

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DEL TRACTO  
REPRODUCTIVO EN MACHOS DE *Macroperipatus* aff. *geayi*  
(ONYCHOPHORA: PERIPATIDAE)

FREDDY FONSECA GARCÍA

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA

2016

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DEL TRACTO  
REPRODUCTIVO EN MACHOS DE *Macroperipatus aff. geayi*  
(ONYCHOPHORA: PERIPATIDAE)

FREDDY FONSECA GARCÍA  
Para optar al título de Biólogo

DIRECTORA  
MARTHA PATRICIA RAMÍREZ PINILLA  
Bióloga, Ph. D

TUTOR  
EZEQUIEL GONZÁLEZ LEÓN  
Biólogo

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2016

## **DEDICATORIA**

A mi familia que estuvo presente durante la realización de este proyecto, y a los compañeros de laboratorio que con ayuda hicieron de este camino una meta alcanzable.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis papás Patrocinio Fonseca y Omaira García Ordoñez por su apoyo incondicional, por ser mi ejemplo a seguir y por acompañarme en cada momento de este proceso.

A mi familia por acompañarme en todo este proceso.

A Elson Meneses Pelayo quien llevo a cabo la recolecta de especímenes e hizo posible la culminación de este proyecto.

A Oscar Hernández Lagos que facilitó información y guía en el trabajo.

A mis compañeros de carrera por cada uno de los momentos compartidos.

Un Agradecimiento especial a la profesora Martha Patricia Ramírez Pinilla, a Ezequiel González León y en general a todos mis compañeros del laboratorio de biología reproductiva de vertebrados por compartir conmigo todos sus conocimientos, por sus consejos y por su acompañamiento en este trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN	11
1. OBJETIVOS	13
1.1 Objetivo general	13
1.2 Objetivos específicos	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1 COLECTA Y FIJACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	14
2.2 ANÁLISIS MACROSCÓPICO DEL TRACTO REPRODUCTIVO	14
2.3 ANÁLISIS HISTOLÓGICO	15
3. RESULTADOS	17
3.1 Descripción macroscópica del tracto reproductivo de los machos de <i>M. aff. geayi</i>	17
3.2 Descripción microscópica	22
3.2.1 Testículo	22
3.2.2 Conducto Eferente	28
3.2.3 Conducto Deferente	29
3.2.4 Conducto Eyaculador	34
4. DISCUSIÓN	37
5. CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFIA	43

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Tamaño corporal para machos y hembras de <i>Macroperipatus</i> aff. <i>geayi</i> .	17
<b>Figura 2.</b> Morfología general del tracto reproductivo en machos de <i>Macroperipatus</i> aff. <i>geayi</i> .	20
<b>Figura 3.</b> Fotografía estereoscópica de los diferentes órganos que conforman el tracto reproductivo de un macho reproductivo de <i>Macroperipatus</i> aff. <i>geayi</i> .	21
<b>Figura 4.</b> Testículo de <i>Macroperipatus</i> aff. <i>geayi</i> .	23
<b>Figura 5.</b> Vesícula seminal de adultos de <i>M. aff. geayi</i> .	25
<b>Figura 6.</b> Sección transversal del cuerpo de un feto macho pigmentado de <i>M. aff. geayi</i>	26
<b>Figura 7.</b> Sección transversal del cuerpo de un feto parcialmente pigmentado	27
<b>Figura 8.</b> Sección transversal del conducto eferente para machos de <i>M. aff. geayi</i>	28
<b>Figura 9.</b> Secciones transversales del conducto deferente de machos adultos de <i>M. aff. geayi</i> .	31
<b>Figura 10.</b> Secciones transversales de la región media del cuerpo de un feto macho de <i>M. aff. geayi</i> .	32
<b>Figura 11.</b> Conducto deferente con espermátforo en <i>M. aff. geayi</i> .	33
<b>Figura 12.</b> Sección transversal del conducto eyaculador de machos de <i>M. aff. geayi</i> .	35
<b>Figura 13.</b> Relación entre los estadios reproductivos y los promedios de los diámetros y alturas epiteliales del conducto deferente	36

## RESUMEN

**TÍTULO: DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DEL TRACTO REPRODUCTIVO EN MACHOS DE *Macroperipatus aff. geayi* (ONYCHOPHORA: PERIPATIDAE)\***

**AUTOR: FREDDY FONSECA GARCÍA\*\***

**PALABRAS CLAVE:** *MACROPERIPATUS*, ONYCHOPHORA, PERIPATIDAE, HISTOLOGÍA, ESPERMATÓFOROS.

### **DESCRIPCIÓN:**

Se estudió la morfología macroscópica e histológica del tracto reproductivo de machos de onicóforos *Macroperipatus aff. geayi*, y su desarrollo desde estados fetales, neonatos hasta individuos de diferentes tamaños corporales para determinar si sus características son similares y compartidas con otros onicóforos de la familia Peripatidae y para determinar el estado de desarrollo a la madurez sexual. La anatomía general es similar a la reportada en otras especies de la familia Peripatidae. Los neonatos y toda la serie de tamaños encontrada fueron maduros, produciendo activamente espermatozoides a nivel de la vesícula seminal y reproductivamente activos ya que producen espermátóforos en el conducto deferente. Los fetos pigmentados próximos al nacimiento y encontrados en el oviducto descendente de las madres fueron considerados sexualmente maduros, pero no reproductivamente activos, ya que no se encontraron espermátóforos en el lumen del conducto deferente. Los fetos parcialmente pigmentados, que también se encuentran en el oviducto descendente de sus madres pero en una posición más anterior y en un estado previo de desarrollo, no presentan aún espermatozoides, pero la espermiogénesis ya está ocurriendo. Así, los individuos de esta población inician el proceso de espermiogénesis durante su desarrollo fetal y producen espermatozoides como fetos avanzados. Sólo serían reproductivamente activos cuando neonatos, pues sólo en este estado son capaces de producir espermátóforos para transferir al gonoporo de la hembra.

---

\* Trabajo de grado.

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Martha Patricia Ramírez Pinilla, Ph.D. Tutor: Ezequiel González León, biólogo.

## ABSTRACT

**TITLE: MACROSCOPIC AND MICROSCOPIC DESCRIPTION OF THE REPRODUCTIVE MALE TRACT FOR *MACROPERIPATUS* AFF. *GEAYI* (ONYCHOPHORA: PERIPATIDAE) \***

**AUTHOR: FREDDY FONSECA GARCÍA\*\***

**KEYWORDS:** *MACROPERIPATUS*, ONYCHOPHORA, PERIPATIDAE, HISTOLOGY, SPERMATOPHORES.

### **DESCRIPTION:**

We studied the macroscopic and histological morphology of the reproductive male tract for *Macroperipatus* aff. *geayi* and its development from fetuses through neonates to individuals of different body sizes. We also determined if there were similar or shared characteristics with other onychophorans belonging to the Peripatidae family. Additionally, the body size at which males reach the sexual maturity was elucidated. The general anatomy was similar to the one reported for other species of the Peripatidae family. Neonates and specimens with different body sizes were mature producing spermatozoa at the seminal vesicle, and reproductively active because they produce spermatophores within the vas deferens. The pigmented fetuses, near to birth and found in the descendent oviduct of females, were recognized as sexually mature but not reproductively active, since although they produce spermatozoa they did not have spermatophores in their vas deferens. The partially pigmented fetuses, also found in the descendent oviduct but in a more anterior position and in a previous developmental stage, did not have spermatozoa, however, spermiogenesis is already occurring. Consequently, the individuals of this population initiate the spermiogenesis process during their fetal development and produce spermatozoa as advanced fetuses. Males can be reproductively active from neonates, because at this stage they are capable of producing spermatophores for transferring into the female gonopore.

---

\* Degree work.

\*\* Science Faculty. Department of Biology. Director: Martha Patricia Ramírez Pinilla, Ph.D. Tutor: Ezequiel González León, biólogo.

## INTRODUCCIÓN

Los onicóforos son invertebrados terrestres que se caracterizan por ser predadores nocturnos y estar confinados a microhábitats húmedos. Se encuentran bajo troncos en descomposición, rocas y hojarasca (Manton, 1946; Barclay *et al.*, 2000). Comprenden alrededor de 197 especies, 82 para la familia Peripatidae con distribución circumtropical en el este de África, América Central, norte de América del Sur y el Sur-Este de Asia y 115 para la familia Peripatopsidae de las zonas templadas en el sur de Australia, Nueva Zelanda, Chile y Suráfrica (Bouvier, 1904; Evans, 1901; Monge-Nájera, 1995; Reid, 1996; Oliveira *et al.*, 2012).

A pesar de que ambas familias exhiben una morfología conservada, los onicóforos son diversos respecto al sistema de apareamiento y funciones reproductivas (Marotta y Ruhberg, 2004). Los sexos son separados y se reproducen por amfimixia, a excepción de la especie *Epiperipatus imthurni* (Peripatidae), en la que se ha reportado la partenogénesis (Read, 1988). Así mismo, la proporción sexual es desbalanceada (Tutt *et al.*, 2002), el número de hembras es mayor que el número de machos y el dimorfismo sexual por tamaño es común (siendo los machos más pequeños que las hembras) (Leishman y Eldredge, 1990; Hebert *et al.*, 1991; Sunnucks, 2000). De igual manera se han visto diferencias sexuales en crecimiento, mortalidad y adquisición de la madurez sexual (en Peripatopsidae, Sunnucks *et al.*, 2000, y en Peripatidae, Lavallard y Campiglia, 1975). Así por ejemplo, en machos de la especie *Peripatus acacioi* (Peripatidae) se ha visto que la producción del esperma ocurre inmediatamente después del nacimiento, mientras que las hembras requieren un mayor tiempo para adquirir la madurez sexual, que se da en el segundo y tercer año (Lavallard y Campiglia, 1975). Por otra parte, las hembras poseen un espectro de estrategias reproductivas que incluyen la viviparidad matrotrofica para la familia Peripatidae, como la viviparidad

con diferentes modos de nutrición embrionaria y la oviparidad para Peripatopsidae (Brockmann *et al.*, 1997; Mayer *et al.*, 2009).

Los estudios realizados para machos de onicóforos incluyen los análisis de la ultraestructura y formación del espermatozoide y la filogenia derivada de caracteres de los espermatozoides en la familia Peripatopsidae (Baccetti *et al.*, 1976; Baccetti y Dallai, 1977; Camatini *et al.*, 1979; Storch y Ruhberg, 1983) y en la ultraestructura del tracto reproductivo y de la formación del espermatozoide y el epermatóforo en especies de la familia Peripatidae (*Peripatus sedgwick*, *Epiperipatus biolleyi* Storch y Ruhberg, 1990, Storch *et al.*, 1995). Gaffron (1885) describe la anatomía e histología del aparato reproductor masculino de *Peripatus* (Peripatidae). El tracto reproductivo masculino de ambas familias consiste de un par de testículos, vesículas seminales y sus conductos eferentes y, de un conducto deferente y el eyaculador que no son pareados (Kemp, 1914; Storch y Ruhberg, 1977; Storch y Ruhberg, 1990; Storch *et al.*, 1995). Hacia la parte distal del tracto se pueden encontrar espermatóforos en el conducto deferente, los cuales son expulsados a través del conducto eyaculador que abre paso a la abertura genital. En esta abertura se sitúan las glándulas anales, que son exclusivas de los machos. La posición de los testículos, vesículas seminales y vasos eferentes dentro de la cavidad del cuerpo depende del estado de madurez: son dorsales, laterales o ventrales al tracto digestivo (Storch y Ruhberg, 1990, Storch *et al.*, 1995). No se conocen estudios sobre el desarrollo del tracto reproductivo masculino o los cambios morfológicos entre individuos de diferentes tamaños o estados de actividad reproductiva.

En esta investigación se describió por primera vez la morfología e histología del tracto reproductivo en machos en diferentes etapas de su ciclo de vida para una población de *Macroperipatus* aff. *geayi*, y se determinó el estado en el que se adquiere la madurez sexual. Los resultados se compararon con las descripciones de especies para las dos familias de onicóforos.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Describir el tracto reproductivo en machos de *Macroperipatus* aff. *geayi* en diferentes tamaños y estados de madurez.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Describir macroscópicamente y microscópicamente las características morfológicas del tracto reproductivo en machos juveniles y adultos de la especie.

Determinar el tamaño corporal en el cual los machos de *M. aff geayi* alcanzan la madurez sexual.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 COLECTA Y FIJACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO**

Se colectaron en total 20 machos de *Macropripatus* aff. *geayi* en el municipio de Santa Bárbara, departamento de Santander, Colombia (07° 0' 52,86'' Norte, 72° 53' 48,05'' Oeste, 2300 m de altitud). Éstos se llevaron en recipientes de icopor al Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados de la Universidad Industrial de Santander; allí fueron eutanizados en una inmersión letal de roxicaina 2%. Se tomaron medidas de diámetro y longitud total con un calibrador dial de precisión 0.02mm. Cada uno de los individuos fue observado bajo un estereoscopio para identificar las características de dimorfismo sexual y reconocer a los machos. Con base en este análisis se obtuvo una serie de tamaños de machos que iba desde neonatos (8) (los cuales se fijaron inmediatamente después del parto en condiciones de laboratorio) hasta aquellos con un tamaño corporal máximo (20) (colectados en campo). Adicionalmente, de cinco hembras preñadas se extrajeron fetos próximos al nacimiento (5) (posición más distal del oviducto descendente, completamente desarrollados y con pigmentación corporal) y los que resultaron ser machos se incluyeron en la muestra. Los individuos se fijaron en formaldehído amortiguado al 10% y se preservaron en etanol 70%. Los cuerpos de los individuos se ingresaron al Museo de Historia Natural de la Universidad Industrial de Santander.

### **2.2 ANÁLISIS MACROSCÓPICO DEL TRACTO REPRODUCTIVO**

Los especímenes neonatos y la serie de diferentes tamaños se disecaron ventralmente desde la abertura genital hasta la boca, usando tijeras de microcirugía. Se observaron y fotografiaron los órganos bajo un estereoscopio

(Nikon SMZ-1000®) para visualizar sus características en diferentes estados reproductivos. Se extrajeron en total 20 tractos reproductivos de la cavidad hemocélica y se pusieron sobre una caja de Petri para observación, descripción y fotografía de sus órganos constitutivos. Las descripciones del tracto reproductivo de *M. aff. geayi* se compararon con las descripciones previas para las dos familias teniendo como referencia la nomenclatura empleada por Storch *et al.* (1995). Los fetos obtenidos se observaron macroscópicamente pero no se disecaron sus tractos reproductivos debido a su tamaño. Las fotografías se tomaron usando un estereoscopio equipado con una cámara Canon EOS Rebel XS®. Algunas fotografías se emplearon para hacer diagramas del tracto reproductivo masculino después de ser fijados.

### **2.3 ANÁLISIS HISTOLÓGICO**

Una vez extraídos, los tractos reproductivos de los machos de *M. aff. geayi* y los cuerpos completos de los fetos fueron fijados en formaldehído amortiguado al 10% y preservados en alcohol 70% para los análisis histológicos. Para cada individuo el sistema reproductivo se dividió de acuerdo con los órganos que lo componen, es decir, testículo, vesícula seminal, conducto eferente, conducto deferente y el eyaculador. En el caso de los fetos, no se extrajeron los órganos de la cavidad del cuerpo sino que se incluyó el cuerpo completo. Los tejidos fueron deshidratados en una serie ascendente de etanol hasta 100%, aclarados en xilol y embebidos en paraplast para ser seccionados a 5 µm en un micrótopo rotario Lipshaw®. Las secciones se montaron en láminas portaobjetos con albúmina y fueron teñidas con hematoxilina-eosina para la descripción general, ácido peryódico de Schiff (PAS) para la identificación de carbohidratos, azul de Alcian (AB) a pH 2.5 para polisacáridos ácidos y tricrómica de Masson (TM) para visualizar fibras de colágeno y fibras musculares (Luna, 1968). Los cortes fueron analizados con un microscopio Nikon H-550S® con cámara integrada Canon EOS® y se emplearon

para la descripción tisular detallada y para determinar el estado de actividad reproductiva. Se consideraron machos adultos y activos reproductivamente a aquellos machos con presencia de espermatozoides en el lumen de la vesícula seminal y en el conducto eferente, y con espermátóforos en el conducto deferente. Aquellos que no cumplieron con los criterios anteriores fueron considerados inactivos reproductivamente.

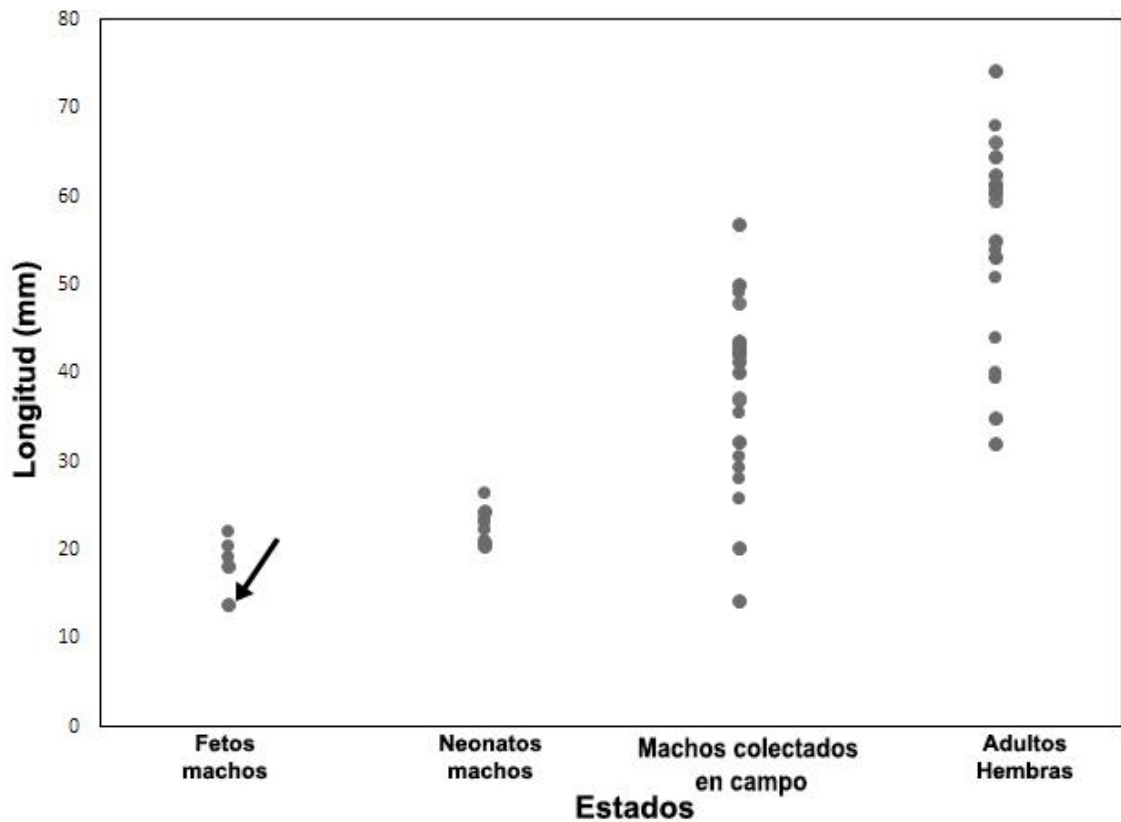
A partir de los cortes histológicos se tomaron medidas del diámetro y la altura epitelial para el conducto deferente y el eyaculador hacia la parte distal utilizando el software ImageJ (Abrámoff *et al.*, 2004). Se llevaron a cabo 15 mediciones repetidas de cada variable para cada macho estudiado (n=33). Con dichos datos se evaluaron si existían diferencias significativas entre las categorías de individuos obtenidas (fetos, neonatos y adultos), aplicando una prueba Kruskal-Wallis (para datos no paramétricos). En caso de encontrar diferencias en la prueba estadística, se realizó una prueba *a posteriori* para las comparaciones entre las categorías por el método de Dunn para datos no paramétricos. Todos los análisis estadísticos fueron hechos en el software estadístico Statistica versión 7, asumiendo  $P < 0,05$  como criterio de significancia.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA DEL TRACTO REPRODUCTIVO DE LOS MACHOS DE *M. AFF. GEAYI*

Se analizaron en total 33 machos los cuales fueron clasificados en fetos (5) neonatos (8) y colectados en campo (20). Las longitudes corporales para machos y hembras de *M. aff. geayi* se muestran en la figura 1. Las 5 hembras reproductivas disecadas (con embriones y fetos en el tracto reproductivo) presentaron un rango de longitud de entre 32 mm y 70 mm. Los fetos machos obtenidos de estas hembras estuvieron en un rango de longitud de entre 16 y 22 mm. Los neonatos machos entre 22 mm a 26 mm y la serie de machos colectados en campo entre 14 mm a 50 mm, por lo tanto hay un solapamiento de tamaños entre los fetos, los neonatos y la serie de machos considerados adultos.

**Figura 1.** Tamaño corporal para machos y hembras de *Macropripatus aff. geayi*. Distribución de la longitud corporal en machos fetos, neonatos y adultos de ambos sexos. El único individuo sin espermatozoides en la vesícula seminal se indica con una flecha y corresponde a un feto macho parcialmente pigmentado.



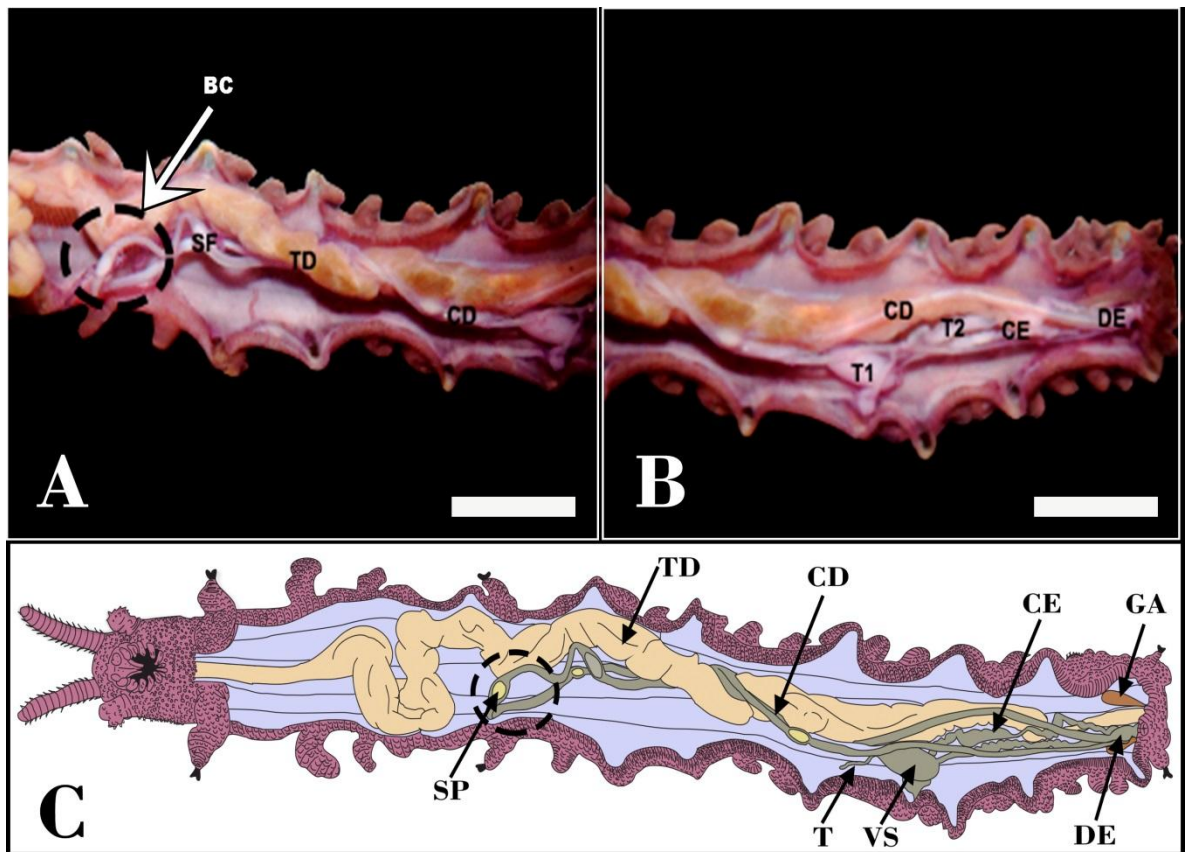
Los machos presentan un tracto reproductivo compuesto por un par de testículos y un par de vesículas seminales y sus conductos eferentes, en tanto que el conducto deferente y el eyaculador no son pareados (Figura 2 B y C). El testículo es tubular alargado y en algunos casos plegado. El testículo y la vesícula seminal se unen a través de un conducto estrecho y se localizan en la región posterior lateral derecha del canal alimentario dentro de la cavidad hemocélica (Figura 2 y 3B). La vesícula seminal es ovalada y de mayor diámetro (Figura 4 A y B). Cada una de las vesículas seminales se conecta en la parte posterior con su correspondiente conducto eferente (Figura 2 y 3 B).

El conducto eferente se deriva de la región posterior de la vesícula seminal y se dirige a la parte anterior del cuerpo, haciéndose progresivamente más delgado (Figura 2). Los conductos eferentes son convolutos y tortuosos, en su porción distal se fusionan a la altura del séptimo par de oncópodos para dar inicio al

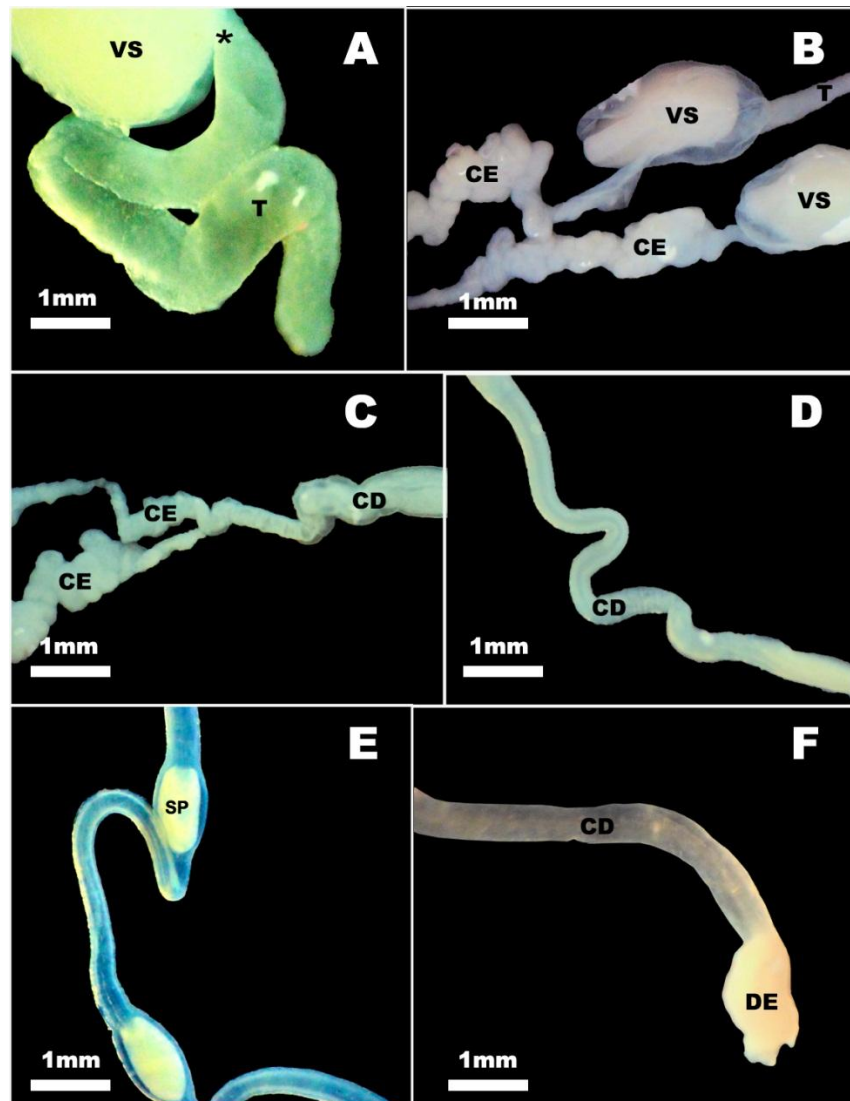
conducto deferente (Figura 3C). Este ducto es de gran longitud y parece ser equivalente al largo total del individuo (Figura 3D), se divide en una porción ascendente que corre hacia la parte anterior del cuerpo y en una porción descendente más distal que corre hacia la parte posterior del cuerpo para conectar con el conducto eyaculador y gonoporo. En la porción ascendente más anterior se forma un bucle que cambia el curso del ducto hacia la región posterior del cuerpo (porción descendente) y es en esta zona donde se logran ver los espermatozoides (Figura 2). Los espermatozoides se observan dentro del lumen del ducto deferente en las partes anterior y media de la porción descendente y son de forma elíptica, tienen una longitud aproximada de 1.1 mm (Figura 3E). A lo largo del conducto deferente se observaron de 2 a 3 espermatozoides en los 28 individuos nacidos colectados, es decir que los neonatos ya poseen espermatozoides en sus conductos deferentes.

El conducto eyaculador es el más distal del tracto y se abre paso a la abertura genital que se sitúa en el veintiochoavo par de oncópodos (Figura 2 y 3F). Finalmente, un par de glándulas accesorias se localizan lateralmente al gonoporo; presentan una coloración marrón y son de forma tubular delgada, además se ubican libremente en la cavidad corporal que se encuentra entre el gonoporo y el veintiochoavo par de oncópodos (Figura 2 C). La posición de los tractos reproductivos respecto del tubo digestivo varía, siendo ventral en fetos y neonatos y lateral en adultos.

**Figura 2.** Morfología general del tracto reproductivo en machos de *Macroperipatus* aff. *geayi*. A) Región anterior del cuerpo donde se observa un bucle (línea punteada) en el conducto deferente que cambia su curso hacia la región posterior. B) Región posterior en la que se encuentran las estructuras pareadas (Testículo y conducto eferente) el conducto deferente y el eyaculador. C) Diagrama de la cavidad hemocélica de un macho de la especie que muestra la posición relativa del tracto digestivo y el reproductivo con sus respectivos órganos. Las glándulas anales en la región del gonoporo son pareadas y paralelas al conducto eyaculador. CE, conducto eferente; CD, conducto deferente; DE, conducto eyaculador; GA, glándulas anales; SP, espermatóforo; T, testículo; TD, tracto digestivo; VS, vesícula seminal.



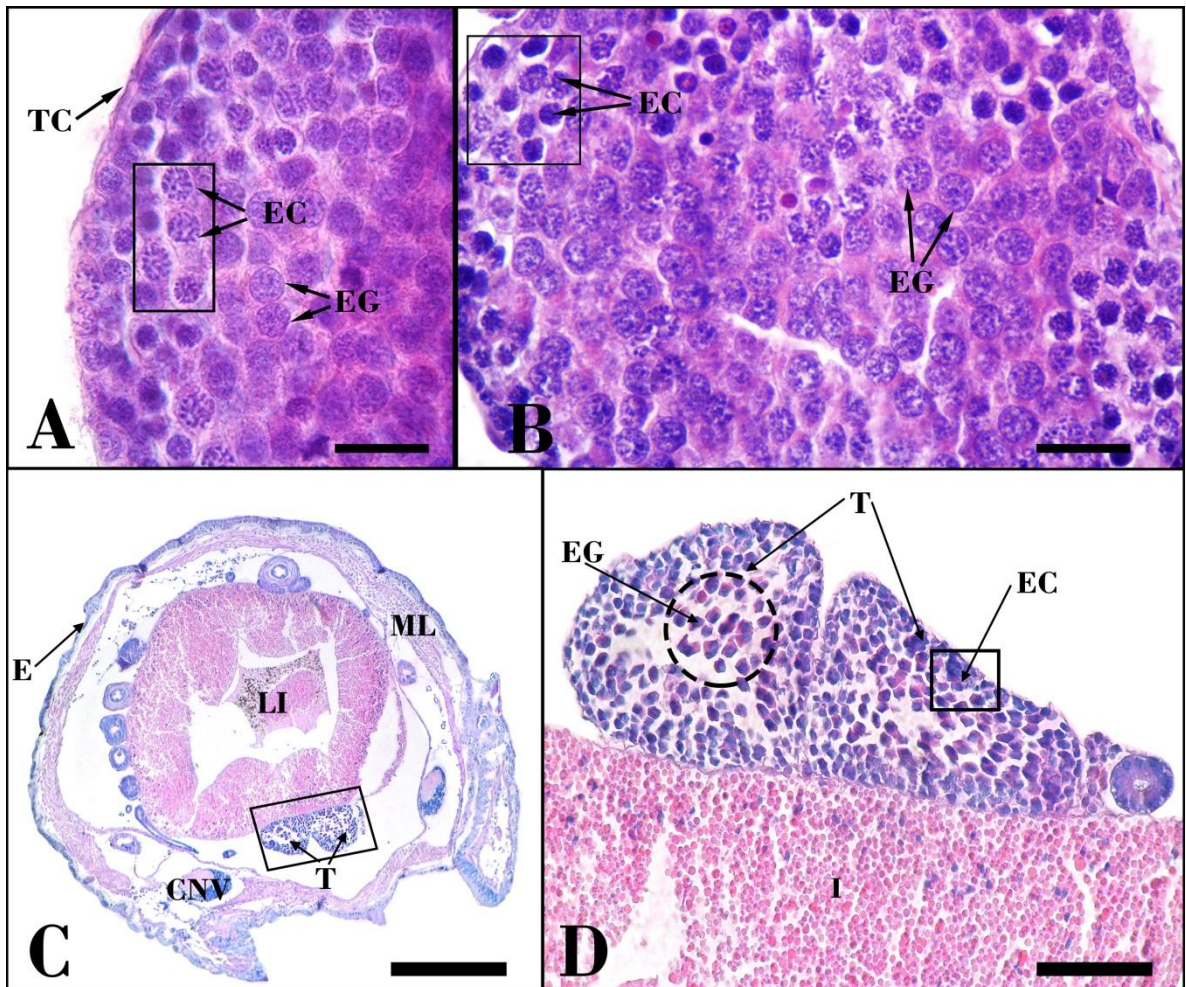
**Figura 3.** Fotografía estereoscópica de los diferentes órganos que conforman el tracto reproductivo de un macho reproductivo de *Macroperipatus aff. geayi*. A) Vista dorsal del testículo que es tubular y plegado y se conecta a la vesícula seminal a través de un conducto estrecho (asterisco). B) Vista lateral de la vesícula seminal con un diámetro mayor a los demás órganos del tracto. C). Vista lateral del conducto eferente que tiene forma convoluta y tortuosa. Hacia la parte posterior ambos conductos se fusionan (asterisco) para dar inicio al conducto deferente. D) Vista dorsal del conducto deferente, en el que se observan pliegues y un mayor diámetro en comparación con el conducto eferente. E) vista dorsal de la porción descendente del conducto deferente donde se observan dos espermátóforos (asteriscos). F) Vista lateral del conducto eyaculador que hacia la parte más posterior termina en forma de bulbo. T, testículo; VS, vesícula seminal; CE, conducto eferente; CD, conducto deferente; SP, espermátóforo; DE, conducto eyaculador.



## **3.2 DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA**

**3.2.1 Testículo.** El testículo presentó una composición similar para todas las categorías de machos (fetos, neonatos y colectados en campo). Este está rodeado por una delgada capa de tejido conectivo. Hacia el interior se observan abundantes células del epitelio germinal que consisten de espermatogonias y espermatocitos (Figura 4). Las espermatogonias son células poligonales, sus núcleos son grandes y redondeados y se observan los gránulos de cromatina. Los espermatocitos corresponden a espermatocitos primarios, son células grandes y redondeadas con núcleos grandes e irregulares, la cromatina puede estar en interfase o formando figuras mitóticas. Aunque parece haber una mezcla azarosa de ambos tipos celulares, se encuentran más espermatocitos primarios hacia la periferia del órgano (Figura 4 A y B).

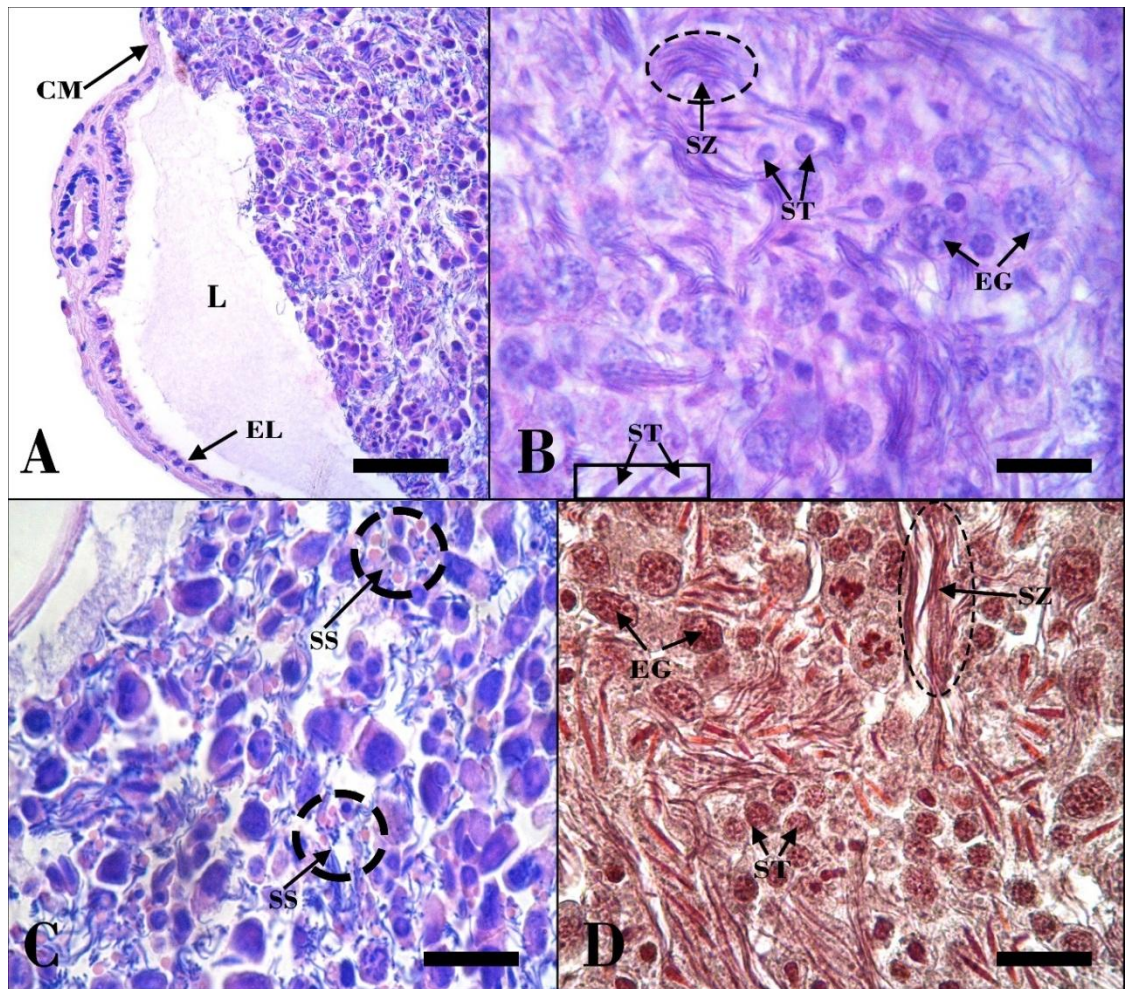
**Figura 4.** Testículo de *Macroperipatus* aff. *geayi*. A) Corte transversal de testículo de un macho reproductivo. B) en el centro del testículo se encuentran dispersas las espermatogonias y espermatocitos primarios en la región periférica del órgano. EC, espermatocitos; EG, espermatogonias; TC, Tejido conjuntivo. C) Sección transversal del cuerpo de un feto macho pigmentado de *M. aff. geayi*. Los testículos (T) están ubicados ventralmente respecto del canal alimentario. D) En el testículo se observan espermatogonias en la zona central y espermatocitos en la periferia. E, Ectodermo; CNV, cordón nervioso ventral; LI, lumen del intestino; ML, Musculatura longitudinal; I, Intestino; T, Testículo. Barra de escala A= 140  $\mu$ m, B= 30  $\mu$ m



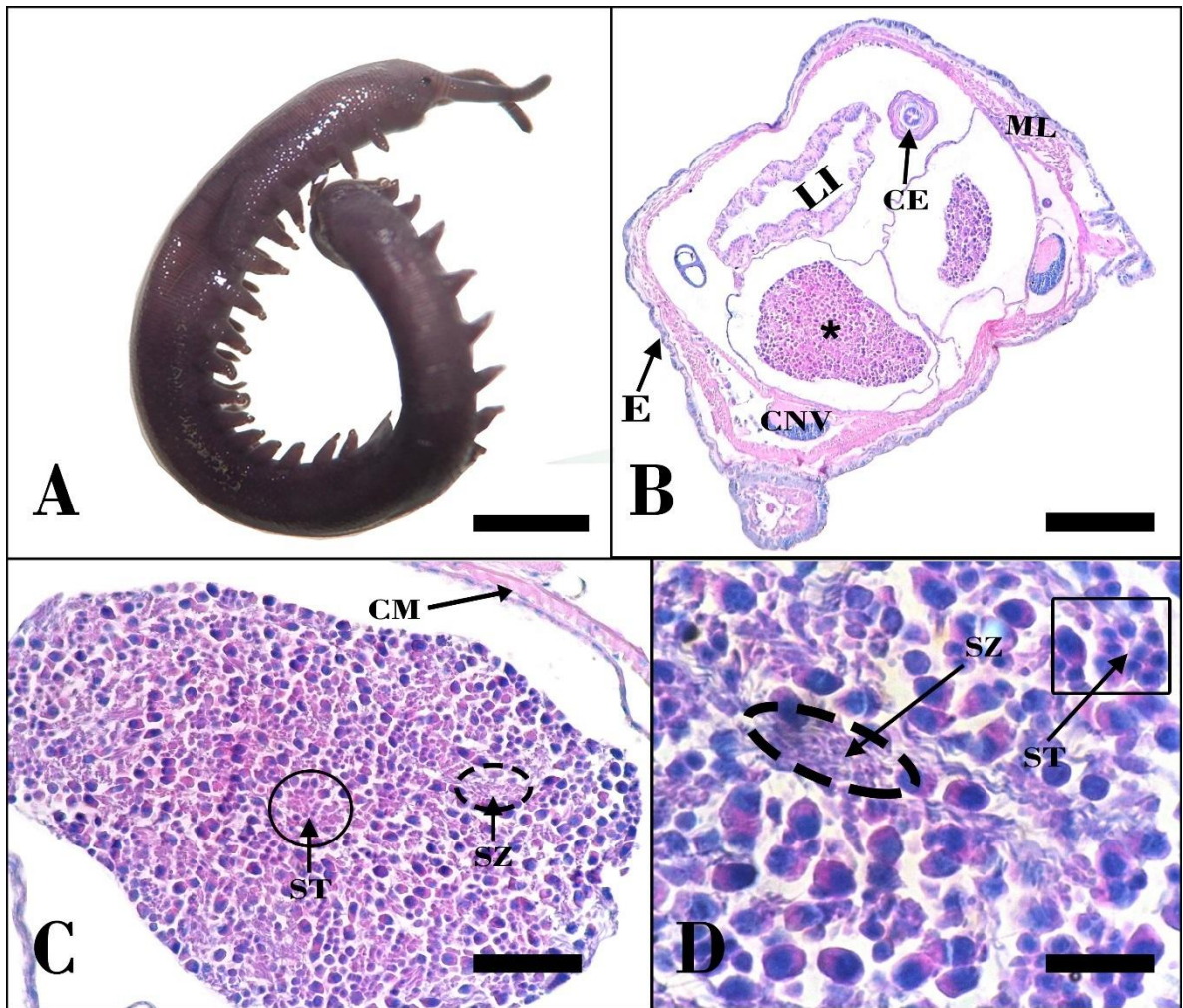
La vesícula seminal es de diámetro mayor que el testículo; es un órgano revestido por un epitelio luminal con células cuboidales simples de citoplasma acidófilo, debajo del cual se encuentra una delgada capa de tejido conjuntivo con fibras de colágeno y más externamente una fina capa que incluye algunas fibras

musculares lisas (Figura 5 A, 6 C). En el lumen de la vesícula seminal de neonatos y la serie de adultos se encuentran todos los tipos de células de la línea germinal, es decir, espermatogonias, espermatocitos primarios y secundarios, espermatídes y los espermatozoides (Figura 5 B, C y D). Estas células se observan dispersas y sueltas en el lumen sin tener algún tipo de organización y están acompañadas de una secreción eosinófila. De esta forma en la vesícula seminal se observaron todos los tipos celulares de la espermatogénesis y espermiogénesis, encontrándose fácilmente espermatídes en diferentes estados de maduración (Figura 5 D). Hacia la parte más posterior de la vesícula seminal se encuentran en mayor abundancia espermatídes en maduración y espermatozoides. Los espermatozoides son filiformes y están acompañados de una secreción eosinófila (Figura 5 C y C). Por lo tanto, la mitosis de las espermatogonias se daría en el testículo y la espermatogénesis y espermiogénesis en la vesícula seminal.

**Figura 5.** Vesícula seminal de adultos de *M. aff. geayi*. Cortes transversales en los que se observa A) El epitelio luminal cúbico está rodeado por una delgada capa de tejido conectivo y fibras musculares. CM, capa muscular; L, lumen; EL, epitelio cúbico. B) Epitelio espermático en diferentes estados de la espermatogénesis y espermiogénesis. SG, espermatogonias; ST, espermátides; SZ, espermatozoides. C) Hacia el lumen de la vesícula seminal se observan las secreciones que acompañan las células de la línea germinal. SS, secreciones. D) Se observan en detalle células de la línea germinal en diferentes estados, con mayor presencia de espermátides y espermatozoides (Tinción tricrómica). ST, espermátides; SZ espermatozoides. Barra de escala: A= 24  $\mu$ m, B, C y D= 10  $\mu$ m



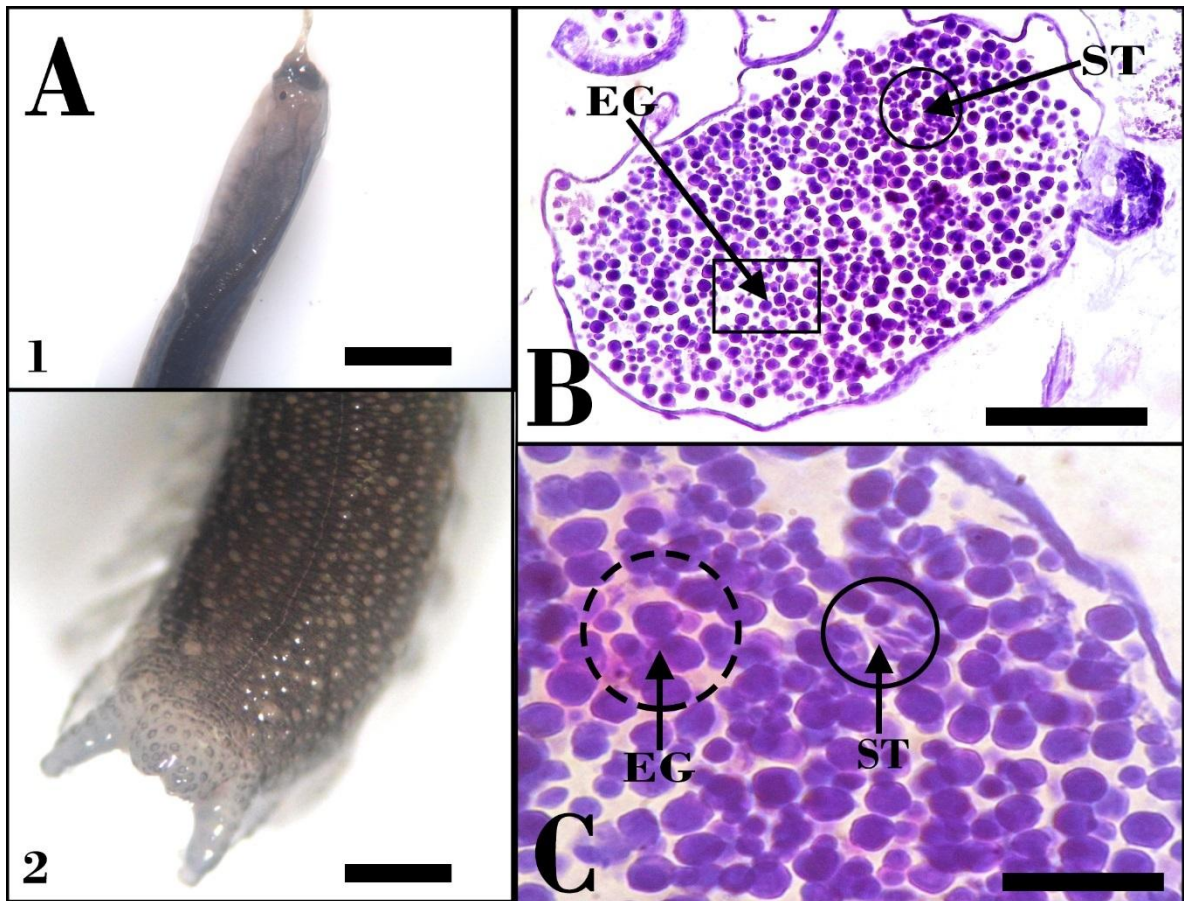
**Figura 6.** Sección transversal del cuerpo de un A) feto macho pigmentado de *M. aff. geayi*, donde se observa B) la vesícula seminal (\*) en posición ventral respecto del canal alimentario (LI) y C) hacia el lumen de éste se observan en detalle espermatogonias, espermatocitos y espermátides tempranas. D) Hacia la parte más posterior de la vesícula seminal se observan espermátides en maduración y espermatozoides CE, conducto eyaculador; CM, capa muscular; CNV, cordón nervioso ventral; E, ectodermo; ET, espermátides; EZ, espermatozoides; LI, lumen del intestino; ML, musculatura longitudinal; SZ, espermatozoides. Barra de escala A= 1 mm B=140 µm, C= 30 µm y D= 10 µm.



La vesícula seminal para los fetos fue similar al de las otras dos categorías (neonatos y colectados en campo) (Figura 6C); sin embargo, hay variación en la conformación celular del epitelio germinal en esta última. En el lumen de fetos más avanzados y ya pigmentados se encontró toda la serie de células de la línea

germinal hasta espermatozoides (Figura 6D), de la misma manera como en neonatos y adultos. Para aquellos fetos un poco más tempranos (sólo parcialmente pigmentados) no se encontraron gametos, sin embargo, la espermatogénesis y la espermiogénesis ya está ocurriendo (Figura 7 B y C).

**Figura 7.** Sección transversal del cuerpo de un A) feto parcialmente pigmentado donde se observa 1) la región anterior y 2) posterior. B) corte transversal de la vesícula seminal donde se observan las células de la línea germinal excepto espermatozoides. C) región posterior de la vesícula seminal donde se observan espermátides en maduración. EG, espermatogonias; ET, espermátides tempranas. Barra de escala: A) 1= 1mm, 2= 1mm; B= 30  $\mu$ m; C= 10  $\mu$ m.

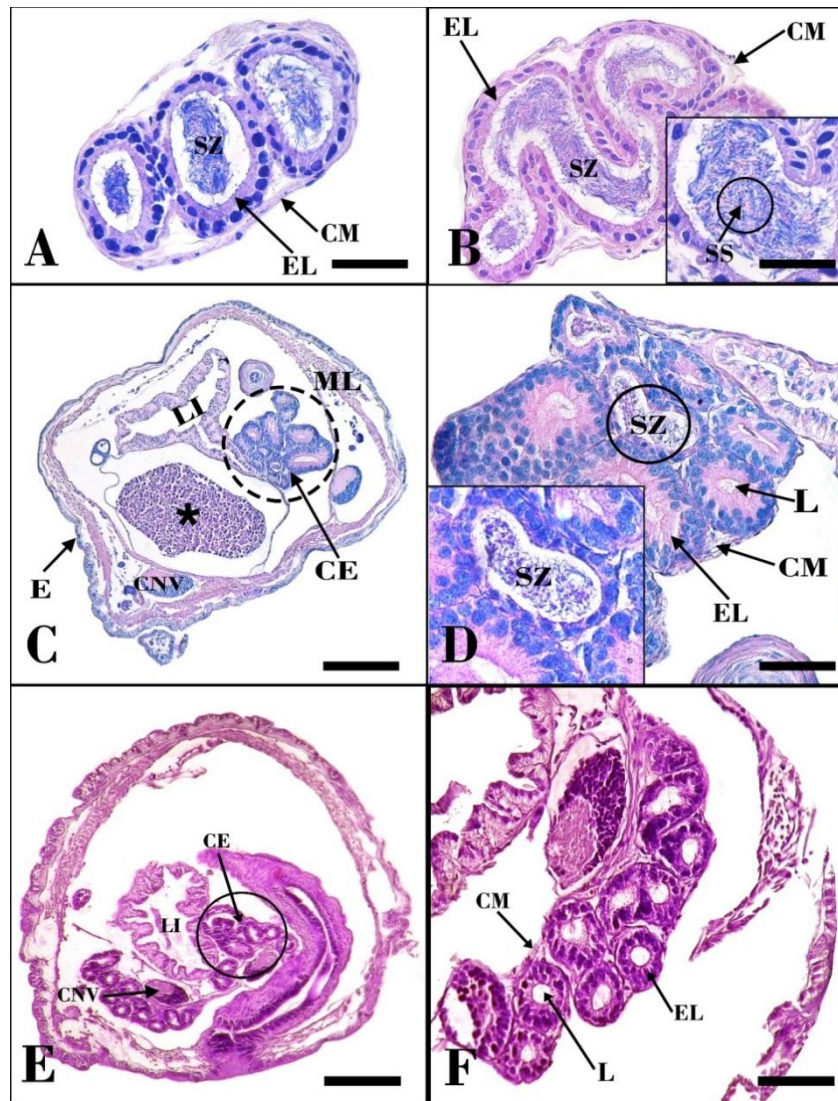


De esta forma y de acuerdo con los resultados, el individuo de menor estado de desarrollo con espermatozoides en la vesícula seminal y el conducto eferente fue un individuo aún no nacido, un feto pigmentado con una longitud corporal de 19

mm. Los machos son capaces de producir esperma desde que están en el oviducto materno y por tanto nacen ya sexualmente maduros.

**3.2.2 Conducto Eferente.** Los conductos eferentes de fetos, neonatos y adultos tienen un epitelio luminal cúbico simple con núcleos basales redondos y un citoplasma acidófilo. Por debajo del epitelio se encuentra un tejido conjuntivo delgado que posee fibras de colágeno y rodeándolo una delgada capa de fibras musculares lisas (Figura 8 A, D y F). El lumen se hace más amplio hacia la parte posterior (Figura 10 B). Dentro del lumen se encontraron abundantes espermatozoides acompañados por una secreción eosinófila en la porción anterior media del conducto eferente (Figura 10 B). Para los fetos el conducto eferente es similar, pero con un lumen menos amplio (Figura 8D); aquellos completamente pigmentados ya presentan espermatozoides (Figura 8D), mientras que los parcialmente pigmentados carecían de esperma luminal (Figura 8 F).

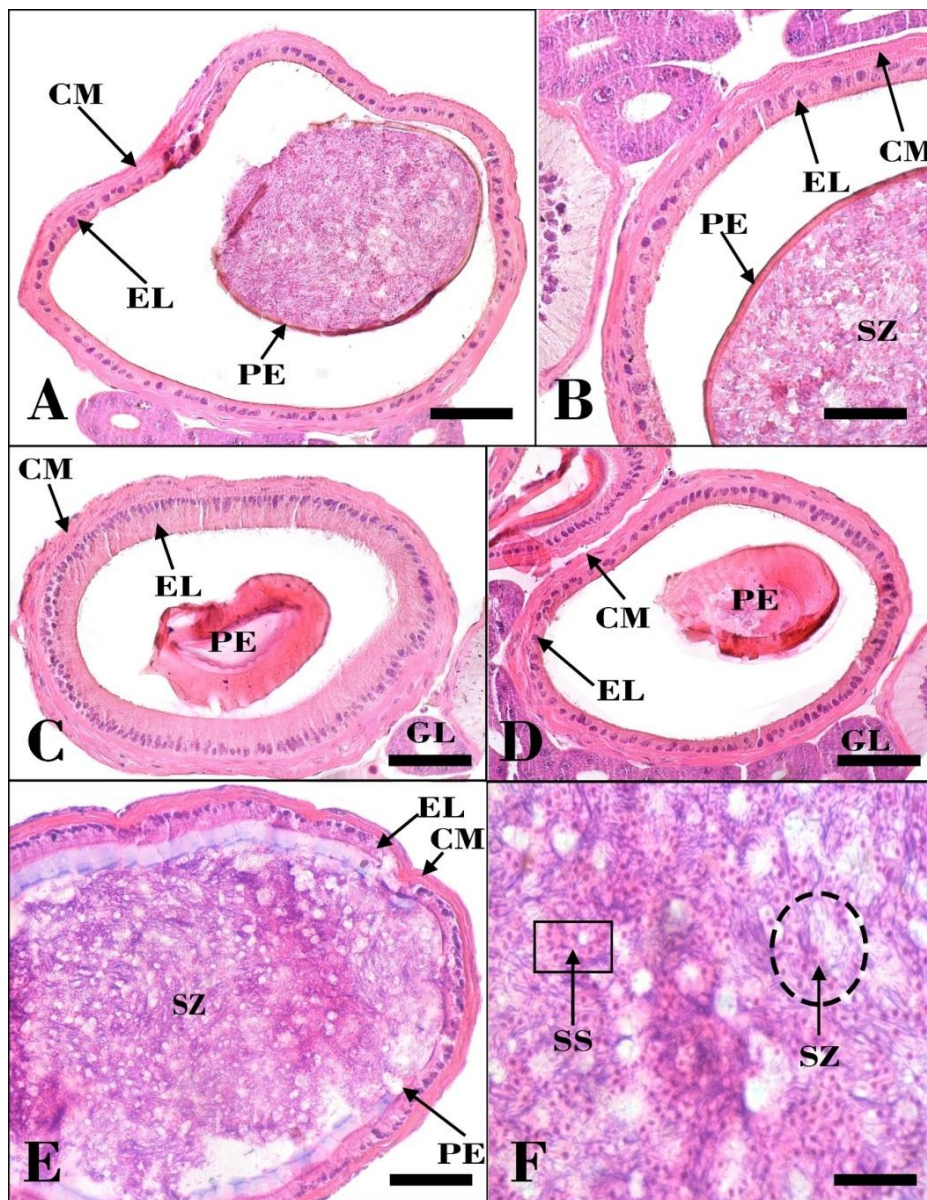
**Figura 8.** Sección transversal del conducto eferente para machos de *M. aff. geayi*: Adultos A) Epitelio luminal cúbico rodeado por una capa muscular; hacia el lumen se observan los espermatozoides que están acompañados por una secreción. B) En la porción más posterior del conducto eferente el lumen se distiende y se presenta una mayor concentración de espermatozoides junto con una secreción eosinófila. Corte transversal de un feto pigmentado C) el conducto eferente se ubica ventralmente respecto del canal alimentario, D) el epitelio luminal es cúbico y hacia el lumen ya se observan espermatozoides (inserto). Corte transversal para fetos parcialmente pigmentados, donde E) el conducto se ubica ventralmente respecto del canal alimentario y F) hay ausencia de espermatozoides en la zona luminal. CE, conducto eferente; CM, capa muscular; E, epidermis; EL, epitelio luminal; L, lumen; LI, lumen del intestino; ML, musculatura longitudinal; SZ, espermatozoides. Barra de escala A y B= 20  $\mu$ m, C= 140  $\mu$ m, D= 30  $\mu$ m, E= 140  $\mu$ m y D= 30  $\mu$ m.



**3.2.3 Conducto Deferente.** Los conductos deferentes en neonatos y la serie de machos colectados en campo están limitados de afuera hacia adentro por 4 a 5 capas de fibras de músculo esquelético, seguidas de un tejido conjuntivo laxo delgado que presenta fibras de colágeno y un epitelio luminal simple de células altas columnares con núcleos basales y un citoplasma eosinófilo. En el lumen se observó una secreción intensamente eosinófila en la porción anterior del ducto (Figura 9 A y B). En la porción posterior media del ducto, en el lumen se observaron los espermatozoides. El epitelio luminal se distiende para dar cabida al espermatozoides por lo que hay una reducción de la altura epitelial (Figura 9 C y D).

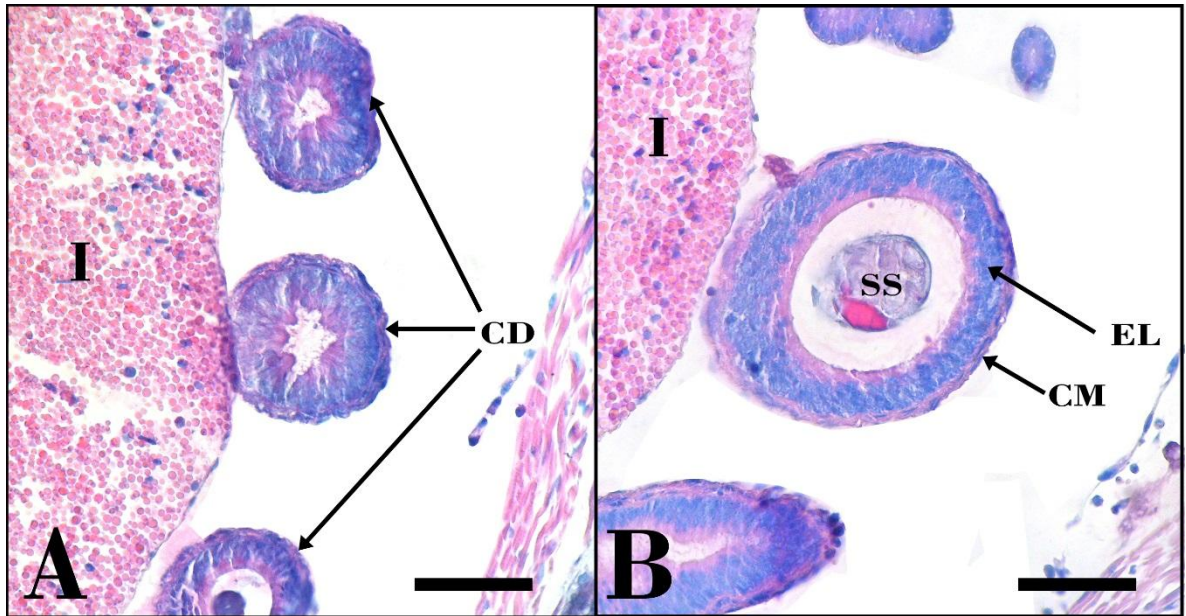
Los espermatóforos son estructuras ovales grandes formadas por una pared delgada acelular eosinófila y un contenido lleno de espermatozoides embebidos en una secreción más clara eosinófila y vacuolada (Figura 9 E y F).

**Figura 9.** Secciones transversales del conducto deferente de machos adultos de *M. aff. geayi*. A) Presencia de una secreción eosinófila en el lumen; epitelio columnar rodeado por una delgada capa de tejido conjuntivo y una capa muscular. B) Epitelio luminal se distiende hacia la parte más posterior del conducto. Secreción eosinófila luminal. C) y D) En el lumen se observa la pared del espermátforo y al interior de éste los espermatozoides. E) En la porción media del espermátforo, éste ocupa en su totalidad el espacio luminal. F) Interior del espermátforo, en el que hay una alta concentración de espermatozoides acompañada de una secreción eosinófila vacuolar. CM, capa muscular; EL, epitelio; GL, Glándulas anales; PE, pared del espermátforo; SZ, espermatozoides; SS, secreción acompañante de los espermatozoides. Barras de escala: A y B 20  $\mu$ m, C y D 30  $\mu$ m; E = 30  $\mu$ m y F = 10  $\mu$ m



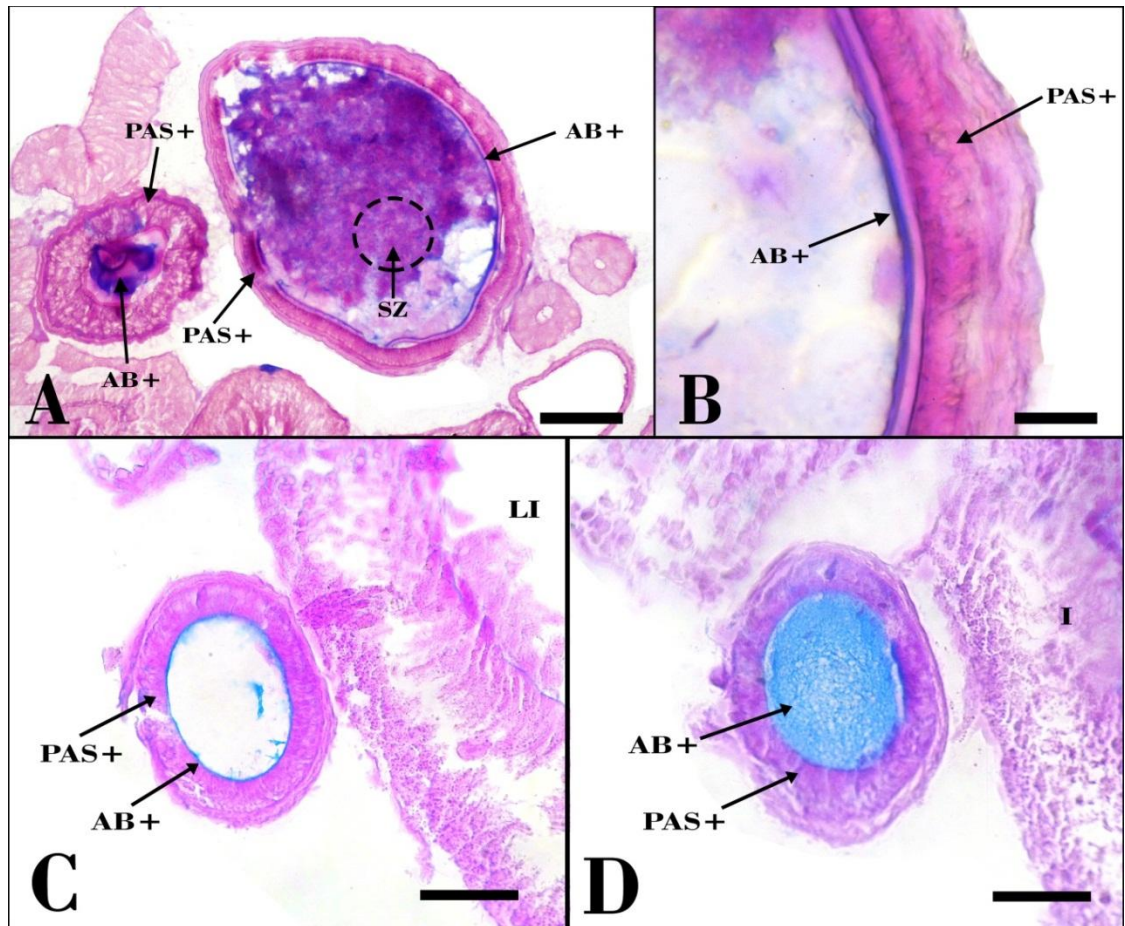
A diferencia de los neonatos y los machos colectados en campo los conductos deferentes de los fetos están rodeados por 2 o 3 bandas de músculo liso y un epitelio columnar simple con núcleos basales basófilos. En el lumen al igual que los otros estados reproductivos se evidenció la presencia de una secreción eosinófila en la parte anterior del ducto (Figura 10 A y B) pero no se encontraron espermatozoides en ninguno de los estados.

**Figura 10.** Secciones transversales de la región media del cuerpo de un feto macho de *M. aff. geayi*. A) Los conductos deferentes ubicados ventralmente respecto del canal alimentario. B) Conductos deferentes con presencia de secreción luminal en la región posterior media. CD, conducto deferente; CM, capa muscular; EL, epitelio cúbico; I, canal alimentario; SS, secreción eosinófila. Barra de escala A y B = 30  $\mu$ m.



Los conductos deferentes (fetos, neonatos y colectados en campo) fueron PAS positivos sobre el borde luminal del epitelio, indicando la presencia de carbohidratos neutros (Figura 11). La reacción de AB fue positiva para la pared del espermátforo, así como para la matriz granular en la que se encuentran los espermatozoides, indicando la presencia de mucopolisacáridos carboxilados (Figura 11 A y B).

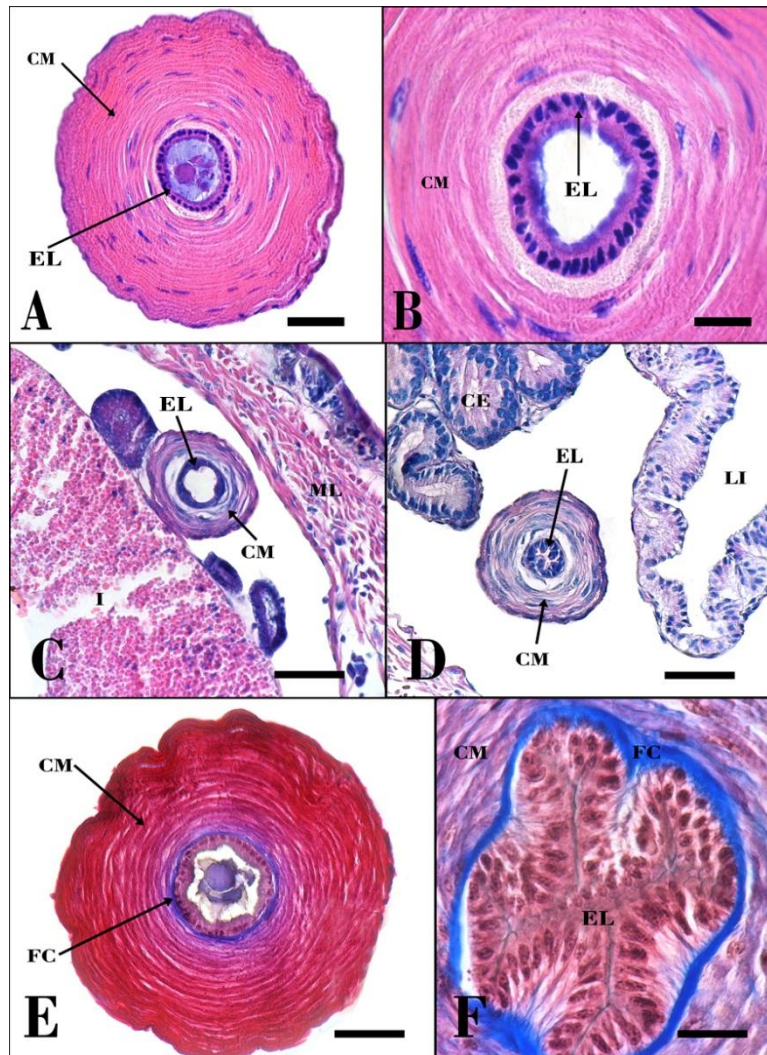
**Figura 11.** Conducto deferente con espermátforo en *M. aff. geayi*. PAS y AB (mirar metodología). A) Conducto deferente PAS positivo para el borde del epitelio luminal y para la secreción asociada a los espermatozoides y B) AB positiva para la pared del espermátforo. C) y D) pruebas de PAS y AB positivas en la parte anterior y posterior de conducto deferente para el espermátforo en neonatos. LI, lumen del intestino; I, Intestino. Barra de escala A y B= 20  $\mu$ m, C y D= 30  $\mu$ m.



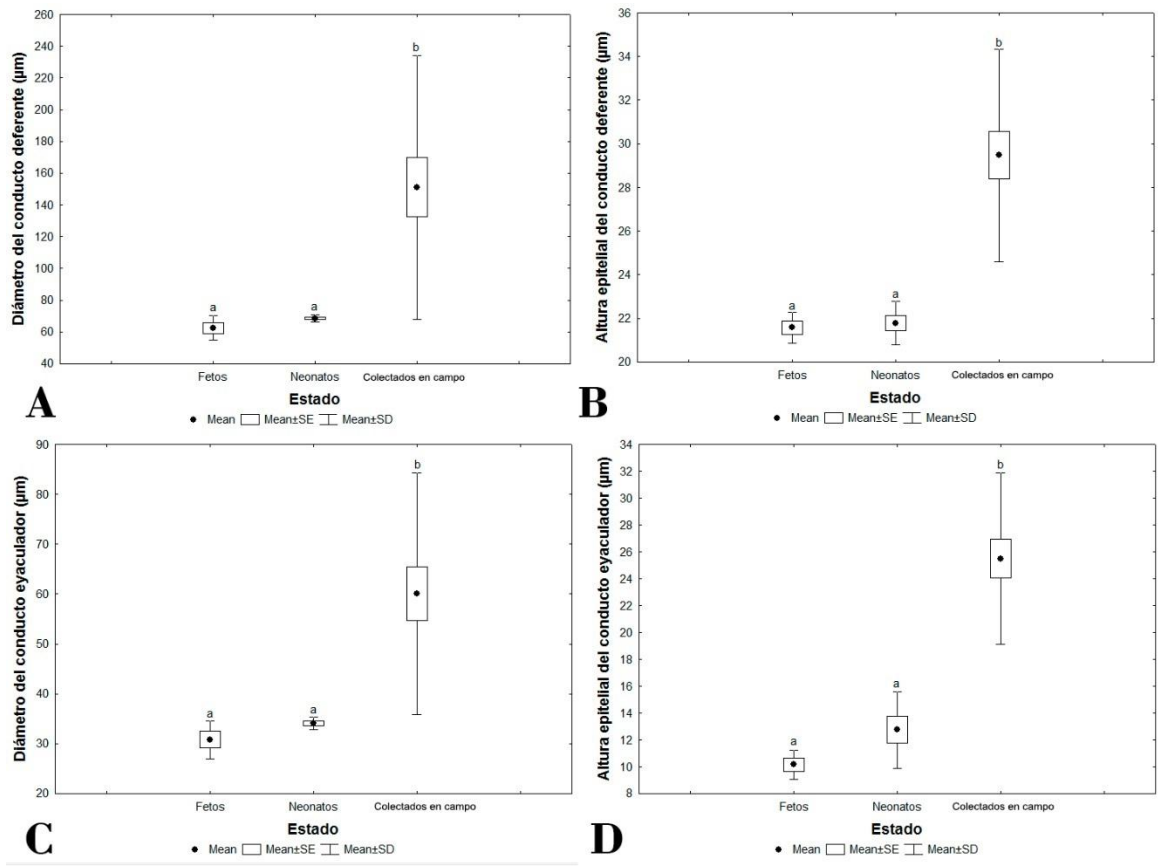
Se encontraron diferencias significativas en el diámetro del conducto deferente y en la altura epitelial entre las categorías estudiadas (fetos, neonatos y colectados en campo) ( $H_{(2,33)} = 15,27, P = 0,001$ ;  $H_{(2,33)} = 16,54, P = 0,001$ ). El diámetro y el epitelio de los conductos deferentes para los machos colectados en campo fue significativamente mayor respecto de los neonatos y fetos (Figura 13A). (Figura 13B).

**3.2.4 Conducto Eyaculador.** El conducto eyaculador consiste de un epitelio luminal cúbico simple, un tejido conjuntivo delgado con fibras de colágeno que está rodeado por una muy gruesa capa de varias bandas de músculo estriado (Figura 12 A y B, 12 E y F). El lumen de este conducto presentó una secreción altamente eosinófila y débilmente basófila hacia los bordes del epitelio luminal y carente de espermatozoides. Para los fetos la morfología fue similar (Figura C y D). El diámetro y la altura epitelial del conducto eyaculador difirieron significativamente entre las categorías evaluadas ( $H_{(2,33)} = 15,92, P = 0,001$ ;  $H_{(2,33)} = 18,17, P = 0,001$ , respectivamente), los mayores valores corresponden a los machos colectados en campo en relación a los neonatos y fetos (Figura 13 C y D)

**Figura 12.** Sección transversal del conducto eyaculador de machos de *M. aff. geayi*. A) Macho adulto; epitelio luminal rodeado por un conjuntivo, seguido de una gruesa capa de músculo esquelético. B) Detalle del epitelio luminal, rodeado por una muy densa capa de músculo esquelético. CM, capa muscular; ETC, epitelio cúbico luminal. C) Corte transversal que muestra la parte anterior del conducto eyaculador en fetos, donde se observan las capas de músculo esquelético, y D) en la parte posterior se ve la forma cruciforme característica de la abertura genital. Corte transversal conducto eyaculador (tinción tricrómica). E) Corte transversal de conducto eyaculador en macho adulto con coloración TM. Se observa el epitelio luminal rodeado por un tejido conjuntivo que presenta fibras de colágeno y una densa capa de fibras musculares. F) Epitelio luminal en la porción más distal del conducto, con la forma cruciforme típica de la abertura del gonoporo. CE, conducto eferente; CM, capa muscular; EP; epitelio luminal; FC, fibras de colágeno; LI, lumen del intestino. Barra de escala: A= 30  $\mu$ m y B= 10  $\mu$ m; C y D= 30  $\mu$ m, E = 30  $\mu$ m y F= 10  $\mu$ m.



**Figura 13.** Relación entre los estadios reproductivos y los promedios de A) los diámetros y B) alturas epiteliales del conducto deferente; C) diámetros y D) alturas epiteliales del conducto eyaculador. La línea media representa los valores promedio, las cajas muestran los errores estándar y los bigotes representan los valores mínimos y máximos. Además, se indican los estadios que presentan diferencias significativas entre sí ( $P < 0,001$ ).



#### 4. DISCUSIÓN

En este trabajo se describió por primera vez la morfología e histología del tracto reproductivo en machos en diferentes etapas de su ciclo de vida para una población de *Macroperipatus* aff. *geayi*. Para los machos el tracto reproductivo fue similar a las descripciones reportadas para otras especies de la familia Peripatidae (*Epiperipatus biolleyi*, Storch *et al.*, 1995 y *Peripatus sedgwicki* Storch y Ruhberg, 1990), pero diferente al de las especies de la familia Peripatopsidae en las que el conducto eferente tiene proporcionalmente una mayor longitud (Figura 13) y allí mismo se da la formación del espermátforo (Storch y Ruhberg, 1977), y en que el conducto deferente es mucho más corto (Figura 13) (Ruhbger, 1976; Storch y Ruhberg, 1977). Para especies de la familia Peripatidae se ha evidenciado que durante el apareamiento los machos y hembras acoplan los últimos pares de oncópodos, y el macho deposita directamente el espermátforo sobre el gonoporo de la hembra a través del conducto eyaculador (Lavallard y Campiglia, 1975; Walker y Campiglia, 1998). Entretanto, en especies de la familia Peripatopsidae la inseminación es intradérmica, el macho coloca el espermátforo sobre el integumento de la hembra por medio de un órgano copulador (pene) o estructuras sexuales que están asociadas a la región dorsal de la cabeza (Tait y Norman, 2001).

La posición de los órganos (testículos, vesículas seminales y conductos eferentes) del tracto reproductivo dentro de la cavidad hemocélica de los machos respecto del canal alimentario dependió de la categoría de los individuos, estando desplazada lateralmente en los machos de mayor tamaño y estado de desarrollo, lo cual concuerda con las descripciones realizadas por otros autores para especies de la familia Peripatidae y Peripatopsidae (Storch y Ruhberg, 1990; Storch y Ruhberg, 1993; Storch *et al.*, 1995).

La histología testicular de los machos de *M. aff. geayi* fue similar a lo reportado para otras especies de las dos familias de onicóforos. En este primer órgano tiene lugar el inicio de la espermatogénesis (*Peripatopsis moseley*, *Ophisthopatus cinctipes* (Peripatopsidae) y *Peripatus sedgwicki* (Peripatidae) (Ruhberg y Storch, 1976; Storch y Ruhberg, 1990). Por el contrario, la finalización de la espermatogénesis incluyendo la espermiogénesis y la espermiación ocurren en un órgano aparte, la vesícula seminal, similar a lo encontrado por estos mismos autores. Esta separación espacial de los procesos de la formación de gametos (mitosis y meiosis) también se ha observado en otros grupos de invertebrados, por ejemplo para algunas especies de anélidos se ha evidenciado que la primera parte de la espermatogénesis ocurre en el testículo y la culminación de ésta junto con la espermiación tienen lugar en el celoma (Purschke y Fursman, 2005; Radashevsky *et al.*, 2015). Sin embargo, en otros invertebrados es común que ambos procesos tengan lugar en el testículo (Roosen-Runge, 1977).

Las secreciones eosinófilas y vacuolares que acompañan las células de la línea germinal en el lumen de la vesícula seminal observadas en *M. aff. geayi* son una característica única que sólo se presenta en el phylum Onychophora (Storch *et al.*, 1995). De acuerdo con la literatura estas secreciones provendrían de los espermatocitos en maduración que liberan gotas secretoras. Éstas se fusionan entre sí para formar masas de cuerpos que viajan hacia los conductos eferentes y el conducto deferente. Tales secreciones estarían involucradas en la formación de la pared del espermatóforo (Camatini *et al.*, 1979; Jamieson, 1986; Storch y Ruhberg, 1977; Storch *et al.*, 1995).

A nivel histológico los conductos eferentes no difieren de las descripciones para las otras especies de onicóforos. Sin embargo, para *M. aff. geayi* los espermatozoides están libres dentro de la zona luminal del conducto eferente y no se da la formación del espermatóforo, contrario a lo que ocurre en la especie

*Opisthopatus cinctipes*, (Peripatopsidae) en donde las células espermáticas están embebidas en un espermátforo (Storch y Ruhberg, 1977; Storch *et al.*, 2000).

El lumen del conducto deferente presentó una sustancia eosinófila en la región anterior, similar con lo encontrado en otras especies. Estas secreciones del epitelio luminal junto con las de la vesícula seminal y el conducto eferente permitirían la formación del espermátforo en Peripatidae y Peripatopsidae (Storch y Ruhberg, 1990; Storch *et al.*, 1995). En esta zona, el epitelio luminal y la pared del espermátforo fueron positivos para PAS y AB lo que indica que la presencia de mucopolisacáridos y carbohidratos ácidos estaría involucrada en la formación del espermátforo, así como en la nutrición y maduración del esperma como ha sido propuesto para otras especies de ambas familias (Camatini *et al.*, 1979; Jamieson, 1986; Storch y Ruhberg, 1977; Storch y Ruhberg, 1990; Storch *et al.*, 1995). No obstante, para especies del género *Paraperipatus* (Peripatopsidae) se ha reportado que los machos carecen de estas zonas secretoras encargadas de la formación del espermátforo, es decir, que los espermatozoides están dispersos libremente en el tracto reproductivo (Willey, 1898; Cuénot, 1949; Ruhberg, 1985).

Los espermátforos de forma elipsoidal de *M. aff. geayi* presentan características similares a las descripciones hechas para las especies neotropicales *Epiperipatus biolleyi* y *Peripatus sedgwicki* (Peripatidae), pero difiere del de otros géneros asiáticos de Peripatidae en tamaño y forma *Typhloperipatus* y *Eoperipatus* (Kemp, 1914; Storch *et al.*, 1995). Para algunas de las especies de la familia Peripatopsidae los espermátforos tienen forma redonda y la pared está formada por varias capas (Pflugfelder, 1968; Storch y Ruhberg, 1977). La gran variedad de diseños y tipos de formación del espermátforo en onicóforos está relacionada con los distintos modos de transferencia de éste (Elliot *et al.*, 1993; Monge-Nájera *et al.*, 1993; Sherbon y Walker, 2004; Walker y Tait, 2004; Walker *et al.*, 2006).

El diámetro del conducto deferente varió significativamente entre los fetos y neonatos y adultos. Los machos adultos y neonatos almacenan dentro del lumen del conducto deferente a los espermátóforos, lo que hace que el diámetro y epitelio luminal se distiendan. Por otro lado, los fetos no presentan aún espermátóforos en el lumen del conducto deferente y por tanto su diámetro es menor. En los fetos de *M. aff. geayi* no se observaron espermátóforos en el lumen del conducto deferente, lo que significa que, aunque ya producen espermatozoides aún no serían capaces de fertilizar los gametos femeninos; por lo tanto, sólo como neonatos (que ya producen espermátóforos) podrían ser considerados machos reproductivamente activos.

El conducto eyaculador de *M. aff. geayi* posee un epitelio luminal que está rodeado por fibras de colágeno y una densa capa de músculo esquelético que le confiere movimiento voluntario y que podría tener un papel fundamental en el apareamiento, permitiendo la expulsión del espermátóforo directamente al gonoporo de la hembra, similar a lo encontrado para otras especies de la familia Peripatidae (Reid, 1996; Campiglia y Walker, 1995; Walker y Campiglia, 1998; Mayer, 2007). En especies de la familia Peripatopsidae de los géneros *Peraperipatus* de Nueva Guinea (Ruhberg, 1985) y *Austroperipatus* de Australia (Bouvier, 1915), la cópula se da a través de estructuras similares a un pene, el cual es usado para transferir el esperma (Tait y Briscoe, 1990). El diámetro y altura epitelial del conducto eyaculador parecen variar con el tamaño corporal en *M. aff. geayi*, de manera que son mayores en individuos más grandes.

Microscópicamente los fetos pigmentados de *M. aff. geayi* presentaron esperma en las vesículas seminales y en los conductos eferentes. Esto coincide con lo reportado para otras especies de Peripatidae (*Peripatus jamaicensis*, Havel *et al.*, 1989 y *Peripatus eisenii* Rucker, 1900), para las que se había encontrado que los machos alcanzan la madurez sexual a un estado de desarrollo temprano, desde que están en el útero de la hembra madre. Havel *et al.* (1989) plantea que los

machos se reproducen lo más rápido posible siguiendo la estrategia propuesta por Ghiselin (1974), conocida como “dispersión de machos”. Esta estrategia indica que los machos invierten su energía en una reproducción muy temprana en lugar de invertir en crecimiento, siendo este patrón frecuente para otras especies vivíparas, así como en las ovíparas de la familia Peripatopsidae en el que los machos alcanzan la madurez rápidamente y se aparean con mayor frecuencia (Curach y Sunnucks, 1999; Tutt *et al.*, 2002)

El rango de longitud corporal para los machos de *M. aff. geayi* fue similar a lo encontrado para la especie neotropical *P. jamaicensis*, pero difiere del tamaño de la madurez sexual, ya que para la población del presente estudio fue de 19 mm mientras que para *P. jamaicensis* fue de 28 mm (Havel *et al.*, 1989). Se evidenció además una variación en el tamaño corporal de los machos de *M. aff. geayi* encontrándose fetos con longitudes semejantes o incluso mayores a las de machos nacidos tiempo atrás. Havel *et al.* (1989) observando asimismo este fenómeno propusieron que esta variación está relacionada con el tamaño de las madres de manera que hembras de mayor longitud corporal paren machos de mayor tamaño, y aquellas madres de menor longitud producirían hijos machos maduros con tamaños inferiores. Este tipo de plasticidad y la alimentación proporcionada por la madre influyen en el crecimiento intrauterino de los hijos (Havel *et al.*, 1989).

## 5. CONCLUSIONES

Los machos de *Macroperipatus* aff. *geayi* presentaron un tracto reproductivo que macro y microscópicamente fue similar a lo reportado para otras especies de la familia Peripatidae.

Los especímenes de esta población inician el proceso de espermiogénesis durante su desarrollo fetal y producen espermatozoides como fetos avanzados, de manera que alcanzan la madurez sexual antes de nacer; sin embargo serían reproductivamente activos cuando neonatos, ya que sólo en este estado son capaces de producir espermátóforos para transferir al gonoporo de la hembra.

## BIBLIOGRAFIA

Abrámoff M., Magalhães P. y Ram S., 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **11**: 36-43.

Baccetti B. y Dallai R., 1977. The Spermatozoon of Onychophorans *Peripatoides leuckarti*. *Tissue & Cell*, **9**: 563-566.

Baccetti B., Dallai R., Burrini A. y Selmi G., 1976. Fine structure of the spermatozoon of an onychophoran, *Peripatopsis*. *Tissue & Cell*, **8**: 659-672.

Barclay S., Ash J. y Rowell D., 2000. Environmental factors influencing the presence and abundance of a log-dwelling Invertebrate, *Euperipatoides rowelli* (Onychophora: Peripatopsidae). *Journal of Zoology*, **250**: 425-436.

Bouvier E., 1904. Les oeufs des Onychophores. *Archives du muséum d'histoire naturelle*, **6**: 1-50.

Bouvier E., 1915. Results of Dr E. Mjöberg's Swedish Scientific Expeditions to Australia 1910-1913. 3 Onychophora. *Arkiv för Zoologi*, **10**: 1-23.

Brockmann C., Mesibov R., Ruhberg H., 1997. Observations on *Ooperipatellus decoratus*, an oviparous onychophoran from Tasmania (Onychophora: Peripatopsidae). *Entomologica Scandinavica Supplement*, **51**: 319-329.

Camatini M., Franchi E. y Saita A., 1979. Ultrastructural investigation of the spermiogenesis in *Peripatopsis capensis* (Onychophora). *Journal Morphology*, **159**: 29-48.

Cuénot L., 1949. Les Onychophores. *Traité de Zoologie*(Ed. PP. Grassé) **4**. Masson et Cie, Paris.

Elliot S., Tait N. y Briscoe D., 1993. A pheromonal function for the crural glands of the onychophoran *Cephalofovea tomahmontis* (Onychophora: Peripatidae). *Journal of Zoology*, **231**: 1-9.

Evans R., 1901. On two new species of Onychophora from the Siamese Malay states. *Journal of Animal Ecology*, **44**: 473:538.

Curach N. y Sunnucks P., 1999. Molecular anatomy of an onychophoran: compartmentalized sperm storage and heterogeneous paternity. *Molecular Ecology*, **8**: 1375:1385.

Gaffron E., 1885. Beiträge zur Anatomie und Histologie von *Peripatus*. *Zoologische Beiträge*, **1**: 33–60.

Ghiselin M., 1974. The economy of nature and the evolution of sex. Berkeley, CA: *University of California Press*.

Havel J., Wilson C. y Hebert N., 1989. Parental Investment and Sex Allocation in a Viviparous Onychophoran. *Oikos*, **56**: 224-232.

Hebert P., Billington N., Finston T., Boileau M., Beaton M. y Barrette R., 1991. Genetic variation in the onychophoran *Plicatoperipatus jamaicensis*. *Heredity*, **67**: 221-229.

Jamieson B., 1986. Onychophoran-euclitellate relationships: evidence from spermatozoal ultrastructure. *Zoologica Scripta*, **15**: 141-155.

Kemp S., 1914. Onychophora. In: Zoological results of the Abor Expedition 1911-1912. *Records of the Indian Museum*, **8**: 473-492.

Lavallard R. y Campliglia S., 1975. Contribution to the biology of *Peripatus acacioi* Marcus and marcus (Onychophora). V. Studies of the breeding in a laboratory culture. *Zoologischer Anzeiger*, **195**: 338-50.

Leishman M. y Eldredge M., 1990. Life history characteristics of two sympatric onychophoran species from the Blue mountains, New South Wales. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales*, **112**: 173-185.

Luna L., 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of the Pathology, 3rd ed. New York: McGrawHill. P 258.

Manton S., 1946. A zoological curiosity – *Peripatus*. Illustrated Lond. News, September **28**: 354.

Marotta R. y Ruhberg H., 2004. Sperm ultrastructure of an oviparous and ovoviviparous onychophoran species (Peripatopsidae) with some phylogenetic considerations. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, **42**: 313-322.

Mayer G., 2007. *Metaperipatus inae* sp. nov. (Onychophora: Peripatopsidae) from Chile with a novel ovarian type and derma insemination. *Zootaxa*, **1440**: 21-37.

Mayer G. y Tait N., 2009. Position and development of oocytes in velvet worms shed light on the evolution of the ovary in Onychophora and Arthropoda. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **157**: 17-33.

Monge-Nájera J., 1995. Phylogeny, biogeography and reproductive trends in the Onychophora. *Zoological Journal of Linnean Society*, **114**: 21-60.

Oliveira S., Read J., Mayer G., 2012. A world checklist of Onychophora (velvet worms), with notes on nomenclature and status of names. *ZooKeys*, **211**: 1-70.

Pflugfelder O., 1968. Onychophora. – Grobes Zoologisches Praktikum. Stuttgart: G. Fisher, Heft 13a.

Purschke G. y Fursman M. C., 2005. Spermatogenesis and spermatozoa in *Stygocapitella subterranean* (Annelida, Parergodrilidae), an enigmatic supralittoral polychaete. *Zoomorphology*, **124**: 137-148.

Radashevsky V., Yurchenko O., Tyurin S., Alexandrova N., 2015. Spermatogenesis and spermatozoa ultrastructure of two *Dipolydora* species (Annelida: Spionidae) from the sea of Japan. *The International Research and Review Journal for Microscopy*, **69**: 43-55.

Read V., 1988. The Onychophora of Trinidad, Tobago and Lesser Antilles. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **93**: 225-227.

Reid A., 1996. Review of the Peripatopsidae (Onychophora) in Australia, with comments on Peripatopsid relationships. *Invertebrate Taxonomy*, **10**: 663-936.

Roosen-Runge E., 1977. The process of spermatogenesis in animals (Vol. 5). CUP Archive.

Rucker A., 1900. A description of the male of *Peripatuse isenii* Wheeler. *The Biological Bulletin*, **1**: 251-259.

Ruhberg H., y Storch V., 1976. Zur Ultrastruktur von männlichen Genitaltrakt, Spermioctogenese und spermien von *Peripatopsis moseleyi* (Onychophora). *Zoomorphologie*, **85**: 1-5.

Ruhberg H., 1985. Die Peripatopsidae (Onychophora). Systematik, Ökologie, Chorologie and phylogenetische Aspekte. *Zoologica*, **137**: 1-187

Sherbon B., y Walker M., 2004. A new species of *Peripatopsis* from South Africa, *P. stelliporata*, with observations on embryonic development and sperm degradation (Onychophora, Peripatopsidae). *Journal of Zoology*, **264**: 295-305.

Storch V. y Ruhberg H., 1977. Zur Entstehung der Spermatophore von *Opisthopatus cinctipes* Purcell, 1899 (Onychophora, Peripatopsidae). *Zoomorpologie*, **87**: 263-276.

Storch V. y Ruhberg H., 1983. "Onychophora", in *Reproductive Biology of Invertebrates*, Vol. II, *Spermatogenesis and Sperm Function* (Eds. K. G. Adiyodi y R. G. Adiyodi), John Wiley, Chicester, 397-405.

Storch V. y Ruhberg H., 1990. Electron microscopic observations on the male genital tract and sperm development in *Peripatus sedgwicki* (Peripatidae, Onychophora). *Invertebrate Reproduction and Development*, **17**: 47-56.

Storch V., y Ruhberg H., 1993. Onychophora. In F. Harrison (ed). *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, **12**: 11-56.

Storch V., Mummert R. y Ruhberg H., 1995. Electron microscopic observations on the male genital tract, sperm development, spermatophore formation, and capacitation in *Epiperipatus biolleyi* (BOUVIER) (Periparidae, Onychophora). *Mitteilungen aus dem Hamburgischen Zoologischen und Institut*, **92**: 365-379.

Storch V., Ruhberg H., Alberti G. y Jamieson B., 2000. Onychophora. In Reproductive Biology of Invertebrates IX (Part B) Progress in Male Gamete Biology: 293–310. Adiyodi, K. G. y Adiyodi, R. G. (series Eds), Jamieson, B. G. M. (volume Ed.). New Delhi, Calcutta: Oxford & IBH.

Sunnucks P., Curach N., Young A., French J., Cameron R., Briscoe D. y Tait N., 2000. Reproductive biology of the onychophoran *Euperipatoides rowelli*. *Journal of Zoology*, 250: 447-460.

Tait N. y Briscoe D., 1990. Sexual head structures in the Onychophora: unique modifications for sperm transfer. *Journal of Natural History*, **24**: 1517-1527

Tait N. y Norman M., 2001. Novel mating behaviour in *Florelliceps stutchburyae* gen. nov., sp. nov. (Onychophora: Peripatopsidae) from Australia. *Journal of Zoology*, **253**: 301-308.

Tutt K., Daugherty C. y Gibbs G., 2002. Differential life-history characteristics of male and female *Peripatoides novaezealandiae* (Onychophora: Peripatopsidae). *Journal of Zoology*, **258**: 257-267.

Walker R. y Campiglia S., 1975. Contribution á la biologie de *Peripatus acacioi* Marcus y Marcus (Onychophore). V. Étude des naissances dans un élevage de laboratoire. *Zoologischer Anzeiger.*, **195**: 338-350.

Walker M. y Campiglia S., 1998. Seminal Receptacula in Gravid and Virgin Female *Peripatus (Macroperipatus) acacioi* Marcus and Marcus. *Journal of Morphology*, **237**: 127-136.

Walker M. y Tait N., 2004. Studies on embryonic development and the reproductive cycle in ovoviparous Australian Onychophora (Peripatopsidae). *Journal of Zoology*, **264**: 333–354.

Walker M., Roberts E., Roberts T., Spitteri G., Streubig M., Hartland J. y Tait N., 2006. Observations on the structure and function of the seminal receptacles and associated accessory pouches in ovoviparous Onychophorans from Australia (Peripatopsidae; Onychophora). *Journal of Zoology*, **270**: 531–542.

Willey A., 1898. The anatomy and Development of *Peripatus novae-britanniae*. *Zoological Research*, **1**: 1-52.