

ULTRAESTRUCTURA DEL ESPERMATOFORO DE Hemidiaptomus roubaui
(COPEPODA, CALANOIDA).

Enric Ribes

Unitat de Biologia Cel.lular. Departament de Bioquímica i Fisiologia
Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.
Avda. Diagonal, 645. 08028 Barcelona. Spain.

Abstract

Ultrastructure of spermatophore in Hemidiaptomus roubaui (Copepoda, Calanoida).

The spermatophore of the calanoid copepod Hemidiaptomus roubaui presents a typical tubular-shape (a straight banana shape) containing the spermatozoa and the seminal secretions. On leaving the male genital pore the mature spermatophore has a length of 600-665 μm and a maximum diameter of 130-140 μm . The spermatophore of H. roubaui presents three morphologically defined areas: the wall, the peripheral region and the central region or core. The wall of the spermatophore which reaches a thickness of 2.5 - 3.5 μm , has a series of concentric layers with different electrodensities constituted by a fibrillar material arranged in arches. The peripheral region is a layer 5-7 μm thick of semi-liquid nature, which contains the spermatozoa. Finally, the central region or core of the spermatophore is composed of a homogeneous substance which includes a series of granules.

Key words: spermatophore, copepoda, ultrastructure.

Introducción

La formación del espermatóforo y los mecanismos copuladores se consideran como un requisito adaptativo para que tenga lugar la transición de una forma de vida acuática a una forma de vida terrestre (GHILAROV, 1956, 1959; SCHALLER, 1965, 1979; SHAROV, 1965, 1966). La presencia de espermatóforos es muy frecuente entre los artrópodos (SCHALLER, 1979) y en especial en el grupo de los crustáceos.

Los espermatozoides de numerosos crustáceos están agrupados en "paquetes de espermatozoides" a modo de contenedores, que son los espermatóforos. Dentro de los crustáceos los decápodos, junto con los copépodos, son los dos grupos cuyos espermatóforos han sido más estudiados. Con el microscopio fontónico se ha descrito el espermatóforo de unas 44 especies de decápodos y a nivel ultraestructural se deben mencionar los estudios efectuados en Libinia emarginata (HINSCH & WALKER, 1974), Homarus americanus (KODA-CISCO & TALBOT, 1982) y en Pacifastacus leniusculus (DUDENHAUSEN & TALBOT, 1983). En el grupo de los copépodos se han realizado estudios tanto a nivel estructural como ultraestructural sobre la morfología y la síntesis de los espermatóforos en varias especies libres, así como especies parásitas de peces. (Tabla I).

El espermatóforo de los copépodos, tiene generalmente forma de botella, con un largo cuello, y está constituido por varias capas concéntricas que se pueden concretar a efectos descriptivos en tres zonas, bien caracterizadas morfológicamente:

- Una zona central o "core" constituida por una matriz homogénea electrodensa que contiene una serie de gránulos de distintos diámetros y formas.
- Una zona periférica, con un contenido más o menos líquido, que engloba a los espermatozoides.
- La pared del espermatóforo que muestra un aspecto muy variable, de consistencia sólida que recuerda a una cutícula.

En las distintas especies de copépodos estudiados (Tabla I) se ha observado que tan solo se forma un espermatóforo a la vez que es expulsado de su receptáculo durante el proceso de acoplamiento, vaciándose entonces su contenido en el receptáculo seminal de la hembra.

La síntesis del espermatóforo tiene lugar a lo largo del conducto genital masculino; generalmente las sustancias que constituyen la zona central o "core" del espermatóforo, se elaboran en el tramo anterior del conducto genital (zona anterior y media del conducto deferente), mientras que la zona periférica y la pared son sintetizadas en el tramo posterior del mismo (zona posterior del conducto deferente y vesícula seminal).

A) A nivel estructural (Microscopio fotónico)	
<u>Calanus finmarchicus</u>	HEBERER (1932)
<u>Diarthrodes cystoecus</u>	FARHENBACH (1962)
<u>Epilabidocera amphitrites</u>	PARK (1966)
B) A nivel ultraestructural (Microscopio electrónico)	
<u>Calanus finmarchicus</u>	RAYMONT et al., (1974)
<u>Naobranchia cygniformis</u>	MANIER et al., (1977)
<u>Chondracanthus angustatus</u>	ROUSSET et al., (1978)
<u>Lernanthropus kroyeri</u>	COSTE et al., (1978)
<u>Euchaeta norvegica</u>	HOPKINS (1978)
<u>Tisbe holothuriae</u>	GHRAGOZLOU-VAN GINNEKEN & POCHON-MASSON (1979)
<u>Cyclops strenuus</u>	ROUSSET et al., (1981)
<u>Acanthocyclops viridis</u>	ROUSSET et al., (1981)
<u>Labidocera aestiva</u>	BLADES & YOUNGBLUTH (1981)
<u>Acanthocyclops robustus</u>	GARCIA-VALERO (1988)

TABLA I. Relación de las especies de copépodos, de las cuales se ha estudiado la morfología de sus espermatóforos.

Material y métodos

Hemidiaptomus roubau es un copépodo calanoide planctónico de agua dulce, que vive en aguas temporales limpias y poco mineralizadas (Lám. I., fig. 1). Los ejemplares utilizados para este estudio proceden de los Estanys de Capmany (Girona), que se encuentran sobre pizarras y esquistos.

Para el estudio al microscopio electrónico se fijaron animales fragmentados o se hizo la disección del aparato reproductor de los mismos; operación que se realizó en el mismo líquido de fijación.

Como método de fijación se utilizó el de la "fijación doble", o sea una previa fijación con una mezcla de paraformaldehído-glutaraldehído (KARNOVSKY, 1965) tamponada con fosfato 0.2 M (pH 7.4) a 4 °C durante 3 h. Después de un lavado con tampón fosfato 0.1 M se procedió a una post-fijación de 1 h con tetraóxido de osmio al 2% en el mismo tampón y a temperatura ambiente. Tras una deshidratación progresiva con etanol y utilizando el óxido de propileno como líquido intermediario, se procedió a la inclusión en resina Spurr (1969). Los cortes ultrafinos se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (REYNOLDS, 1963), siendo observados con los microscopios electrónicos PHILIPS CM-200 y HITACHI H-800.

El material destinado a ser observado con el microscopio electrónico se barrido se fijó de la misma manera que el destinado a microscopía electrónica de transición. Una vez deshidratado el material, se le aplicó el método de ANDERSON del punto crítico de desecación. A continuación, las muestras se montaron sobre los "stubs" y se procedió a su recubrimiento con una capa de oro de 20 a 50 nm de espesor. Las observaciones se realizaron con los microscopios electrónicos de barrido CAMBRIDGE Stereoscan SS-4 y JEOL JSH-840.

Los microscopios electrónicos utilizados pertenecen al Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Barcelona.

Resultados

El espermatóforo de H. roubau es alargado y en forma de "plátano" (Lám. I., fig. 2). Cuando está en el receptáculo, presenta una sección circular con un diámetro máximo de 140 μ m en la zona media y una longitud de 600 μ m (Lám. I., fig. 2). En su extremo apical no se observa ninguna estructura parecida a las "placas o aparato de acoplamiento" (modificación de la pared de la zona anterior del espermatóforo que tiene por misión la sujección del espermatóforo a la superficie del segmento genital de las hembras), descritas en otras especies de copépodos calanoides.

En una sección transversal del espermatóforo, se observan tres zonas morfológicamente bien caracterizadas: la pared, la región periférica y la región central o "core".

1.- Pared del espermatóforo

La pared del espermatóforo alcanza un grosor de 2,5 - 3,5 μ m en el receptáculo del espermatóforo y tiene una textura muy consistente. Dicha pared está constituida por dos envolturas bien diferenciadas segregadas a nivel del tramo final del conducto deferente y de la vesícula seminal. Estas envolturas son la P externa y lisa y la Pa muy desarrollada y estratificada. El sistema de dos envolturas así formado recuerda el aspecto de una cutícula tegumentaria. La envoltura P de 50 nm de grosor aproximadamente, simula una epicutícula, mientras que la envoltura Pa de 2,5 - 3,2 μ m de grosor simula una procutícula (Lám. II., fig. 1).

La cubierta P es lisa e impermeable, de tal manera que la penetración en el interior del espermatóforo de los fijadores utilizados corrientemente en microscopía electrónica es dificultosa si antes no se le ha practicado una escisión.

La cubierta Pa es estriada observándose una serie de bandas claras alternando con otras de mayor electrodensidad, dispuestas paralelamente (Lám. II., figs. 2,4,5). Estas bandas están constituidas por un material fibrilar que se dispone formando cortas arcadas.

2.- Región periférica del espermatóforo

La región periférica, es una capa de 5-7 μm de grosor, constituida por una secreción líquida que está situada justamente por debajo de la pared. Esta capa engloba a su vez a los espermatozoides que se sitúan en la misma formando una corona circular. Los espermatozoides son discoidales, están muy deformados, debido a la fuerte compactación a que están sometidos dentro de la estrecha capa superficial del espermatóforo (Lám. II., figs. 1,2,3).

3.- Región central del espermatóforo

La región central "core" del espermatóforo, está ocupada por una sustancia homogénea muy electrodensa, que engloba a una serie de gránulos en su interior. Se subdivide en dos capas o subzonas: una periférica y otra central o interna.

La capa periférica está situada junto a la región superficial del espermatóforo, y constituida por los gránulos ovoides alargados de tipo C, elaborados a nivel del conducto deferente. Es una zona estrecha de 1,2 μm de grosor (Lám. II., fig 2,3). La capa interna, ocupa la mayor parte de la zona central del espermatóforo, presente inmersos en la sustancia homogénea dos tipos de gránulos: unos de 0.57 μm de diámetro (gránulos A) y otros de 38 nm de diámetro (gránulos B), ambos redondos que se corresponden con los gránulos segregados a nivel de la zona anterior del testículo y en los dos primeros tramos del conducto deferente (Lám. II., figs. 1,6).

La disposición ordenada y radial de los distintos constituyentes del espermatóforo de H. roubaui, se mantiene durante todo el proceso de la síntesis del mismo, así como en el espermatóforo una vez ha sido expulsado a través del gonoporo.

4.- Extrusión del espermatóforo

El espermatóforo maduro pasa del receptáculo del espermatóforo hacia el estrecho conducto eyaculador y sale a través del gonoporo (Lám. I., fig. 3); simultáneamente los componentes de la vesícula seminal (el espermatóforo preformado) fluyen a su vez hacia la luz vacía del receptáculo del espermatóforo. El paso del espermatóforo preformado de la vesícula seminal al receptáculo del espermatóforo es regulado por un esfínter muscular, situado entre ambas zonas del conducto genital (RIBES, 1986).

A nivel de la zona anterior del espermatóforo (como ya se ha comentado anteriormente) no se halla ninguna estructura que recuerde a una aparato o sistema de acoplamiento del espermatóforo presente en otras especies de copepodos.

Explicación de las figuras

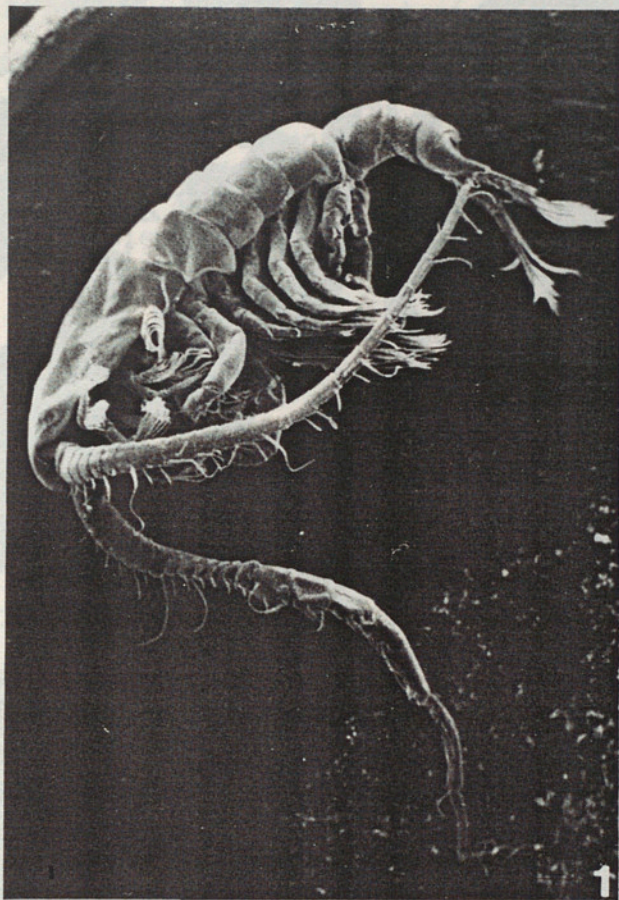
Lámina I

- Fig.1. Aspecto de un ejemplar macho de H. roubaui observado con el microscopio electrónico de barrido. M.E.B. x 23.
- Fig.2. Espermátóforo de H. roubaui separado del segmento genital de la hembra. M.E.B. x 221.
- Fig.3. Detalle del segmento genital. Obsérvese la ancha hendidura lateral, G, (gonoporo) situada en el borde posterior izquierdo dicho segmento. M.E.B. x 217/650.

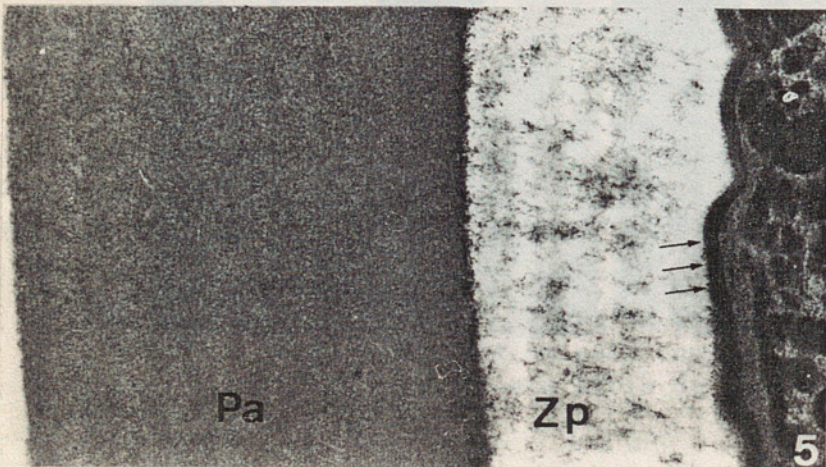
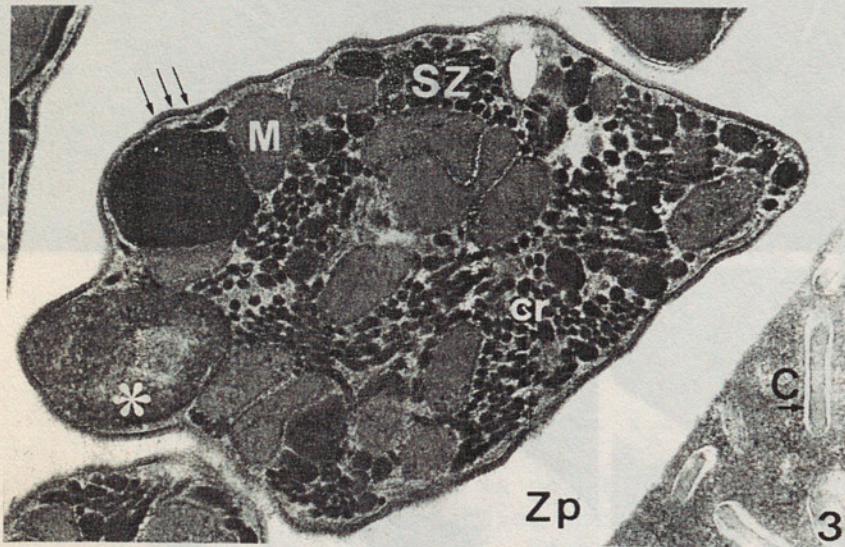
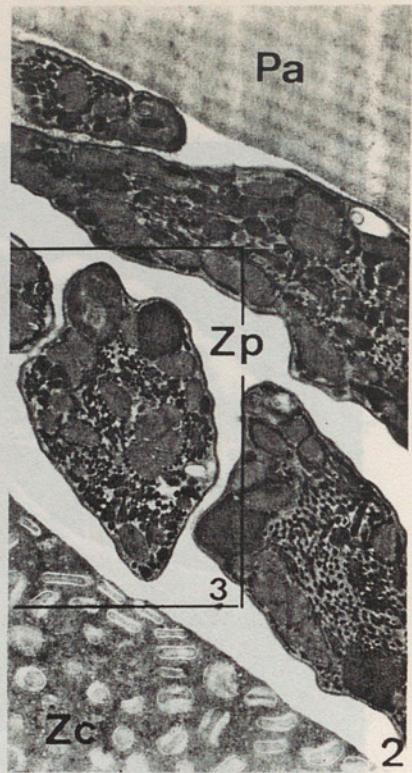
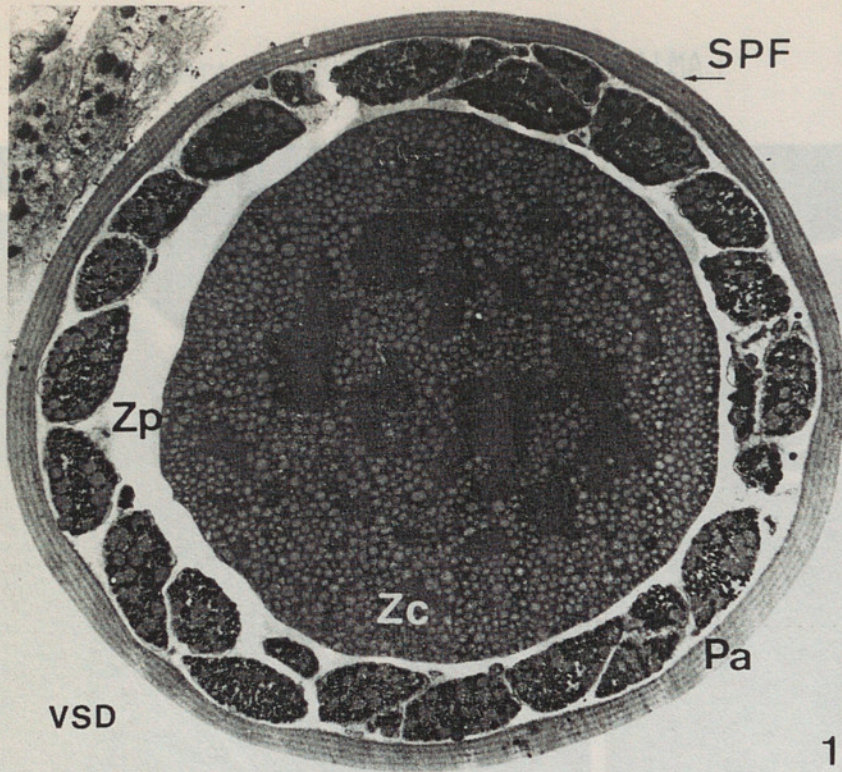
Lámina II

- Fig.1. Aspecto ultraestructural del espermátóforo (SPF) a nivel de la vesícula seminal descendente (VSD). En una sección transversal se observan tres zonas morfológicamente bien caracterizadas: la pared (Pa), la región periférica (Zp) y la región central o "core" (Zc). M.E. x 2.200.
- Fig.2. Detalle de la región periférica del espermátóforo (Zp) donde pueden verse los espermatozoides (SZ) dispuestos formando una corona circular. M.E. x 9.200.
- Fig.3. Detalle, a mayor aumento, de la fotografía anterior (Fig.2), donde puede verse la ultraestructura de un espermatozoide maduro (SZ) en el interior del espermátóforo. C: gránulos tipo C de la zona central del espermátóforo; Cr: Cromatina; M: Mitocondria; Zp: Región periférica del espermatozoide; (*): Cuerpo subsférico fibroso; (flechas): Matriz extracelular adosada a la cara externa de la envoltura plurimembranosa del espermatozoide. M.E. x 26.000.
- Fig.4. Detalle de la pared del espermátóforo (Pa). Obsérvese que está constituida por una serie de bandas claras alternando con otras de mayor electrodensidad, dispuestas paralelamente. Estas bandas están constituidas por un material fibrilar que se dispone formando arcadas. M.E. x 34.000.
- Fig.5. Detalle de la región periférica del espermátóforo (Zp). Pa: Pared del espermátóforo; (flechas): Matriz extracelular adosada a la envoltura plurimembranosa del espermatozoide. M.E. x 34.000.
- Fig.6. Detalle de la región central o "core" del espermátóforo (Zp). Esta región está ocupada por una sustancia homogénea que engloba a una serie de gránulos (A,B). M.E. x 26.000.

LAMINA I



LAMINA II



El espermátforo maduro, cuando sale del poro genital masculino continua presentando la forma característica de "plátano", tiene una longitud de 600-665 μm aproximadamente y un diámetro máximo de 138-140 μm en la región anterior (Lám. I., fig. 2). La sección del espermátforo deja de ser circular, ya que aparecen cuatro expansiones irregulares en forma de cruz que recorren de forma longitudinal las tres cuartas partes últimas del espermátforo, que no se observan en la zona apical del mismo (Lám. I., fig. 2). Este cambio de la forma externa del espermátforo viene motivado por el paso de éste a través de la zona posterior del conducto eyaculador que tiene una luz muy alargada en forma de cruz, y está delimitada por una fina cutícula que actúa a modo de molde (Lám. I., fig. 3).

El espermátforo cuando está unido al segmento genital femenino está generalmente vacío. La unión se efectúa mediante una sustancia cementante que fluye del extremo superior del espermátforo. Es frecuente observar hembras que llevan varios espermátforos colgando del segmento genital, en forma de ramillete.

Discusión

La actividad glandular del aparato genital de H. roubaui, empieza en el extremo anterior al testículo, concretamente a nivel del "casquete apical" constituido por unas células epiteliales de tipo glandular que tienen las mismas características morfológicas que las de la pared de la zona anterior del conducto deferente. A la luz del "casquete apical" del testículo son vertidas las células germinales en fase de espermátidas junto a una serie de sustancias de secreción formando conjuntamente el llamado "líquido o plasma seminal" (RIBES, 1986). Una actividad secretora testicular, también se ha evidenciado en Calanus finmarchicus (LOWE, 1935), en Epilabidocera amphitrites (PARK, 1966) y en Labidocera aestiva (BLADES & YOUNGBLUTH, 1981) entre otras especies. Sin embargo no todas las especies de copépodos estudiados, presentan esta actividad secretora del testículo, en Acanthocyclops viridis (ROUSSET et al., 1981), el testículo no es secretor, y por tanto las sustancias que intervienen en la formación del espermátforo son elaboradas exclusivamente a nivel del conducto genital.

Al "plasma seminal", se unen las sustancias elaboradas por la pared de la zona anterior al conducto deferente. En la zona media de este conducto, además de incorporarse nuevas sustancias de secreción, tiene lugar la segregación de los componentes del "plasma seminal" y la formación de dos zonas concéntricas bien delimitadas del espermátforo: la zona central constituida por una sustancia homogénea que engloba a una serie de gránulos y la zona periférica de naturaleza líquida que contiene a los espermatozoides (RIBES, 1986).

Los componentes que constituyen la pared del espermatóforo de H. roubaui, son sintetizados a nivel de la zona posterior del conducto deferente y en la vesícula seminal (RIBES, 1986). Dichas observaciones coinciden con las realizadas por otros autores (HEBERER, 1932; MARSHALL & ORR, 1955; PARK, 1966; BLADES & YOUNGBLUTH, 1981). En los copépodos Naobranchia cygniformis (MANIER et al., 1977) y Calanus finmarchicus (LOWE, 1935; RAYMONT et al., 1974), la pared del espermatóforo se elabora en la vesícula seminal, mientras que en Lernanthropus kroeyeri (COSTE et al., 1978) dicha pared se sintetiza en la zona media del conducto deferente.

El proceso de formación del espermatóforo en H. roubaui es similar al descrito por PARK (1966) en Epilabidocera amphitrites y por BLADES & YOUNGBLUTH (1981) en Labidocera aestiva, con la excepción de que en la zona anterior del receptáculo del espermatóforo ("former") no se sintetiza ningún aparato o placa de acoplamiento como ocurre en estas dos especies de copépodos calanoides citadas. El espermatóforo de H. roubaui, carece de dicho aparato de acoplamiento en su extremo anterior, igual sucede en Euchaeta norvegica (HOPKINS, 1978); en ambas especies los espermatóforos se sujetan al segmento genital de la hembra mediante una sustancia adherente en el extremo apical de los mismos. Según HEBERER (1932), la presencia de un "former" sencillo (que no sintetice un aparato de acoplamiento) representa un carácter primitivo en el sistema genital masculino de muchas especies de copépodos que al evolucionar han dado lugar a otros tipos de "former" más complejos constituídos por una pared epitelial de tipo secretor que elabora una gran cantidad de gránulos de secreción, los cuales originarán las láminas del aparato de acoplamiento.

La zona anterior del receptáculo del espermatóforo de H. roubaui solo sintetiza un único tipo de gránulos de secreción, los gránulos tipo I (RIBES, 1986), que corresponden ultraestructuralmente a los "glóbulos birrefringentes" secretados por el sencillo "former" de Euchaeta norvegica (HOPKINS, 1978) y a los de tipo-2 producidos por el complejo "former" de Labidocera aestiva (BLADES & YOUNGBLUTH, 1981).

HEBERER (1932), fundamentándose en el estudio del aparato de acoplamiento del espermatóforo maduro y de la organización del aparato genital masculino, (en particular, la morfología del "former") de un elevado número de especies de copépodos calanoides, propuso un esquema filogenético. Tal como señalan BLADES & YOUNGBLUTH (1981) la confección de modelos evolutivos para los copépodos, basados en la ultraestructura del aparato reproductor y en la forma del espermatóforo, no es útil debido a que actualmente todavía es limitado el número de descripciones.

La ultraestructura de la pared del espermatóforo de H. roubaii, al igual que la de otras especies de copépodos, presenta una serie de capas concéntricas de distinta electrodensidad, constituídas por un material fibrilar, dispuesto en "arcadas".

GHARAGOZLOU-VAN GINNEKEN (1978) basándose en el aspecto ultraestructural y la composición química de la pared del espermatóforo de Tisbe holothuriae, compara dicha estructura con la cutícula de los artrópodos, ya que tiene una asociación de proteínas y polisacáridos muy parecida a la de dicha cutícula tegumentaria. Sin embargo estas dos estructuras no pueden ser consideradas como estructuras homólogas ya que el proceso de formación de ambas es distinto.

La naturaleza química diversificada de los gránulos de secreción y su situación ordenada dentro del espermatóforo, sugiere funciones diferentes para cada una de ellas. Las posibles funciones de las secreciones seminales en el interior de los espermatóforos de los copépodos han sido tratadas por diversos autores (FAHRENBACH, 1962; PARK, 1966; LEE, 1972; RAYMONT et al., 1974; GHARAGOZLOU-VAN GINNEKEN & POCHON-MASSON, 1979 y BLADES & YOUNGBLUTH, 1981). Según FAHRENBACH (1962), los gránulos de secreción, existentes en la zona anterior del cuello del espermatóforo de Diarthrodes cystoecus son los responsables de la formación de un tubo que se endurece en el momento en que se deposita el espermatóforo sobre el segmento genital de la hembra. LEE (1972) describe en Centropages furcatus una secreción granular que sale de la zona anterior del espermatóforo y al solidificar forma un tapón en la abertura genital femenina. En Tisbe holothuriae (GHARAGOZLOU-VAN GINNEKEN & POCHON-MASSON, 1979), la mayor parte de los gránulos de secreción, participan en la formación de las capas concéntricas que constituyen la zona inferior o "esférula" del espermatóforo mientras que otros como los denominados "gránulos A", dada la posibilidad que tienen de hincharse pueden ser los responsables de provocar, la emisión de las otras secreciones y de los espermatozoides.

Según observan BLADES & YOUNGBLUTH (1981) en Labidocera aestiva, el líquido seminal cuando sale del espermatóforo solidifica en contacto con el agua de mar y forma un tubo a través del cual, los espermatozoides pasan hacia el gonoporo de la hembra, sin embargo, estos mismos autores no especifican cuales de los componentes que constituyen el líquido seminal intervienen en la formación de este tubo.

En H. roubaii, atendiendo a la morfología, naturaleza y distribución de los distintos componentes del espermatóforo, se supone que los gránulos de secreción y la sustancia homogénea de la zona central o "core" tienen unas funciones relacionadas con la adhesión del espermatóforo al segmento genital de la hembra y con la expulsión de los gametos, mientras que el componente líquido que engloba a los espermatozoides a nivel de la zona periférica tiene un papel protector y nutricio de las células germinales.

Otras posibles funciones de las secreciones seminales presentes en los espermatóforos podrían estar relacionadas con:

- La capacitación de los espermatozoides.
- La influencia en ciertos aspectos de la fisiología

reproductiva y del comportamiento de la hembra, tal como se describe en ciertas especies de insectos.

En el coleóptero Acanthorcelides obtectus (CASSIER & HUIGNARD, 1979) y en el dictióptero Bladera fusca (BROUSE-GAURY & GOUDEY-PERRIERE, 1983) la presencia de las secreciones seminales del macho dentro de la bolsa copulatoria de la hembra estimula la oogénesis, induce la oviposición e inhibe la receptividad.

Bibliografía

BLADES, P.I., YOUNGBLUTH, M.J. (1981). Ultrastructure of the male reproductive system and spermatophore formation in Labidocera aestiva (Crustacea: Copepoda). Zoomorphology, 99, 1-21.

BROUSSE-GAURY, P., GOUDEY-PERRIERE, F. (1983). Spermatophore et vitellogenèse chez Bladera fusca, Br. Dictyoptère, Blaberidae). C.R.Acad.Sc.Paris, 296, 659-664.

CASSIER, P., HUIGNARD, J. (1979). Etude ultrastructurale des glandes annexes de l'appareil genital male chez Acanthoscelides obtectus Say (Coleoptera: Bruchidae) Int. J. Insect. Morphol. Embryol., 8, 183-201.

COSTE, F., RAIBAUT, A., BOUIX, G. (1978). Réproduction et sexualité des copépodes parasites de poissons. III. Morphologie et anatomie microscopiques de l'appareil génital male de Lernanthropus kroyeri van Beneden, 1851, données histochimiques. Bull.Soc.Zool.Fr., 103 (4), 465-481.

DUDENHAUSEN, E.E., TALBOT, P. (1983). An ultrastructural comparison of soft and hardened spermatophores from the crayfish Pacifastacus leniusculus. Dana. Can.J.Zool., 61 (1), 182-194.

FAHRENBACH, W.H. (1962). The biology of a harpacticoid copepod. Cellule 62, 302-376.

GARCIA-VALERO, J. (1988). La gametogenesi a Acanthocyclops robustus G.O. Sars (Crustacea, Copepoda). Estudi ultrastructural. Tesi Doctoral. Fac. de Biologia. Univ. de Barcelona.

GHARAGOZLOU-VAN GINNEKEN, I.D. (1978). Sécrétion et organisation de la paroi stratifiée du spermatophore chez quelques Copépodes: ultrastructure et cytochimie. Cytobiologie. European J. Cell Biol., 18, 231-243.

- GHARAGOZLOU-VAN GINNEKEN, I.D., POCHON-MASSON, J. (1979). Intrastructure, nature et formation des grains de sécrétion dans le canal déferent de Tisbe holothuriae (Copépode, Harpacticoide). Arch. Biol. Bruxelles, 90, 59-81.
- GHILAROV, M.S. (1956). L'importance du sol dans l'origine et l'évolution des insectes. Proc. 10th. Int. Congr. Entomol., 1, 443-451.
- GHILAROV, M.S. (1959). Evolution of the insemination type in insects as the result of transition from aquatic to terrestrial life in the course of the phylogenesis. In The Ontogeny of Insects (Hrdy, ed.). Academia Press. New York. London.
- HEBERER, G. (1932). Untersuchungen über Bau and Funktion der Genitalorgane der Copepoden. I. Der männlich Genitalapparat der Calanoiden Copepoden. Z. Mikrosk. Anat. Forsch., 31, 250-424.
- HINSCH, G.W., WALTER, M.H. (1974). The vas deferents of the spider crab, Libinia emarginata. J. Morphol., 143, 1-20.
- HOPKINS, C.C.E. (1978). The male genital system, and spermatophore production and function in Euchaeta norvegica Boeck (Copepoda: Calanoida). J. Exp. Biol. Ecol., 35: 197-231.
- KARNOVSKY, M.J. (1965). A formaldehyde-glutaldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell. Biol., 27, 137-138.
- KODA-CISCO, M., TALBOT, P. (1982). A structural analysis of the freshly extruded spermatophore from the lobster, Homarus americanus. J. Morphol., 172, 193-207.
- LEE, C.M. (1972). Structure and function of the spermatophore and its coupling device in the centropagidae (Copepoda, Calanoida). Bull. Mar. Ecol., 8, 1-20.
- LOWE, E. (1935). The anatomy of a marine Copepod, Calanus finmarchicus Gunnerus. Trans. R. Soc. Edinburgh, 58, 561-603.
- MANIER, J.F., RAIBAUT, A., ROUSSET, V., COSTE, F. (1977). L'appareil génital male et la spermiogenèse du copépode parasite Naobranchia cygniformis Hesse, 1863. Ann. Sci. Nat. Zool., 19, 439-458.
- MANN, T. (1984). Spermatophores, Zoophysiology, vol. 15. Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- MARSHALL, S.M., ORR, A.P. (1955). The biology of a marine copepod Calanus finmarchius (Gunnerus). Edinburgh and London. Oliver & Boyd.
- PARK, T.S. (1966). The biology of a calanoid copepod Epilabidocera amphitrites McMurrich. Cellule, 66, 129-151.

- RAYMONT, J.E.G., KRISHNASWAMY, S., WOODHOUSE, M.A., GRIFFIN, R.L. (1974). Studies on the fine structure of Copepoda. Observations of Calanus finmarchicus (Gunnerus). Proc.R.Soc.Lond.(Biol.), 185, 409-429.
- REYNOLDS, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol., 17, 208-212.
- RIBES, E. (1986). La gametogenesis de Hemidiaptomus roubau, Richard, 1888 (Copepoda, Calanoida). Estudio ultrastructural. Tesis Doctoral. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.
- ROUSSET, V., RAIBAUT, A., MANIER, J.F., COSTE, F. (1978). Reproduction et sexualité des copépodes parasites de poissons. I. L'appareil reproducteur de Chondracanthus angustatus Heller, 1865: anatomie, histologie et spermiogenèse. Z.Parasitenkd, 55, 73-89.
- ROUSSET, V., COSTE, F., MANIER, J.F., RAIBAUT, A. (1981). L'appareil génital male et al spermatogenèse d'un copépode cyclopoide libre: Acanthocyclops (Megacyclops) viridis (Jurine, 1820) (Copepoda, Cyclopoida). Crustaceana, 40, 65-78.
- SCHALLER, F. (1965). Mating behavior of lower terrestrial arthropods from the phylogenetical point of view. Proc. 12th Int.Cong. Entomol.Lond., 297-298.
- SCHALLER, F. (1979). Significance of sperm transfer and formation of spermatophores in Arthropod Phylogeny. In: Arthropod Phylogeny (A.P Gupta, ed.). Reinhold, N.Y., 587-608.
- SHAROV, A.G. (1965). Origin and main stages of the arthropod evolution. 1. From annelids to arthropods of principal groups of Arthropods. Zool.Zh., 44, 803-817; 963-979.
- SHAROV, A.G. (1966). Basic Arthropod stock with special reference to Insects. Pergamon Press, Oxford.
- SPURR, A.R. (1969). A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res., 26, 31-43.