

东方蜜蜂背单眼的结构和胚后发育^{*}

李兆英^{**}

(陕西教育学院生物科学与技术系 西安 710061)

摘 要 本研究通过形态解剖和 BrdU 免疫组织化学方法对东方蜜蜂 *Apis cerana* Fabricius 背单眼的胚后发育过程进行了比较研究, 结果表明: 东方蜜蜂的每一个背单眼都包括角膜晶体、角膜生成细胞、小网膜细胞以及后部的单眼神经。蜜蜂的背单眼起源于头壳上皮; 其胚后发育的高峰期集中在蛹发育的前 3 d; 其新细胞主要来源于上皮细胞和圆锥形单眼囊周围细胞的有丝分裂; 单眼同脑的联系在 P1 期前后就已经建立; 角膜晶体的形成在 P5 以后。说明单眼的结构和发育同其功能密切相关。

关键词 东方蜜蜂, 背单眼, 结构, 胚后发育

Structure and postembryonic development of the dorsal ocellus of the honeybee (*Apis cerana*)

LI Zhao-Ying^{**}

(Department of Biological Science and Technology, Shaanxi Institute of Education, Xi'an 710061, China)

Abstract The structure and postembryonic development of the dorsal ocellus of *Apis cerana* Fabricius was studied by anatomical observation and BrdU immunohistochemistry. The results show that each ocellus consisted of cornea, corneagenous layer, reticular cells and ocellar nerve. The 3 ocelli of the adult honeybee were of epidermal origin. The development of the ocellus was most active during P1 – P3. New cells were the products of mitotic divisions occurring in the epidermal cells and ocellar capsule margins. In the P1 retinula, axons were found making contact with interneurons from both the ocellar nerve and the brain. The cornea appeared after the P5 stage. Ocellar structure and development is closely related to function.

Key words *Apis cerana*, dorsal ocellus, structure, postembryonic development, BrdU

昆虫的视觉器官包括复眼和单眼两大类, 复眼是昆虫主要的视觉器官, 单眼是视觉的辅助器官。单眼又有背单眼 (dorsal ocellus) 和侧单眼 (lateral ocellus) 2 种。背单眼是昆虫成虫和不完全变态类昆虫的若虫或稚虫所具有的单眼, 大部分的昆虫在成虫期同时具备单眼和复眼, 两者之间交互作用, 调节着昆虫的运动及生理活动 (刘红霞和彩万志, 2007)。

对背单眼结构和发育的研究, 前人已做过一些工作。Ruck 和 Edwards (1964)、Dowling 和 Chappell (1972) 对蜻蜓的单眼进行了研究; Toh 和 Kuwabara (1974)、Toh 等 (1971) 对蜜蜂和苍蝇单眼的细微结构进行了研究; Weber 和 Renner (1976)

对蟑螂背单眼的结构进行了研究。Goodman (1981) 详细的研究了昆虫背单眼的组织结构和生理特点。

不完全变态的昆虫种类, 单眼在幼虫阶段就已经出现或成形。在不同的昆虫种类, 单眼的发育速度有所不同, 如蝗虫和蜉蝣, 在幼虫早期就已经形成了明显的带有透镜的单眼; 而在石蝇和蜻蜓, 一直到成虫形成之前, 只在表皮下具有色素斑或是反光层的模糊的痕迹 (Goodman, 1981)。Mobbs (1979) 指出, 蝗虫成虫的 3 个单眼起源于表皮的 4 个胚胎原基, 侧面的 2 个原基形成 2 个侧单眼, 中间的 2 个融合形成单个的中单眼。Toh 和 Sagara (1984) 对蟑螂 *Periplaneta americana* 单眼的

^{*} 资助项目: 陕西省教育厅科技计划项目 (11JK0618)、陕西教育学院科研基金重点项目 (2012KJ006)。

^{**}E-mail: apis2002@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-04-18, 接受日期: 2011-06-02

胚后发育过程进行了较详细的研究,描述了蟑螂 2 个单眼的基本结构;猎蝽 *Triatoma infestans* 的成虫在 2 个复眼的后面有 2 个单眼。发育完好的单眼有明显的球面透镜,直径大约在 455 μm ,但是在幼虫期,单眼从外表来看并不明显,通常在发育结束形成成虫时才具有其典型的特征 (Insausti and Lazzari, 2002)。而对于完全变态昆虫种类背单眼发育状况的研究进行得较少。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的蜜蜂预蛹 (prepupa, PP)、蛹 (pupa, P) 和成虫均购自秦岭汤峪东方蜜蜂养殖场。所取材料均来自同一蜂群。

1.2 研究方法

1.2.1 组织化学 蜜蜂工蜂的预蛹、蛹和成虫多聚甲醛 4℃ 固定过夜。梯度酒精脱水,二甲苯透明。石蜡包埋,横向或纵向连续切片,切片厚度 5~7 μm ,切片裱于涂有多聚赖氨酸的载玻片上,烘干备用。切片脱蜡后复水, H. E 染色, OLYMPUS (BX51) 显微镜观察拍照。

1.2.2 BrdU 掺入处理 对取得的蜜蜂预蛹、蛹和成虫的活体,从触角下方直接注射约 3 μL 浓度为 25 mg/mL 的 BrdU (B9002, Sigma)。

1.2.3 BrdU 免疫组织化学染色 将 BrdU 处理过的预蛹、蛹和成虫各 3~5 头, 4% 多聚甲醛 4℃

固定 8 h。70%、80%、90%、95%、100% 梯度酒精脱水,石蜡包埋,横向连续切片,厚度为 7 μm 。切片裱于涂有多聚赖氨酸的载玻片上,烘干备用。

切片用二甲苯脱蜡,入梯度酒精复水;抗原修复, PBS 洗 3 次; 3% 过氧化氢封闭内源性酶 10 min, TBS 洗 3 次; 滴加正常山羊血清封闭液, 37℃ 30 min; 滴加小鼠 BrdU 单克隆抗体 (1/200) (ab8039, ABCAM), 湿盒中 4℃ 孵育过夜, PBS 洗 3 次。滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG, 37℃ 120 min, PBS 洗 3 次; 滴加过氧化物酶 37℃ 孵育 30 min, PBS 洗 3 次; DAB 显色后镜检, 中性树胶封片, Nikon 数码显微成像系统 (DS-5M) 拍照。

阴性对照以 PBS 代替一抗。

2 结果与分析

2.1 东方蜜蜂单眼的组织结构

东方蜜蜂成虫有 3 个背单眼,位于额的上部,呈倒三角形排列。每一个背单眼的顶部是略微突出、类似球形的角膜晶体 (corneal lens, C), 最宽处直径约 (19.5 ± 2.5) μm , 深约 (11 ± 1) μm 。角膜晶体下面是角膜生成细胞 (corneagenous cells, Cc), 这些细胞个体小且排列紧密。其下是含有色素颗粒的小网膜细胞 (retinular cells, Rc), 每只小网膜细胞表面特化成感杆束 (rhabdom, Rh) (图 1)。小网膜细胞伸出轴突向单眼的后部延伸,在神经纤维网区 (neuropilar zone, N) 同二级神经元

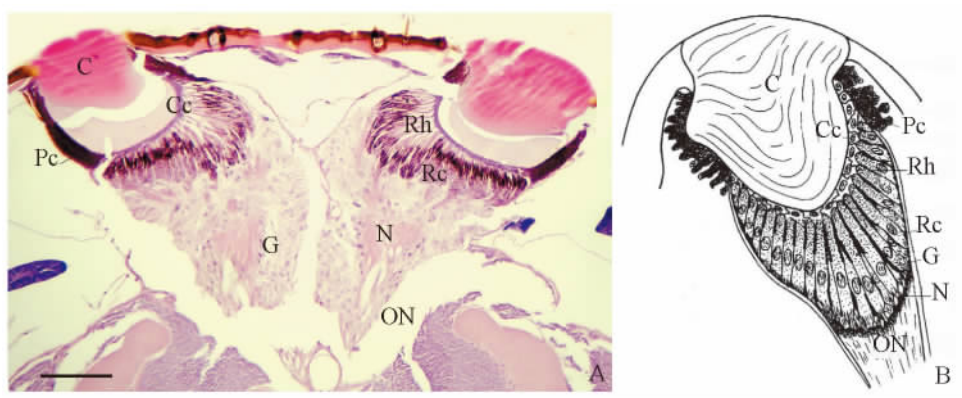


图 1 东方蜜蜂背单眼的结构

Fig.1 Structure of the dorsal ocellus in *Apis cerana*

A. 东方蜜蜂背单眼的纵切结构图 longitudinal section through the dorsal ocelli of the *Apis cerana*. 标尺 scale

bar = 100 μm ; B. 背单眼模式图 schematic drawing of the dorsal ocellus (仿 Insausti and Lazzari, 2002)。

C: 角膜晶体 corneal lens; Cc: 角膜生成细胞 corneagenous cells; G: 神经胶质细胞 glial cells; N: 神经纤维网区 neuropilar zone; ON: 单眼神经 ocellar nerve; Pc: 色素细胞 pigment cells; R: 视网膜细胞 retinula cells; Rh: 感杆束 rhabdom.

末梢形成突触联系,这些二级神经元的细胞体位于脑中。每个单眼周围被薄层鞘状细胞或基膜所包围。

2.2 东方蜜蜂背单眼的胚后发育过程

东方蜜蜂的背单眼是从预蛹期开始发育的。在预蛹早期,蜜蜂额部顶端的表皮增厚,表皮细胞延长,开始出现单眼的雏形,BrdU 标记显示,有部分细胞开始进行活跃的有丝分裂(图 2:A)。P1 ~ P2 期,单眼的生长非常活跃,细胞数量明显增加。P1 时,表皮细胞快速分裂,形成了长圆柱形的增殖细胞带。BrdU 标记的分裂细胞位于整个增殖细胞区,细胞不断的分裂使单眼细胞不断增加,并开始分化,出现了最初的小网膜细胞(图 2:B)。由小网膜细胞的末端发出轴突聚集成束,构成的小眼神经向前脑方向延伸(图 2:C);同时,前脑发出的二级神经元的末梢也在向单眼延伸,最终它们之间会形成突触联系(图 2:E)。BrdU 标记显示,在神经束中有许多处于分裂期的细胞(图 2:D)。

P2 期,上皮细胞分裂形成了圆锥形的单眼囊,BrdU 标记在单眼囊的边缘有大量的分裂细胞,单眼囊的上部向下凹陷,形成弧形单眼杯,周围是胞体较小,核着色较深的前小网膜细胞(图 2:G)。单眼和前脑之间已经形成神经联系,这些单眼神经束有两种类型,一种较细,直径约为 $(0.7 \pm 0.2) \mu\text{m}$,它延伸的较快,已在单眼和脑之间形成联系;另一种较粗,直径约 $(3.0 \pm 0.5) \mu\text{m}$,有大量的处于分裂期的细胞(图 2:F)。小网膜细胞的另一端开始形成感杆束。但是,小网膜细胞的发育还不完全。

P3 期,小网膜细胞发育完全,细胞内部出现色素颗粒,在小网膜细胞轴突的远端区形成了神经纤维网区(图 2:H)。在单眼囊的顶端周围的上皮,还有细胞处于分裂阶段,它们持续的分裂使小网膜细胞的数量不断增加,但是在圆锥形的单眼囊边缘的细胞中,分裂细胞已经很少(图 2:K)。从中单眼的横切图看,具有色素的小网膜细胞聚集在单眼囊弧形的顶部,有几个分裂细胞分散在周围(图 2:I);此时,外观特化的角膜晶体还没有形成。到 P5 时,单眼的特征已类似于成虫,但是单眼角膜的直径,网膜细胞数量以及单眼神经纤维网都比成虫少。在这一时期,小网膜细胞中充满了色素颗粒;由表皮细胞形成的角膜生成细胞

开始向外形成角膜;此时 BrdU 标记的增殖细胞只有零星的几个散布在单眼区域(图 2:J)。

3 讨论

3.1 不同昆虫种类背单眼的比较

不同的昆虫种类,其背单眼的结构不同。就背单眼中网膜细胞的数量而言,蜜蜂成虫单眼中的小网膜细胞的数量大约有 800 个,少于蟑螂成虫 10 000 个,这主要是因为蜜蜂成虫的单眼(直径约 $17 \sim 22 \mu\text{m}$)明显小于蟑螂(直径约 $500 \sim 700 \mu\text{m}$),所以单位面积内网膜细胞的数量蜜蜂却远多于蟑螂。蝗虫背单眼的网膜细胞的数量与蜜蜂接近,约 800 ~ 1 000 个(Mobbs, 1979)。作为全变态的昆虫种类,蜜蜂背单眼的结构同其它的全变态种类,如蚂蚁 *Formica pratensis* (Moser *et al.*, 2004)、粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* (Dow and Eaton, 1976) 以及不全变态的半翅目种类猎蝽 *T. infestans* (Insausti and Lazzari, 2002) 等较为相似,但是同美洲大蠊 *P. americana* (Weber and Renner, 1976) 及一种麻蝇 *Boettcherisca peregrina* (Toh *et al.*, 1971) 等种类的结构有很大差别。由此可见,背单眼的结构与昆虫的发育类型以及它们的发育方式似乎并没有直接的关系。单眼的结构可能更多的是同昆虫的生活习性有关。来自于蜜蜂 (Kelber *et al.*, 2006)、胡蜂 (Warrant *et al.*, 2004) 和蚂蚁 (Moser *et al.*, 2004) 的大量的证据显示了昆虫单眼的大小同光强度有着密切的关系:在弱光下活动的昆虫种类一般都具有较大的单眼,如夜间活动的一些蜂类,其单眼的直径可达到 0.5 mm;夜间活动的汗蜂 *Megalopta genalis* 的单眼感杆束明显大于白天活动的胡蜂 *Apoica pallens*,并且在视网膜中所占的比例更大,这样可以使它们在夜间获得更多的光线 (Warrant *et al.*, 2004)。

不同的昆虫种类,其背单眼的胚后发育过程也有所不同。从对蜜蜂单眼胚后发育过程的观察结果来看,蜜蜂背单眼胚后发育的高峰期集中在蛹发育的前 3 d。在这段时间内,蛹头壳顶端的表皮细胞快速增殖,形成了圆锥形的单眼囊;随后,单眼囊上部边缘的表皮细胞继续分裂,形成的细胞进入单眼杯的中间区域,成为未分化细胞群,它们将形成单眼的网膜细胞、角膜晶体以及神经胶质细胞。同时,单眼神经的向内生长同脑部中间

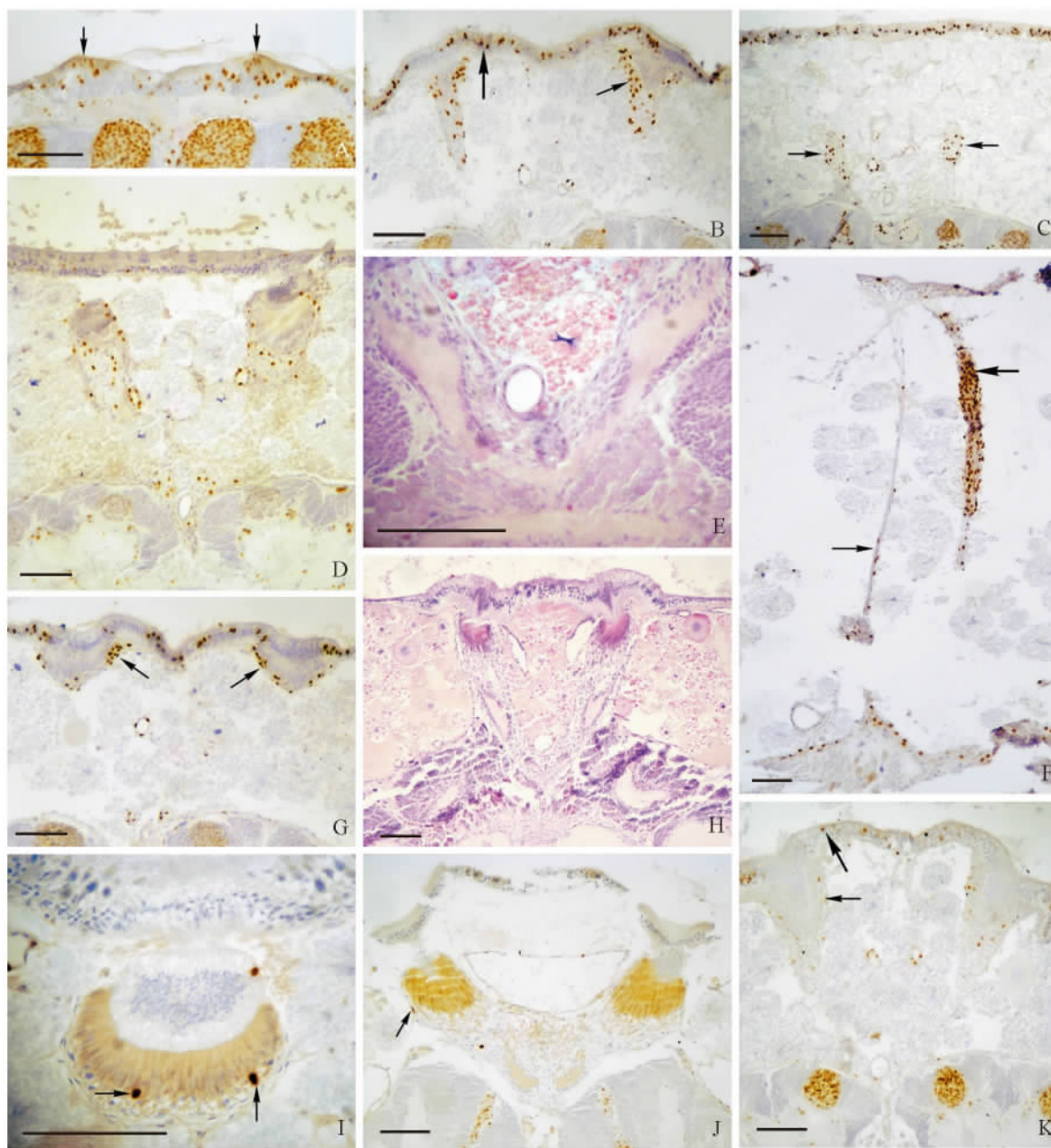


图 2 东方蜜蜂背单眼的胚后发育

Fig. 2 Postembryonic development of the dorsal ocellus in *Apis cerana*

A. BrdU 标记工蜂 PP 的头部前端。箭头指示了表皮隆起形成的单眼雏形, 内有活跃分裂的细胞。BrdU-labeled head of the prepupa. The arrows indicate rudiments of the dorsal ocelli, in which there are dividing cells.

B. BrdU 标记工蜂 P1 的背单眼。大箭头指示了活跃分裂的表皮细胞; 小箭头指示了单眼囊周围分裂的细胞。BrdU-labeled dorsal ocelli of the day 1 pupa. The large arrow indicates epidermal dividing cells and the small arrow indicates dividing cells around ocellar capsule.

C. BrdU 标记工蜂 P1 的头部前端。箭头指示了脑前部的神经纤维。BrdU-labeled dorsal ocelli of the day 1 pupa. The arrows indicate nerve fiber.

D. BrdU 标记工蜂 P1 晚期的背单眼。BrdU-labeled dorsal ocelli of late day 1 pupa.

E. 工蜂 P1 晚期脑前端的组织结构, 显示了早期的单眼神经纤维网。structure of the dorsal ocelli of late day 1 pupa. It shows early ocellar neuropil.

F. BrdU 标记工蜂 P2 的头部前端。大箭头指示了粗的神经束;小箭头指示了细的神经束。BrdU-labeled dorsal ocellus of day 2 pupa. The large arrow indicates thick bundle of axons and the small arrow indicates thin bundle of axons.

G. BrdU 标记工蜂 P2 的背单眼。箭头指示了单眼囊周围分裂的细胞。BrdU-labeled dorsal ocelli of day 2 pupa. The arrows indicate dividing cells around ocellar capsule.

H. 工蜂 P3 背单眼的组织结构。structure of the dorsal ocelli of day 3 pupa.

I. BrdU 标记工蜂 P3 的中单眼。箭头指示了单眼周围分裂的细胞。BrdU-labeled middle ocelli of day 3 pupa. The arrows indicate dividing cells around ocellus.

J. BrdU 标记工蜂 P5 的背单眼。箭头指示了单眼边缘少数的分裂细胞。BrdU-labeled dorsal ocelli of day 5 pupa. The arrow indicates few dividing cells.

K. BrdU 标记工蜂 P3 的背单眼。大箭头指示了表皮上的分裂细胞;小箭头指示了单眼囊周围的分裂细胞。BrdU-labeled dorsal ocelli of day 3 pupa. The large arrow indicates epidermal dividing cells and the small arrow indicates dividing cells around ocellar capsule.

标尺 scale bar = 100 μm .

神经元的向外生长都已经开始。它们在神经胶质细胞的引导下,相互接触并形成突触联系。蜜蜂单眼的细胞数量在 2 ~ 3 d 内大量增加,新细胞主要来源于表皮细胞以及圆锥形单眼囊周围细胞的分裂增殖。

对于像蜜蜂这样的完全变态的昆虫种类,背单眼虽然从预蛹期就开始发育,但是从外观能看到明显的角膜晶体要到蛹发育的第 5 天以后。而不完全变态的昆虫种类,单眼往往在幼虫阶段就已经出现或形成。如蜉蝣目的一些种类,1 龄幼虫就能看到带有明显透镜的单眼;蟑螂在卵刚刚孵化的时候,在单眼区表皮之下就能看到绒毡层细胞(tapetal cells),并且在整个幼虫阶段都能看到它的生长(Goodman, 1981)。在许多昆虫种类,如蝗虫(Mobbs, 1979),蚂蚁 *Atta cephalotes* (Weber, 1947) 等,它们的中单眼是由 2 个单眼原基融合而来的,或者单眼原基不融合而形成一对中单眼。但是在蜜蜂的中单眼发育中,没有观察到这种现象发生。

Mobbs (1979) 对蝗虫 *Schistocerca gregaria* 的单眼发育进行观察发现,早期形成的小网膜细胞在前脑和单眼之间形成的神经联络中起到引导的作用。Ton 和 Umio (1988) 对美洲大蠊的研究发现,在蟑螂超过 10 000 根的小网膜细胞轴突中,只有约 20 ~ 30 根延伸至脑,那些长的轴突可能在幼虫发育早期引导了其它轴突的生长。Bate (1976) 描述了在蝗虫触角和肢芽的早期胚胎发育中,有一对“引导”神经元(“pioneer” neurons),它们为后来的神经元的生长提供了引导的作用,它们帮助视网膜建立了同视神经节层之间的联系。Toh 和

Umio (1988) 的研究发现,蟑螂发育早期,一部分小网膜轴突延伸至脑,同脑中的 L 神经元形成突触联系,这可能对单眼神经的形态发生至关重要,而真正的小网膜轴突同中间神经元的功能联结可能开始于幼虫发育后期。在对东方蜜蜂单眼早期发育的观察中,也发现了两种类型的轴突束,一种类型较细,且生长快,在蛹早期就已经同前脑建立联系;另一类轴突束的直径大约是前一种的 4 倍,它的生长速度较慢且细胞增殖活跃,大约在 P2 ~ P3 时同前脑二级神经元形成突触联系。但是那些细的神经纤维是否就是“引导”纤维,还需要进一步的实验证明。

3.2 昆虫单眼和复眼的比较

Toh 和 Umio (1988) 指出,不全变态种类,如美洲大蠊和一种长蝽 *Oncopeltus fasciatus*, 它们复眼的生长是通过已存在的小眼体积的扩大以及眼前部边缘新的小眼的不断增加实现的,而这些新的小眼的起源自头壳表皮。Shelton 等(1977)也都通过移植实验证明了新小眼的上皮起源。对蜜蜂单眼的胚后发育的观察也显示了,其背单眼起源在头壳上皮的一部分,单眼新细胞的产生主要来自上皮细胞的有丝分裂。到蛹发育中期,单眼体积明显增加,这同已存在细胞的体积的增大以及神经胶质细胞数量的增加有很大的关系。Cymer 和 Edwards (1967) 的实验显示了蟋蟀 *Acheta domesticus* 在神经纤维网发育末期,神经胶质细胞的数量大约增加了 17 倍,但是神经元的数量却没有大的变化。神经胶质细胞数量的增加,可以为细胞提供更多的营养,为以后的神经活动打下基

础;单眼体积的增加还包括越来越多的神经末梢使感杆束的体积明显增加。单眼的这种体积扩展类似于复眼的小眼。与复眼相比,单眼具有巨大神经元和少量的中间神经元,这使它们的信号传递更加迅速,来自单眼的信息能够快速地被传达到胸部的运动中枢(Guy *et al.*, 1979)。

从总体上来看,单眼结构的发育略早于复眼(李兆英和奚耕思,2010):东方蜜蜂复眼视觉细胞的形成分化大约在 P2 ~ P3,视神经向视叶的延伸大约在 P5;视杆的形成大约在 P7 之后;只有角膜晶体的形成早于单眼,在 P2 左右已经出现。Mobbs(1979)的研究表明,在蝗虫 1 龄幼虫的单眼中补充了大量的中间神经元,这些中间神经元与网膜细胞形成突触联结,这些突触在性质上类似于成年昆虫。但是还不能确定这些突触的功能。单眼与复眼在胚后发育过程中的差异可能同它们的功能有关,有证据表明,背单眼对昆虫昼夜节律的调控以及神经分泌系统的分泌活动都有调节作用,但是还没有直接的证据能够证明,背单眼对全变态昆虫蛹的发育具有调控的作用,更何况蜜蜂背单眼的角膜晶体是在蛹发育 5 d 之后才逐渐形成的。

参考文献(References)

- Bate CM, 1976. Pioneer neurones in an insect embryo. *Nature*, 260 (5546): 54—56.
- Dow MA, Eaton JL, 1976. Fine Structure of the ocellus of the cabbage looper moth (*Trichoplusia ni*). *Cell Tissue Res.*, 171 (4): 523—533.
- Dowling JE, Chappell RL, 1972. Neural organization of the median ocellus of the dragonfly. II. Synaptic structure. *J. Gen. Physiol.*, 60 (2): 148—165.
- Goodman LJ, 1981. Organisation and physiology of the insect dorsal ocellar system // Autrum H (ed.). *Handbook of Sensory Physiology*. Vol. VII/6C. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 201—286.
- Guy RG, Goodman LJ, Mobbs PG, 1979. Visual interneurons in the bee brain: synaptic organisation and transmission by graded potentials. *J. Comp. Physiol.*, 134 (3): 253—264.
- Gymer A, Edwards JS, 1967. The development of the insect nervous system. I. An analysis of postembryonic growth in the terminal ganglion of *Acheta domesticus*. *J. Morphol.*, 123 (1): 191—197.
- Insausti TC, Lazzari CR, 2002. The fine structure of the ocelli of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Tiss. Cell*, 34 (6): 437—449.
- Kelber A, Warrant EJ, Pfaff M, Wallén R, Theobald JC, Weislo W, Raguso R, 2006. Light intensity limits the foraging activity in nocturnal and crepuscular bees. *Behav. Ecol.*, 17 (1): 63—72.
- Mobbs PG, 1979. Development of the dorsal ocelli of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). *Int. J. Insect. Morphol. Embryol.*, 8 (5/6): 237—255.
- Moser JC, Reeve JD, Bento JMS, Della Lucia TMC, Cameron RS, Heck NM, 2004. Eye size and behaviour of day-and night-flying leafcutting ant alates. *J. Zool.*, 264 (1): 69—75.
- Ruck P, Edwards LA, 1964. The structure of the insect dorsal ocellus. I. General organization of the ocellus in dragonflies. *J. Morphol.*, 115 (1): 1—26.
- Shelton PMJ, Anderson HJ, Eley S, 1977. Cell linkage and cell determination in the developing compound eye of the cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 39: 235—252.
- Toh Y, Kuwabara M, 1974. Fine structure of the dorsal ocellus of the worker bee. *J. Morphol.*, 143 (3): 285—306.
- Toh Y, Sagara H, 1984. Dorsal ocellar system of the american cockroach I. Structure of the ocellus and ocellar nerve. *J. Ultrastruct. Res.*, 86 (2): 119—134.
- Toh Y, Tominaga Y, Kuwabara M, 1971. The fine structure of the dorsal ocellus of the fleshfly. *J. Electron Microscopy*, 20 (1): 56—66.
- Toh Y, Umio Y, 1988. Postembryonic development of the dorsal ocellus of the Americana cockroach. *J. Comp. Neurol.*, 269 (2): 157—167.
- Warrant EJ, Kelber A, Gislén A, Greiner B, Ribi W, Weislo WT, 2004. Nocturnal vision and landmark orientation in a tropical halictid bee. *Curr. Biol.*, 14 (15): 1309—1318.
- Weber G, Renner M, 1976. The ocellus of the cockroach, *Periplaneta americana* (Blattariae), receptory area. *Cell Tissue Res.*, 168 (2): 209—222.
- Weber NA, 1947. Binary anterior ocelli in ants. *Biol. Bull.*, 93 (2): 112—213.
- 李兆英, 奚耕思, 2010. 中华蜜蜂工蜂复眼的胚后发育研究. 陕西师范大学学报(自然科学版), 38 (3): 60—64.
- 刘红霞, 彩万志, 2007. 昆虫单眼的结构和功能. 昆虫知识, 44 (4): 603—607.