

LUIGI DE MARZO

Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie agro-forestali
Università della Basilicata - Potenza

Nuovi dati anatomici e citologici sul presunto simbiosoma dei Coleotteri Meliridi

ABSTRACT

NEW ANATOMICAL AND HISTOLOGICAL DATA ON THE SUPPOSED SYMBIOSOME OF THE MELYRIDES
(COLEOPTERA)

Observation by light- and electron microscopy was carried out to discuss the biological significance of the mulberry-shaped organs of the female Melyrids, here referred as "Holmgren's organ". This was differently regarded by authors, either as group of oenocytes or as symbiotic transmission device.

The new data on this organ show its presence in both adult females and males of *Henicopus*, *Dasytes* and *Psilothrix*; its absence in *Divales* and *Danacaea*; its presence in last-instar larvae of *Psilothrix viridicoerulea* (Geoffr.); its sex dimorphism in adult; its lack of sex dimorphism in larvae; its regression during the reproductive season in both males and females; its lack of cytoplasmatic structure which can be referred to microorganisms.

A review from the literature leads the author to regard the term "oenocyte" as very poor of cytological significance if not referred to single species. So, the Holmgren's oenocytes are defined as follows: large size, globose shape, large nuclei, lacking in cell polarity, located without metameric order, connected with the gut in both females and larvae, free in the hemocoel in males, trending to regress in both adult females and males possibly in correlation with the gonad development.

Key words: Melyridae, symbiosis, oenocytes, fine structure.

INTRODUZIONE

Nella loro recente rassegna sui casi di endosimbiosi nei Coleotteri, NARDON & GRENIER (1989: 177) riferiscono dei già noti "organi a forma di mora" della femmina del Meliride *Dasytes niger* (L.) e sostengono che si tratta "probabilmente" di un dispositivo per la trasmissione di microorganismi alla progenie⁽¹⁾. In realtà, il significato funzionale di questi organi è ancora incerto dopo che se ne sono interessati in tempi diversi tre eminenti studiosi, e non è neppure

⁽¹⁾ Only one endocytobiotic species has been described: *Dasytes niger* L. In the female, symbiontes are harbored in three mulberry-shaped organs located at the junction of the Malpighian tubules with the hindgut. These organs are lacking in males and probably represent transmission devices, but unfortunately, larvae have not been studied so far. (NARDON & GRENIER, l.c., p. 177)

stato stabilito se si tratta effettivamente di organi di endosimbiosi.

Dal punto di vista anatomico, siamo di fronte a tre grappoli di cellule disposti attorno al canale alimentare e collegati, ciascuno mediante due formazioni claviformi, alla base di due tubi malpighiani adiacenti (figg. 1-2). Lo scopritore, HOLMGREN (1902) studiò questi presunti simbiosomi nell'ambito di ricerche isto-fisiologiche sul sistema escretore degli Insetti e, dopo vari esperimenti sull'assorbimento di coloranti, indicò le suddette formazioni claviformi come "organi escretori accessori" e le cellule a grappolo come "enociti".

Molti anni dopo, STAMMER (1933) riesaminò i medesimi organi mentre era impegnato in ricerche nel campo dell'endosimbiosi e, inizialmente, li considerò connessi a tale fenomeno biologico⁽²⁾; ma in seguito egli stesso (1952) ritrattò decisamente tale interpretazione⁽³⁾ e, sostenendo che poteva trattarsi di masse secretorie di enociti, venne a concordare con la diagnosi di HOLMGREN.

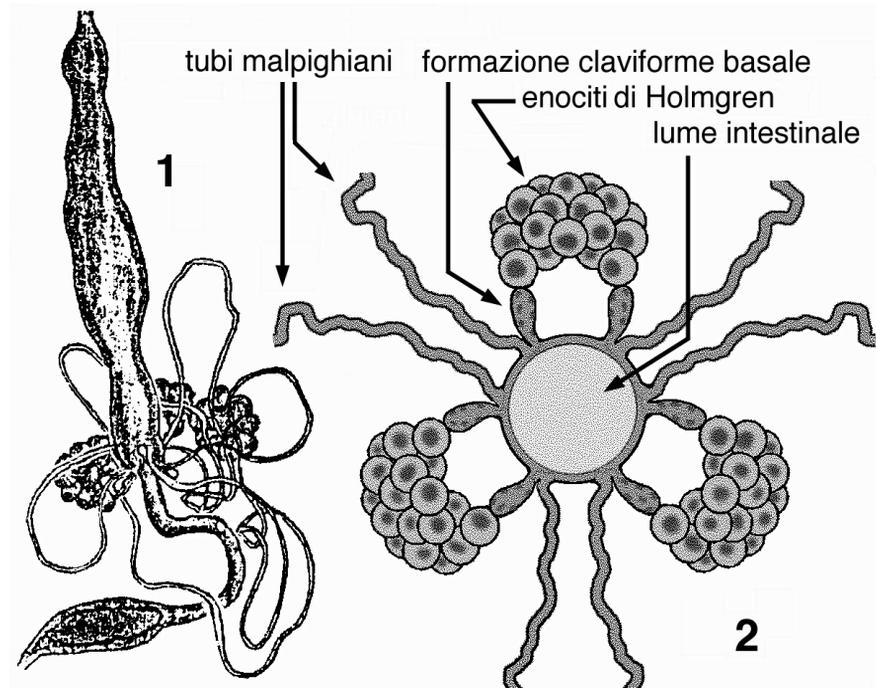
Nella sua opera classica sull'endosimbiosi, BUCHNER (1965: 158) ridescrive ampiamente gli organi in questione, dimostrandosi, pur senza un esame diretto, ben deciso nel classificarli fra i dispositivi femminili per il trasferimento di simbiositi alla progenie; tuttavia, egli non manca di annotare il contemporaneo parere discordante di STAMMER e, infine, lascia la questione in sospenso⁽⁴⁾.

Nel presente contributo, la discussione viene riaperta dopo l'acquisizione di nuovi elementi di giudizio. Cioè, dopo aver sottoposto questo "organo di Holmgren" a un nuovo esame istologico, dopo averne costatato la presenza

(2) Besondere symbiontische Organe, die mit dem Darm in Verbindung stehen, besitzt endlich auch die Cantharide *Dasytes niger* L. An der Grenze zwischen Mittel- und Enddarm münden bei diesem Tiere 6 malpighische Gefäße ein; außerdem liegen hier 3 traubenartige aus 15-20 Zellen bestehende Gebilde, die an der gleichen Stelle in der Mitte zwischen je 2 malpighischen Gefäßen einmünden. Jedes dieser Gebilde besitzt 2 dicht nebeneinander verlaufende Ausführungsgänge. Das Plasma der Zellen ist von ovalen Symbionten erfüllt, die durch die Ausführungsgänge in den Darm übertreten. Auch hier müssen bei der Eiablage die Eier mit den Symbionten vom Enddarm her verunreinigt werden. (STAMMER, 1933: 154)

(3) In einer eingehenden Studie wies er später nach, dass es sich um Sekretbildungen von Oenocytan handelte. Wir kennen heute keine Tenebrioniden, die eine Symbiose besitzen. Ich selbst gab an, dass der Cantharide oder Dasytide *Dasytes niger* L. zwischen den malpighischen Gefäßen drei traubernartige Gebilde führt, die mit ovalen Symbionten erfüllt seien. Es handelt sich hier aber, wie ich inzwischen festgestellt habe, um Drüsen mit Sekretschollen. Die Dasytiden besitzen keine Symbiose. (STAMMER, 1952: 34)

(4) In 1952 Stammer withdrew his description of *Dasytes* symbiosis, being then inclined, as Holmgren was once, to interpret the questionable inclusions as secretory granules, but in our opinion this interpretation should not be regarded as conclusive. At any rate, the device has not been found elsewhere and the fact that it is seen only in females is certainly a cogent argument that it is used for transmission of symbionts. (BUCHNER, l.c., p.160).



Figg. 1-2 - Femmina adulta di *Dasytes niger* (L.) - L'organo di Holmgren nella raffigurazione originale (HOLMGREN, 1902) e rappresentato schematicamente in sezione trasversale.

nelle femmine di altri Meliridi nonché nei maschi corrispondenti, e infine, colmando una lacuna di conoscenza già lamentata dagli Autori summenzionati, dopo averne esaminato la condizione nelle larve.

MATERIALI E METODI

Le osservazioni anatomiche sono state condotte a fresco in soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) su adulti maschi e femmine delle specie elencate in tab. I, catturati in primavera-estate su piante fiorite di diverse specie botaniche, prevalentemente Composite. Di *Psilothrix viridicoerulea* (Geoffr.)⁽⁵⁾ sono stati esaminati numerosi esemplari adulti di diverse località per tutto il periodo di

⁽⁵⁾ Ringrazio il Dott. G. Liberti (Oxon) per avermi comunicato che questo nome specifico va trattato al femminile, in base all'art. 32 del Codice di Nomenclatura Zoologica, e che sussiste sinonimia con *Psilothrix cianea* (Ol.).

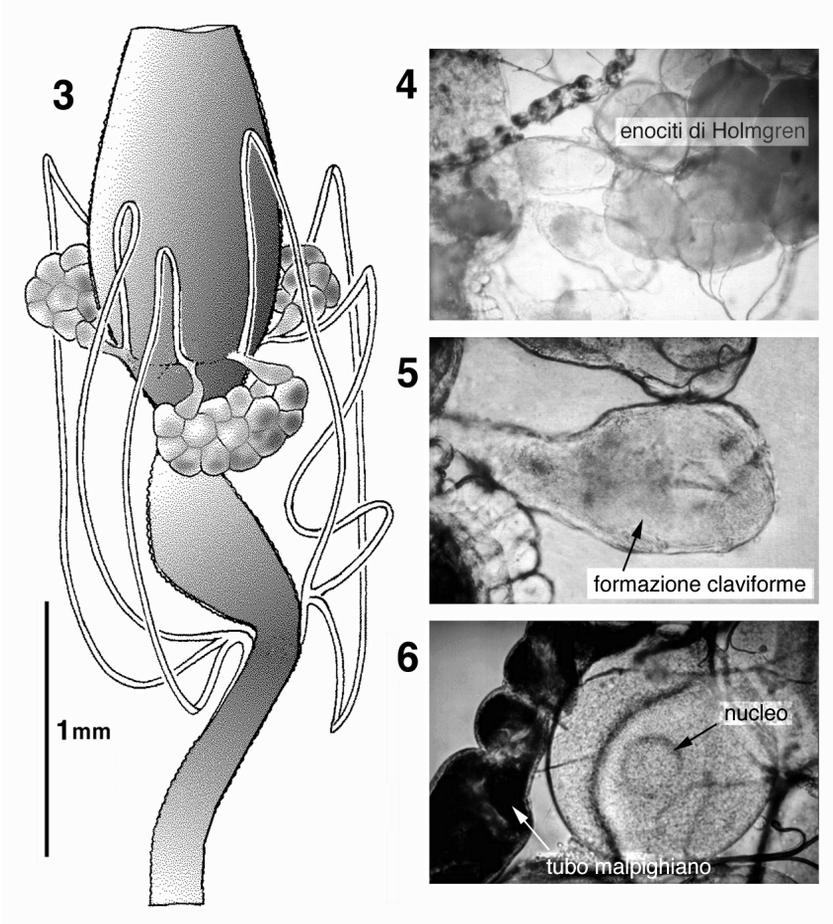


Fig. 3-6 - Femmina adulta di *Psilothrix viridicoerulea* (Geoffr.) - Parte del canale alimentare e organi connessi, con dettagli dell'organo di Holmgren ripresi in campo chiaro da preparati a fresco in soluzione fisiologica.

presenza sui fiori. Della medesima specie sono state esaminate anche le larve dell'ultima età, ottenute a fine inverno estraendole da fusticini morti di varie piante erbacee, soprattutto Ombrellifere. Alcune larve vennero mantenute in camera umida, in presenza di una porzione di fusto della loro pianta-ospite, per ottenere i relativi adulti e quindi effettuare il riconoscimento specifico. Nel corso delle dissezioni, si procedette ad annotarne il sesso delle larve, rilevandolo dalla forma degli abbozzi delle gonadi.

Le osservazioni in sezione hanno riguardato le femmine della stessa specie, *P. viridicoerulea*, usando campioni fissati e inclusi in Araldite M500 dopo i seguenti trattamenti: a) dissezione *ex vivo* in tampone fosfato 0,1 M, pH 7,2; b) prefissazione in una soluzione di aldeide glutarica 4% nello stesso tampone per 2 ore a 0°C; c) lavaggio in tampone; d) postfissazione in tetrossido di osmio 1% in tampone per 4 ore; e) ulteriore lavaggio; f) disidratazione in alcool etilico e impregnazione con ossido di propilene; g) passaggi graduali in una miscela di ossido di propilene e resina fino alla resina pura. Le fettine per il microscopio elettronico a trasmissione (MET), dello spessore di circa 300 Å, vennero contrastate con acetato di uranile e citrato di piombo, in soluzione acquosa.

La classificazione adottata per i Meliridi si accorda con LHOSE (1979).

taxa esaminati	femmina	maschio
tribù Dasytini		
<i>Henicopus falculifer</i>	presente	presente
<i>Divales bipustulatus</i>	assente	assente
<i>Dasytes aerosus</i>	presente	presente
<i>Dasytes flavescens</i>	presente	presente
<i>Psilothrix viridicoerulea</i>	presente	presente
tribù Danacaeini		
<i>Danacaea ambigua</i>	assente	assente

Tab. I - Reperti dell'organo di Holmgren in individui adulti dei due sessi di Meliridi della subf. Dasytinae.

OSSERVAZIONI ANATOMICHE

FEMMINE ADULTE

I reperti (tab. I) mostrano che l'organo di Holmgren non è specifico di *Dasytes niger*, bensì presente in altre specie della tribù Dasytini. Ne sono in possesso altre due specie di *Dasytes*, nonché *Henicopus falculifer* e *Psilothrix viridicoerulea*, mentre le specie esaminate dei generi *Divales* e *Danacaea* ne sono prive.

La condizione anatomica dell'organo è uniforme nelle diverse specie e si accorda con la descrizione originaria di Holmgren (l.c.) (figg. 3-6). I tre grappoli consistono di 15-20 cellule di forma tendenzialmente globosa; essi sono ravvolti da un'esile membrana, che riveste anche le formazioni claviformi e si continua con la lamina basale dell'epitelio intestinale.

MASCHI ADULTI

Nei maschi, l'organo di Holmgren è riconoscibile in forma atipica (fig. 7) nelle stesse specie che lo posseggono nel sesso femminile (tab. I). Non vi è traccia delle formazioni claviformi, e i grappoli cellulari non sono in connessione con il canale alimentare, bensì liberi nell'emocele a contatto con i tubi malpighiani. Tuttavia, questi grappoli appaiono manifestamente omologhi a quelli femminili perché ne presentano i lineamenti citologici.

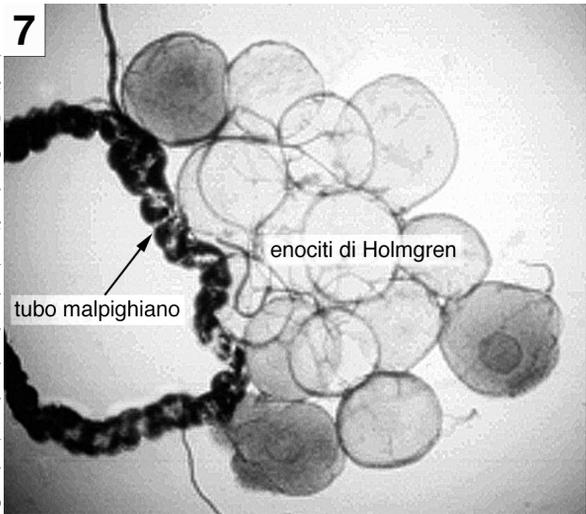


Fig. 7 - Maschio adulto di *Psilothrix viridicoerulea* (Geoffr.) - Immagini dell'organo di Holmgren, riprese in campo chiaro da preparati a fresco in soluzione fisiologica.

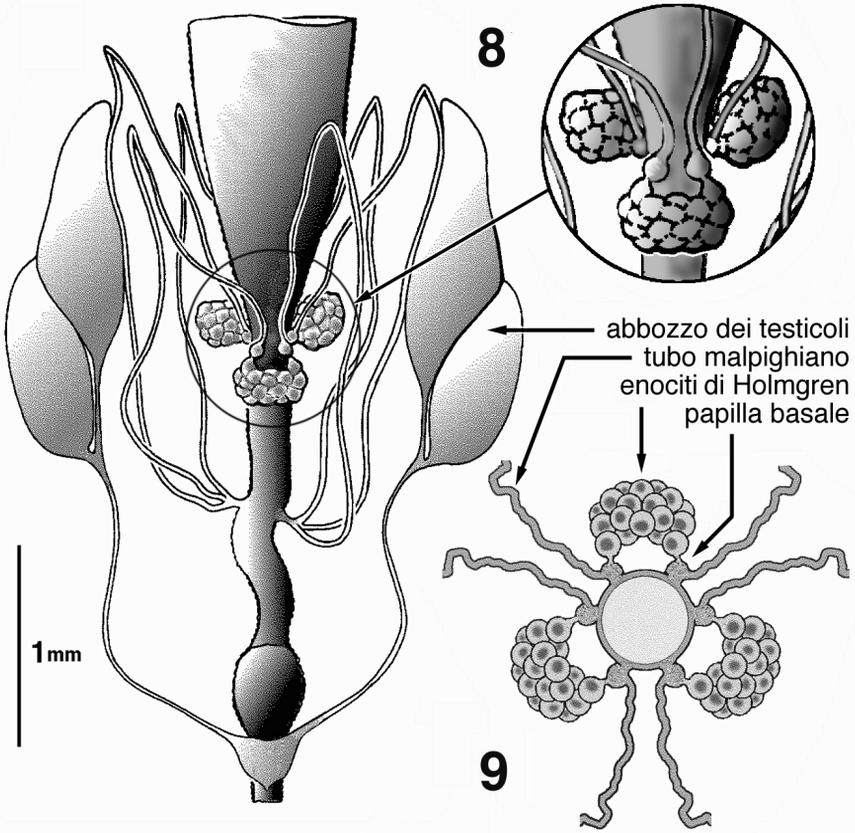
LARVE

Nelle larve dell'ultima età di *Psilothrix viridicoerulea*, l'organo di Holmgren è in una condizione anatomica simile a quella delle femmine adulte riguardo alla connessione con il canale alimentare (fig. 8), ma non presenta le formazioni claviformi. La connessione segue lo schema tipico (fig. 9) ed è realizzata mediante un peduncolo formato dalla stessa lamina basale (figg. 10-11). In ciascun punto di connessione si trova una papilla, che può essere considerata omologa alla formazione claviforme. I singoli grappoli sono composti da un numero di unità uguale a quello delle femmine adulte. Tra le larve maschili e le larve femminili (distinguibili fra loro per la forma degli abbozzi delle gonadi) non si rilevano differenze nell'organo di Holmgren.

OSSERVAZIONI CITOLOGICHE

ADULTI MASCHI E FEMMINE

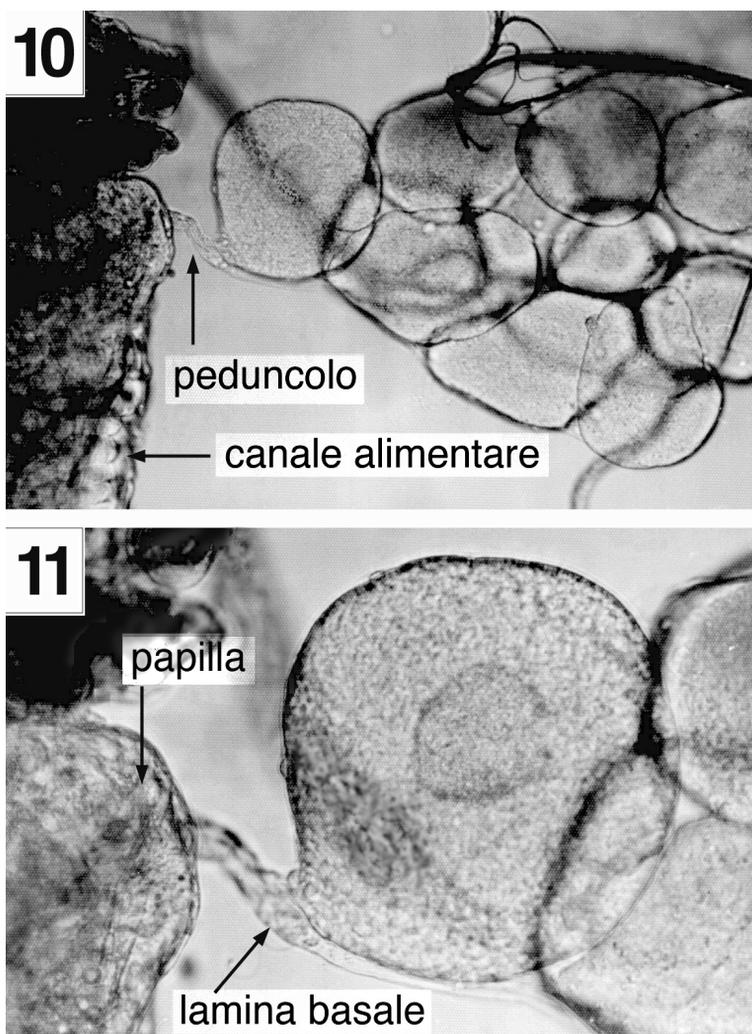
Le cellule di Holmgren hanno dimensioni variabili anche nell'ambito di una singolo grappolo, ma sempre cospicue, con un diametro intorno di 100-200 μm . All'esame *in toto* al microscopio-luce, il loro citoplasma è di aspetto



Figg. 8-9 - Larva matura maschile di *Psilotbrix viridicoerulea* (Geoffr.) - Parte del canale alimentare e organi connessi, con rappresentazione dell'organo di Holmgren in sezione schematica. Le larve maschili si distinguono da quelle femminili perché possiedono vistosi abbozzi dei testicoli.

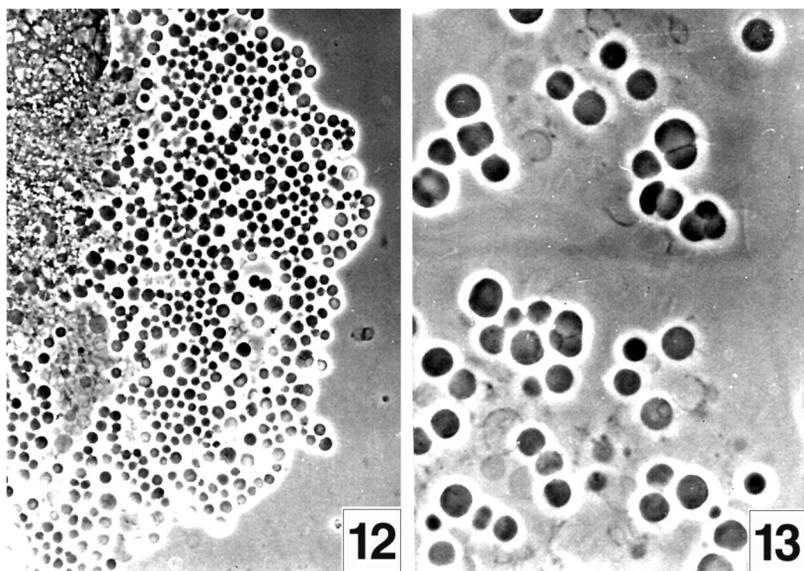
granulare e spesso ha una opacità differente fra cellula e cellula in un medesimo grappolo (fig. 7). Il nucleo è sferoidale, con un diametro intorno a 50 μm ed è ben evidente anche senza colorazione.

Le dissezioni di numerosi adulti maschi e femmine di *P. viridicoerulea* hanno mostrato che le cellule di Holmgren si trovano in differente stato di turgore tra un individuo e l'altro, in una stessa popolazione durante la stagione riproduttiva. In alcuni esemplari si è osservata una condizione molto contratta, al punto che le cellule erano quasi irriconoscibili.



Figg. 10-11 - Larva matura di *Psilobrix viridicoerulea* (Geoffr.) - Immagini di uno dei gruppi di cellule dell'organo di Holmgren e dettaglio della connessione con il canale alimentare, ripresi in campo chiaro da preparati a fresco in soluzione fisiologica.

Le formazioni claviformi delle femmine sono pluricellulari, come già rilevato da HOLMGREN (l.c.) e come risulta dall'esame a fresco, nel quale si contano circa 30 nuclei in *Psilobrix*. A volte, le singole formazioni includono una cavità comunicante con il lume intestinale, che può contenere alcune particelle soggette a moti browniani (? microrganismi), provenienti dallo stesso intestino.



Figg. 12-13 - Larva matura di *Psilothrix viridicoerulea* (Geoffr.) - Immagini dei corpuscoli citoplasmatici estratti per schiacciamento da una delle cellule di Holmgren, riprese in contrasto di fase da preparati a fresco in soluzione fisiologica.

LARVE MATURE

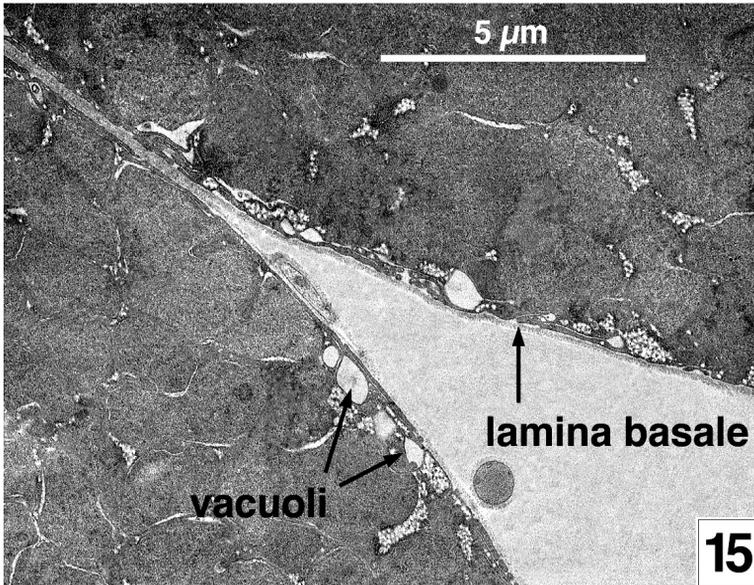
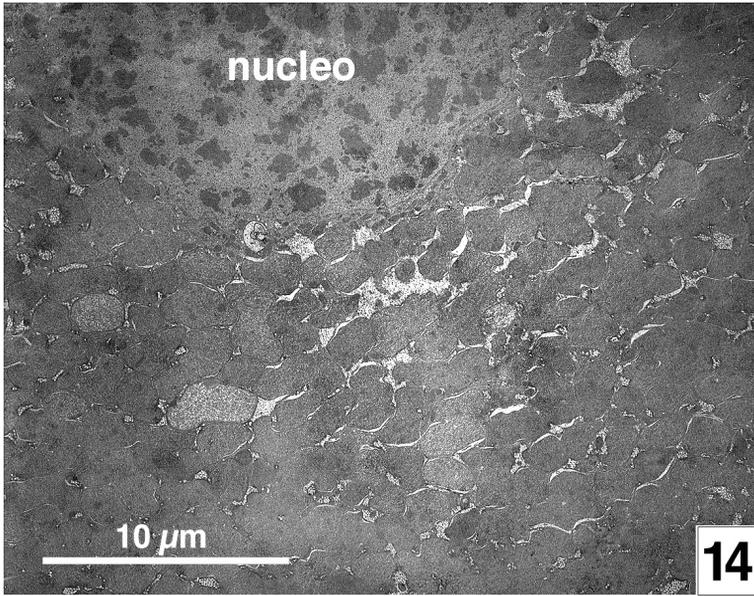
Nelle larve dell'ultimo stadio di *Psilothrix viridicoerulea*⁽⁶⁾, le caratteristiche citologiche coincidono con quelle indicate per gli adulti, anche in merito alle differenze di opacità fra le cellule nell'ambito di un singolo grappolo. Comprimeando le cellule di Holmgren fra due vetrini in soluzione fisiologica, le granulazioni si liberano mostrando la più ampia variabilità di dimensioni (figg. 12-13), senza predominanza di una particolare gamma di grandezze; esse sono sferiche oppure di forme derivanti dall'unione di 2-3 unità sferiche.

OSSERVAZIONI ULTRASTRUTTURALI

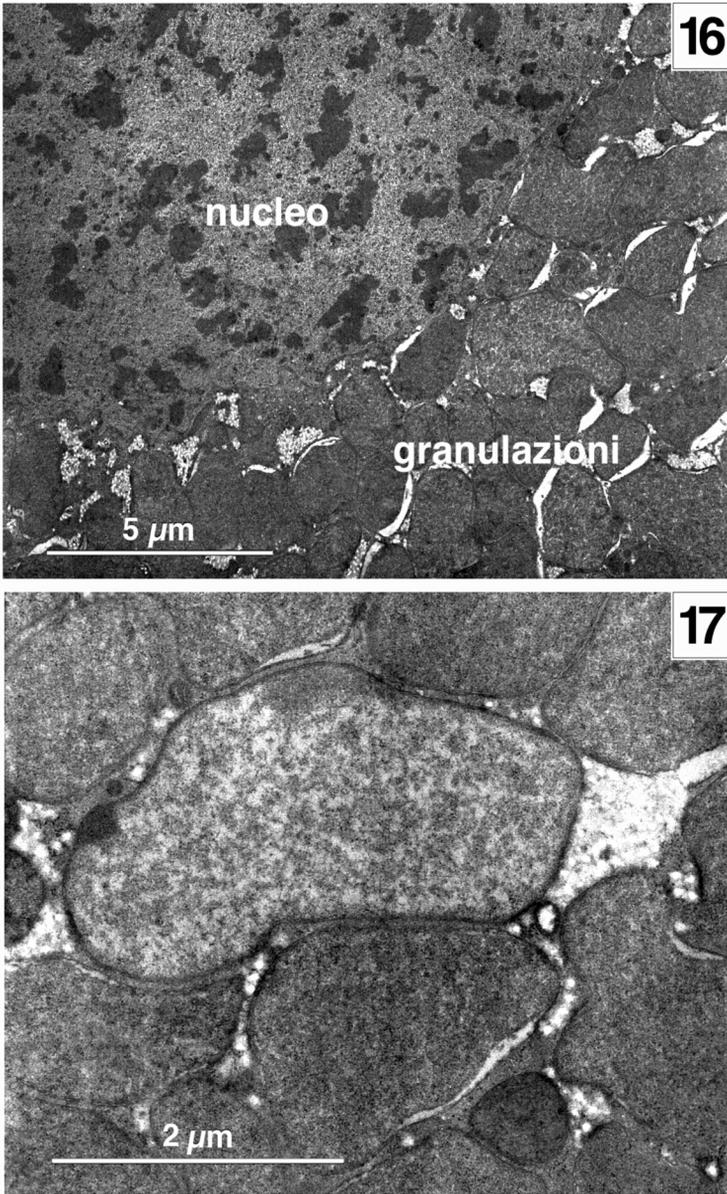
FEMMINE ADULTE

L'esame al MET mostra la mancanza di polarità nelle cellule di Holmgren di *Psilothrix viridicoerulea* (figg. 14-15), nelle quali il citoplasma è uniforme-

⁽⁶⁾ FIORI (1971) ha studiato dettagliatamente il ciclo biologico di questa specie ma non ha precisato quanti ne siano gli stadi larvali



Figg. 14-15 - Larva matura di *Psilotbrix viridicoerulea* (Geoffr.) - Immagini al TEM delle cellule di Holmgren, nei dintorni del nucleo e in periferia.



Figg. 16-17 - Larva matura di *Psilotobrix viridicoerulea* (Geoffr.) - Immagini al TEM delle granulazioni citoplasmatiche all'interno di una delle cellule di Holmgren.

mente pieno di granulazioni. Nel sottile spazio fra queste si notano membrane, forse riferibili al reticolo endoplasmico. I vacuoli si osservano più numerosi alla periferia delle singole cellule.

Le granulazioni hanno forma irregolare e sono moderatamente osmiofile; alcune di esse, sparse fra le altre, mostrano una densità nettamente minore (fig. 14, 16, 17); esse non presentano caratteristiche che le possano far considerare microrganismi, cioè, né la parete ben definita, che avrebbero se fosse batteri, né il nucleo, che sarebbe evidente se si trattasse di cellule eucariote di miceti.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dalle nuove osservazioni, l'organo di Holmgren risulta presente in varie specie della subf. Dasytinae, ma non in tutte le specie; esso non è proprio delle femmine adulte, ma è posseduto anche dai maschi e dalle larve di entrambi i sessi; esso manifesta dimorfismo sessuale negli adulti ma non nelle larve. Nell'ambito di ciascun grappolo, le cellule di Holmgren mostrano differenze di opacità citoplasmatica che sono riferibili allo stato funzionale delle singole cellule. Le differenze di turgore cellulare fra gli adulti nel corso dello stagione riproduttiva dipendono verosimilmente dall'età, più o meno avanzata, dei singoli individui.

Il presunto contenuto in microrganismi non emerge neppure dall'esplorazione ultrastrutturale. Qualche studioso di endosimbiosi potrebbe avanzare l'ipotesi che le granulazioni citoplasmatiche siano microrganismi molto modificati. Però, la presenza dell'organo anche nei maschi e nelle larve viene comunque a indebolire la tesi che si tratti di un dispositivo per la trasmissione di simbionti alla progenie.

In accordo con le opinioni di HOLMGREN (l.c.) e di STAMMER (1952), i dati citologici suggeriscono una funzione ghiandolare delle cellule a grappolo. Le differenze di opacità citoplasmatica fra cellula e cellula sembrano indicare un differente stato funzionale, rispecchiando le variazioni di colorabilità già note per gli enociti di altri Insetti (cfr. CHAUVIN, 1968: 526). Nello stadio adulto, le variazioni di turgore cellulare e, infine, la regressione dell'organo durante la stagione riproduttiva possono essere considerate in rapporto alla maturazione degli ovari e dei testicoli.

L'affermazione di Holmgren, che le cellule a grappolo sono "enociti", va riconsiderata alla luce dei dati bibliografici che nel corso del secolo si sono accumulati in quantità.

NOIROT *et al.* (1974: 63) e CAVENEY *et al.* (1982: 445) definiscono gli enociti come "cellule ghiandolari tegumentali che mancano di contatto fisico con la

cuticola". Ma, accanto a questa definizione molto generale, la letteratura ci propone una lunga serie di caratteristiche, morfologiche, istologiche e funzionali, quasi tutte con possibilità alternative ed eccezioni.

Secondo WIGGLESWORTH (1974: 447-451), gli enociti sono cellule possedute in generale dagli Insetti Pterigoti, che possono trovarsi disperse nell'epidermide o nel corpo adiposo, oppure raggruppate presso gli stigmi respiratori, o anche distribuiti a bande lungo i tronchi tracheali; possono essere di forma uniformemente globosa oppure variamente lobata, di dimensioni spesso grandi ma anche piccole; a volte contengono un pigmento giallo, ma più spesso sono incolori; sovente hanno il citoplasma denso, eosinofilo e omogeneo, ma possono averlo di aspetto granulare o vacuolato, infiltrato di corpi cristallini visibili a fresco e di granuli di pigmenti; possono subire variazioni cicliche nella taglia con tendenza all'incremento volumetrico in preparazione alla muta e alla disgregazione finale; si trovano in uno stato ipertrofico in larve parassitizzate e negli afidi durante la lisi dei simbionti, della quale sono ritenuti responsabili; possono accumulare pigmento in insetti di età avanzata; potrebbero agire rimuovendo sostanze di rifiuto o tossine dal sangue o, più in generale, regolando la composizione fisico-chimica del sangue stesso; avrebbero un ruolo nell'accrescimento e nello sviluppo delle gonadi. CAVENEY *et al.* (l.c.) precisano alcune caratteristiche citologiche generali degli enociti: assenza di polarità distinta e di giunzioni intercellulari. CHAUVIN (l.c.), riferendosi all'Ape, attesta la elevata poliploidia degli enociti nelle regine.

Ancora sugli aspetti fisiologici, WIGGLESWORTH (1970; 1974; 1976) ritiene che gli enociti siano una delle fonti dei precursori della cuticolina e che essi abbiano la funzione di elaborare sostanze intermedie del metabolismo, riversandole nel sangue; inoltre, egli riferisce del possibile intervento degli enociti nella produzione della cera nell'Ape operaia e nella sintesi di idrocarburi in *Periplaneta americana* e *Schistocerca gregaria*; TREMBLAY (1960), osservandone in *Pseudaulacaspis pentagona* lo stretto legame con i micetociti, considera la possibilità che gli enociti intervengano nella regolazione del carico di simbionti; ROMER *et al.* (1974) hanno verificato che *in vitro* gli enociti producono β -ecdisione e metabolizzano α -ecdisione.

Tutte queste possibilità richiamano la constatazione di GRANDI (1951: 205) che "il problema degli enociti è uno dei più oscuri della fisiologia degli Insetti" e conducono alla ovvia conclusione che il termine "enocita" è povero di significato citologico quando non venga precisata la specie di cui si parla. Nel caso qui trattato, gli "enociti di Holmgren" sono definibili come cellule di grandi dimensioni, di forma costantemente globosa, con grande nucleo e citoplasma granulare, prive di polarità, disposte in grappoli non metamerici,

in connessione con il canale alimentare nelle larve e nelle femmine, liberi nell'emocele nei maschi, con tendenza a regredire negli adulti mentre questi raggiungono la maturità sessuale.

RIASSUNTO

Il classico organo femminile di *Dasytes niger*, qui indicato come "organo di Holmgren", viene rivisto in merito al suo significato funzionale dopo l'acquisizione di nuovi dati sulla sua presenza negli adulti dei due sessi di altre specie di Meliridi e nelle larve di *Psilothrix viridicoerulea*. Lo studio ultrastrutturale conferma la tesi originale dello scopritore, riguardo alla natura ghiandolare dell'organo e, data la mancanza di strutture riferibili a microrganismi, esclude la tesi di un suo ruolo nell'endosimbiosi.

Viene fatta una rassegna bibliografica sulle caratteristiche dell'enocita, dalla quale risultano attribuite a questo termine un gran numero di caratteristiche diverse e variabili che lo rendono povero di significato senza l'indicazione della specie considerata.

Parole chiave: Melyridae, simbiosi, enociti, ultrastruttura.

OPERE CONSULTATE

- BUCHNER P., 1965 - Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. Intersciences Publ., 909 pp.
- CAVENEY S. & R. BERDAN, 1982 - Selectivity in junctional coupling between cells of Insect tissues. In: "Insect ultrastructure", King & Akai edd., Plenum Press, pp. 434-465.
- CHALVIN R., 1968 - Trait  de biologie de l'Abeille. Masson & C. edd., Paris, vol. I, 547 pp.
- DEAN R. L., J. V. COLLINS & M. LOCKE, 1985 - Oenocytes. In: Comprehensive Insect physiology, biochemistry and pharmacology, Kerkut & Gilbert edd., Pergamon Press, 1: 172.
- FIORI G., 1971 - Contributi alla conoscenza morfologica ed etologica dei Coleotteri. IX. *Psilothrix viridicaeruleus* (Geoffr.) (Melyridae, Dasytinae). *Studi Sassaresi*, 19: 3-70.
- GRANDI G., 1951 - Introduzione allo studio dell'Entomologia. Ed. Calderini Bologna, vol. I, 950 pp.
- HOLMGREN N., 1902 - Ueber die Exkretionsorgane des *Apion flavipes* und *Dacytes niger*. *Anat. Anz.*, 22: 225-239.
- LHOSE G. A., 1979 - Familie: Melyridae. In: Freude, Harde & Lhose edd. "Die K fer Mitteleuropas", Goecke & Evers, Krefeld, vol. 6, 367 pp.
- NARDON P. & A. M. GRENIER, 1989 - Endocytobiosis in Coleoptera: biological, biochemical, and genetic aspects. In "Insect endocytobiosis: Ectosymbiosis, physiology, Ectosymbiosis, evolution", Schwemmler & Gassner edd., CRC Press Inc., Florida, pp. 175-216.
- NOIROT C. & A. QUENNEDY, 1974 - Fine structure of insect epidermal glands. *Ann. Revue Entomol.*, 19: 61-80.
- ROMER F., H. EMMERICH & J. NOWOCH, 1974 - Biosynthesis of ecdisones in isolated prothoracic glands and oenocytes of *Tenebrio molitor*. *J. Insect Physiol.*, 20: 1975-1988.
- SNODGRASS R. E., 1935 - Principles of Insect morphology. McGraw-Hill Book Co.Inc., New York and London, 667 pp.

- STAMMER H. J., 1933 - Neue Symbiosen bei Coleopteren. *Verb. deut. zool. Ges. Leipzig*, 35: 150-155.
- STAMMER H. J., 1952 - Die Verbreitung der Endosymbiose bei den Insekten. *Tijdschr. Entomol.*, 95: 23-42.
- TREMBLAY E., 1960 - Ciclo cromosomico e simbiosi endocellulari nella *Diaspis* (= *Pseudaulacaspis*) *pentagona* Targ. *Boll. Lab. Entomol. agr. Portici*, 18: 149-227.
- WIGGLESWORTH V. B., 1970 - Structural lipids in the insect cuticle and the function of the oenocytes. *Tissue & Cells*, 2: 155-179.
- WIGGLESWORTH V. B., 1974 - The principles of Insect physiology. Chapman & Hall edd., London, 827 pp.
- WIGGLESWORTH V. B., 1976 - The distribution of lipid in the cuticle of *Rhodnius*. In: The insect integument, Elsevier Sc. Publ. Co., pp. 89-106.