (op.cit.) estudió mediante microscopía óptica, ovicápsulas de distintas familias de Neogastropoda, encontrando al menos tres patrones estructurales para dicho Orden. Dentro de ellos, tanto ovicápsulas de muricáceos como buccináceos se caracterizan por presentar típicamente cuatro estratos o láminas principales: a) una lámina externa finamente fibrilada (denominada por el autor como L_1), b) una lámina con fibras laminares gruesas (L_2) que es la capa de mayor grosor en la pared y cuyas fibras se separan dejando grandes vacuolas; la distribución de las fibras le permitió distinguir diferencias regionales con dos o tres capas fusionadas y la central de ellas posee las fibras más gruesas y orientadas paralelamente al eje longitudinal, c) una lámina (L_3) más delgada y estrechamente aplicada a la capa más interna que parece fusionarse con el tapón mucoso y puede tener similar composición, d) una lámina transparente (L_4) que envuelve directamente el albumen.

Nuestras observaciones en cápsulas de *C. concholepas*, realizadas con microscopía electrónica, nos permiten en cambio diferenciar seis estratos o láminas en vez de los cuatro señalados por

D'Asaro (op.cit.) para gastrópodos muricáceos. Las cuatro capas diferenciadas por este autor corresponden básicamente a lo que nosotros hemos distinguido como: capa 1 o cubierta externa (equivalente a la L_1 de D'Asaro), capas 2, 3 y 4 (L_2), capa 5 o estrato laxo (L_3) y capa 6 o saco del albumen (L_4 de dicho autor). Es decir, los estratos compactos estrados externo e interno que hemos descrito en el presente estudio, no han sido distinguidos en el trabajo de este autor. En estas capas los elementos fibrilares presentan una agrupación mucho más compacta y uniforme lo que hace resaltar claramente las estriaciones periódicas con una alternación regular de bandas de distinto diámetro. Esta situación cambia claramente en el estrato que llamamos esponjoso o medio, donde una orientación diferente de las fibras permite el desarrollo de las lagunas o vacuolas que típicamente caracterizan a ese estrato. Cabe sí considerar que estas fibras también poseen estriaciones periódicas y, en este sentido, no difieren en su naturaleza de aquellas de los estratos compactos que nosotros hemos distinguido. Por lo tanto, si atendemos a la naturaleza común del material fibrilar que compone los estratos compactos y esponjoso, es posible que dichas capas compartan un origen y formación comunes, a pesar de la diferenciación regional en capas distintas de acuerdo a los criterios de ordenación estructural que hemos señalado. El estudio aquí realizado permite resaltar la conveniencia de documentar con observaciones ultraestructurales todo intento de diferenciar capas o estratos en las paredes ovicapulares.

La formación de la pared ovicapular en base a capas de distinta organi-

zación estructural, sugiere determinados roles funcionales para cada una de ellas, tanto por su ubicación en la pared como por el plan de estructura que las caracteriza. En este sentido, consideramos que la cubierta externa fibrilar representa una barrera efectiva contra la invasión e infección por microorganismos del medio externo; de hecho, los cortes al microscopio electrónico revelaron la existencia de numerosos microorganismos adheridos y retenidos en la cubierta externa de dicha pared. La ordenación de las fibras formando una estructura compacta en los estratos compacto estriados sugiere, para estas capas, funciones de protección y soporte. Es posible que el estrato esponjoso medio actúe como soporte o esqueleto interno y que al mismo tiempo sirva como un medio para retención de agua, reduciendo su pérdida por evaporación superficial y constituyendo una efectiva aislación respecto al medio externo. Este sistema de lagunas interconectadas puede servir también como medio de circulación en el transporte de soluciones acuosas a través de la pared ovicapsular. La cubierta membranosa o saco interno es la membrana que primariamente re-

tiene el albumen desde el momento mismo de la formación inicial de la ovi-cápsula en el oviducto de las hembras.

Algunos de los roles funcionales que aquí hemos propuesto para los estratos de la pared ovicapsular, son coincidentes con las proposiciones que al respecto hace D'Asaro (1988) en su análisis estructural para ovi-cápsulas de murfidos. Dicho autor postula también que la cubierta externa actuaría como barrera para microorganismos, aunque propone que en dicha función actuaría también la capa que él denomina como L_2 (estrato esponjoso o medio en nuestro caso); sugiere además que este último estrato actuaría como un esqueleto interno de la pared capsular. El saco reteniendo el albumen (L_4) es considerado por este autor como la lámina primaria de muricáceos y buccináceos. Ella tendría también la función de evitar que el albumen no refractario se mezcle con proteínas capsulares refractarias cuando, al formarse la ovi-cápsula, las láminas estructurales externas son ensambladas mediante mecanismos ciliares como los descritos por Fretter (1941).

AGRADECIMIENTOS: La presente investigación ha sido financiada por el Proyecto DID- UACH S91-14 y por instituciones germanas (DFG y BMZ) en cooperación con la Universidad de Giessen (Alemania) y Universidad Austral de Chile (Convenio C90-5).

LITERATURA CITADA

- Bandel, K. 1975. Embryonalgehäuse Karibischen Meso- und Neogastropoden (Mollusca). Akademie der Wissenschaften und der Literatur, Mainz Abhandlungen der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klasse 1975(1): 1-133.

- Bandel, K. 1976. Morphologie der Gelege und ökologische Beobachtungen an Muriciden (Gastropoda) aus der südlichen Karibischen See. Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft in Basel 85(1/2): 1-32.
- Bandel, K. 1982. Morphologie und Bildung der frühontogenetischen Gehäuse bei conchiferen Mollusken. *Facies* (Erlangen) 7: 1-153.
- Bayne, C.J. 1968. Histochemical studies on the egg capsules of eight gastropod molluscs. *Proceeding of the Malacological Society of London* 38: 139-212.
- D'Asaro, C.N. 1986. Egg capsules of eleven marine prosobranchs from northwest Florida. *Bulletin of Marine Science* 39(1): 76-91.
- D'Asaro, C.N. 1988. Micromorphology of Neogastropod egg capsules. *The Nautilus* 102(4): 134-148.
- D'Asaro, C.N. 1991. Gunnar Thorson's world-wide collection of prosobranch egg capsules: Muricidae. *Ophelia* 35(1): 1-101.
- Dulzetto, F. 1950. Sull' origine e la struttura delle capsule ovifere di *Murex trunculus* L. *Archivio Zoologico Italiano* 35: 83-100.
- Flower, N.E.; Geddes, A.J. & K.M. Rudall. 1969. Ultrastructure of the fibrous protein from the egg capsules of the whelk *Buccinum undatum*. *Journal of Ultrastructure Research* 26: 262-273.
- Flower, N.E. 1973. The storage and structure of proteins used in the production of egg capsules by the mollusc *Cominella maculosa*. *Journal of Ultrastructure Research* 44: 134-145.
- Fretter, V. 1941. The genital ducts of some British stenoglossan prosobranchs. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 25: 173-211.
- Gallardo, C.S. 1973. Desarrollo intracapsular de *Concholepas concholepas* (Brugière) (Gastropoda, Muricidae). Museo Nacional de Historia Natural, Santiago de Chile, Publicación Ocasional 16: 3-16.
- Glauert, A.M. 1965. Section staining, cytology, autoradiography and immunochemistry for biological specimens. In: B. Kay (ed), *Techniques for Electron Microscopy*: 254-310. Oxford and Edinburgh, Ed.
- Gruber, G.L. 1982. The role of the ventral pedal gland in formation of an egg capsule by the muricid gastropod *Eupleura caudata etterae* B.B.Baker, 1951: an integrated behavioral, morphological and histochemical study, Master's thesis, University of Delaware, 142 p.
- Pechenik, J.A. 1986. The encapsulation of eggs and embryos by molluscs: an overview. *American Malacological Bulletin* 4(2): 165-172.
- Richardson, K.; Jarette, L. & E. Finke. 1960. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technology* 35: 313-323.
- Rodríguez, E.M. 1969. Fixation of the central nervous system by perfusion of the cerebral ventricles with a three-fold aldehyde mixture. *Brain Research* 15: 395-412.

- Sullivan, C.H. & T.K. Maugel. 1984. Formation, organization and composition of the egg capsule of the marine gastropod *Ilyanassa obsoleta*. *Biological Bulletin* 167: 378-389.
- Tamarin, A. & M.R. Carriker. 1967. The egg capsule of the muricid gastropod *Urosalpinx cinerea*: an integrated study of the wall by ordinary light, polarized light and electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 21: 26-40.
- Webber, H.H. 1977. Gastropoda, Prosobranchia. In: Giese, J.S. & J.S. Pearse (eds). *Reproduction of Marine Invertebrates IV*: 47-55. Academic Press, New York.