

## IMPORTANCIA DE LA GENITALIA EN LA DELIMITACIÓN DE ESPECIES DE LA SUBFAMILIA PHANEROPTERINAE (ORTHOPTERA: TETTIGONIIDAE)

Aurora Y. Rocha-Sánchez<sup>1</sup>, Ludivina Barrientos-Lozano<sup>1</sup>✉, Alejandro Zaldívar-Riverón<sup>2</sup> y Pedro Almaguer-Sierra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Cd. Victoria. División de Estudios de Posgrado e Investigación. Blvd. Emilio Portes Gil No. 1301. Ciudad Victoria, Tamaulipas. México. C. P. 87010.

<sup>2</sup>Colección Nacional de Insectos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 3er. Circuito exterior s/n Cd. Universitaria, Copilco, Coyoacán, A. P. 70-233, C. P. 04510, Cd. de México.

✉ Autor de correspondencia: [ludivinab@yahoo.com](mailto:ludivinab@yahoo.com)

**RESUMEN.** En insectos, la determinación y delimitación de especies se lleva a cabo en primera instancia, usando caracteres morfológicos y otros caracteres fenotípicos como color y tamaño. En Phaneropterinae (Tettigoniidae), hay cierto grado de complejidad para delimitar taxa basándonos solamente en caracteres morfológicos y fenotípicos. Esto debido a la presencia de especies crípticas, morfológicamente muy similares, que incluso comparten nicho ecológico. Por lo que, actualmente se recurre a caracteres de la genitalia de machos y hembras. La especificidad de la genitalia de los machos ha sido bien documentada en muchos grupos de insectos. Más aún, se ha demostrado que tales caracteres están sujetos a intensa presión de selección sexual y evolucionan más rápidamente que otros caracteres morfológicos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la subfamilia Phaneropterinae utilizando caracteres de la genitalia de machos y hembras. Esto permitió la delimitación de taxa, y la incorporación de datos taxonómicos adicionales a bancos de información e inventarios nacionales sobre biodiversidad. Se muestran dos estudios de caso donde la genitalia representa los caracteres de diagnóstico principales para delimitar especies crípticas.

**Palabras clave:** Phaneropterinae, especies crípticas, genitalia, titillators.

### Importance of genitalia in Phaneropterinae (Orthoptera: Tettigoniidae) species delimitation

**ABSTRACT.** In insects, determination and delimitation of species is carried out primarily, using morphological and other phenotypic characters such as color and size. However, in Phaneropterinae (Tettigoniidae), there exists some degree of complexity to delimit taxa based solely on morphological and phenotypic characters. This is because of cryptic species morphologically very similar, which sometimes even share ecological niche. Therefore, characters of male and female genitalia are used increasingly. The specificity of male genitalia has been well documented in many groups of insects. Moreover, it has been shown that such characters are subject to intense sexual selection pressure and evolve faster than other morphological characters. This work aimed to study the subfamily Phaneropterinae using male and female genitalic structures. This allowed not only delimitation of species, but also incorporating new taxonomic data in information banks and national inventories on biodiversity. Two case studies where genitalia provides major diagnostic characters to delimit cryptic species are presented.

**Keywords:** Phaneropterinae, cryptic species, genitalia, titillators.

## INTRODUCCIÓN

En insectos y otros grupos de animales, la genitalia está representada por estructuras morfológicas sujetas a intensa selección sexual, por lo que divergen más rápidamente que otros caracteres morfológicos. Entre los mecanismos de selección que explican la rápida evolución divergente de las estructuras genitales, se ha propuesto: a) elección críptica por la hembra (ECH), ésta ocurre después de iniciada la cópula, propone que la genitalia del macho es un órgano de cortejo que estimula a la hembra internamente durante la cópula, la hembra elige cual macho y cual no fertilizará sus huevos, lo que le confiere beneficios como crías superiores; b) conflicto sexual entre macho y hembra por el control reproductivo (cópula y fertilización de huevos), lo que resulta

en Coevolución Sexual Antagonista (CSA), es decir una carrera de armamento evolutivo entre caracteres de la hembra y el macho que afectan la cópula y la fertilización; c) hipótesis de “llave” y “candado” en la que la morfología especie-específica de la genitalia del macho (llave) y la hembra (candado), representa una barrera de aislamiento reproductivo precigótico (Alexander y Otte, 1967; Alexander *et al.*, 1997; Eberhard, 1985, 2004, 2010a, 2010b; Simmons 2014; Debelle *et al.*, 2014; Wulff *et al.*, 2015a, 2015b). Chamorro-Rengifo y Lopes-Andrade (2014) revisaron el uso de genitalia (complejo fálico) como carácter importante para delimitar especies de Tettigoniidae (Ensifera). Señalan la falta de descripciones adecuadas del complejo fálico como una laguna en la sistemática del grupo; además el limitado número de trabajos de estas estructuras, obstaculiza el entendimiento sobre evolución de la cópula. La subfamilia Phaneropterinae (Tettigoniidae) es una de las que posee mayor abundancia y diversidad en nuestro país, reportándose más de 163 especies (Barrientos *et al.*, 2013). La delimitación de especies en Phaneropterinae, en primera instancia, se realiza mediante el uso de caracteres morfológicos, en su mayoría no genitálicos. Sin embargo, existe cierto grado de complejidad en la delimitación de especies, basándonos solamente en caracteres morfológicos y fenotípicos. Esto debido a la presencia de especies crípticas morfológicamente similares, las cuales en ocasiones comparten incluso nicho ecológico. El uso de caracteres de la genitalia de machos y hembras, permite establecer la variación poblacional, facilitando la delimitación de taxa, incluso a nivel supra específica (Song, 2009; Song y Mariño-Pérez, 2013; Chamorro-Rengifo y Lopes-Andrade, 2014). Este trabajo tuvo como objetivo estudiar caracteres de la genitalia de machos y hembras, en adición a otros caracteres morfológicos, en la subfamilia Phaneropterinae. Esto permitió la delimitación de taxa y la incorporación de datos taxonómicos adicionales a bancos de información e inventarios nacionales sobre biodiversidad.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

El material examinado fue recolectado en el periodo 2009-2015 y está depositado en la colección de ortópteros del Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Cd. Victoria (TecNM-ITCV), a cargo de la Dra. Ludivina Barrientos Lozano. Los caracteres morfológicos no genitálicos considerados son: forma y tamaño del fastigio, forma de la cabeza, forma del vertex, tamaño y forma de los ojos, tamaño y forma del pronoto, tamaño y forma de las tegmina, patrón de venación en tegmina, aparato estridulatorio; en machos y hembras. En machos se consideraron los siguientes caracteres de la genitalia externa (algunos no forman parte necesariamente de la genitalia, pero son utilizados durante la cópula): tamaño y forma del plato subgenital, forma del margen posterior del plato subgenital, tamaño y forma de estilos del plato subgenital, tamaño y forma del plato supranal, proyecciones del plato supranal, tamaño y forma del epiprocto, tamaño y forma de los cercos; genitalia interna: forma y tamaño de los titillators, presencia de espinas, proyecciones o algún otro armamento. En hembras: tamaño y forma del ovipositor, forma del plato subgenital, esclerito basal, tamaño y forma del lóbulo del ovipositor, ovipositor, tamaño y forma de los cercos.

La disección de genitalia interna se realizó en material fresco y seco relajando previamente las muestras en agua caliente durante aproximadamente una hora. Enseguida el macho se colocó en una superficie de fijación, y el falo se extrajo usando pinzas finas y alfileres entomológicos con la punta doblada en ángulo recto, adecuados para este propósito. El complejo fálico se colocó durante aproximadamente 10 min en una solución de KOH al 10 %, lo que permitió limpiar y quitar las membranas y músculo. Posteriormente membrana y músculos que quedan adheridos a la estructura, fueron removidos completamente con alfileres entomológicos. La estructura se lavó con agua corriente y se tomaron fotografías a 40 X. Las estructuras fálicas fueron conservadas en una mezcla de alcohol, glicerina y ácido acético en las siguientes proporciones: 80 % alcohol etílico al 70 %, glicerina 15 % y ácido acético 5 %. Fotografías e ilustraciones de los caracteres se realizaron con

un microscopio estereoscópico marca MOTIC-SWZ-168<sup>®</sup>, equipado con cámara digital de 3 mp (Barrientos-Lozano y Rocha-Sánchez, 2013).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los caracteres de la genitalia o asociados a ésta, que resultaron de mayor utilidad para delimitar especies crípticas son, en machos: plato supranal, epiprocto, plato subgenital, cercos y titillators (genitalia interna). En hembras: plato subgenital, esclerito basal, lóbulo del ovipositor y en algunos casos el ovipositor. Se presentan dos casos en los que estructuras de la genitalia son los caracteres de diagnóstico más importantes para delimitar los taxa.

1) *Pterodichopetala tuliensis* Rocha-Sánchez y Barrientos-Lozano, 2015. Esta especie es morfológicamente muy similar a *P. cielo* Buzzetti *et al.*, 2010. Sin embargo, pueden separarse considerando, en machos forma y tamaño del plato supranal (psa), de los cercos (cco) y de los titillators. En hembras, la forma y tamaño del plato subgenital (psg), del esclerito basal (scb) y del lóbulo del ovipositor (lbo); (Figs. 1 y 2).

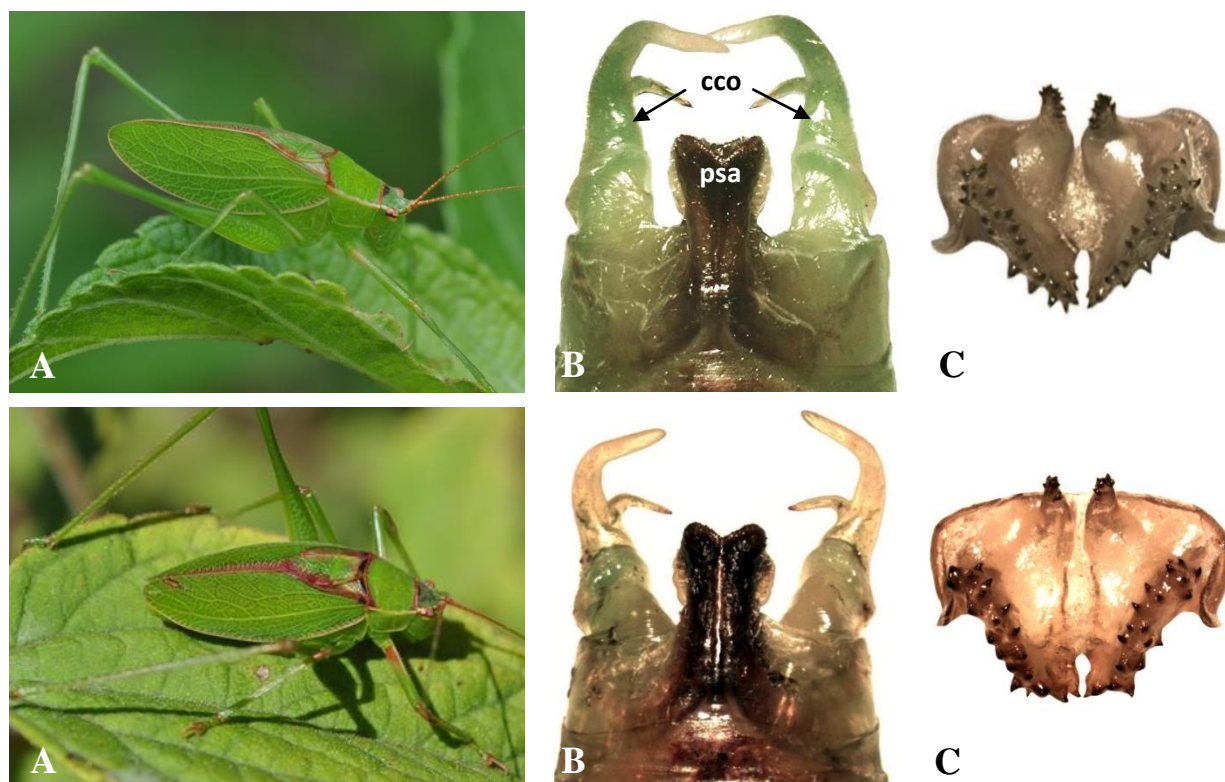


Figura 1. Macho. Arriba, *P. tuliensis*. Abajo *P. cielo*. A-A', habitus. B-B', cercos (cco) y plato supranal (psa)-vista dorsal. C-C', titillators-genitalia interna-vista dorsal.

Los cercos de *P. tuliensis* y *P. cielo* (Fig. 1, B-B'), son estructuras complejas que varían inter-específicamente y sirven para asir a la hembra durante la cópula, lo que permite asegurar o prolongar el apareamiento. Wulff *et al.* (2015a, 2015b) indican que la diferencia inter-específica en la morfología de los cercos de los machos, e incompatibilidad mecánica refuerzan el aislamiento reproductivo entre especies estrechamente relacionadas. Los titillators (Fig. 1, C-C'), están representados por una estructura esclerotizada, formada por dos procesos simétricos que portan un

penacho de espinas en la parte proximal de cada proceso y dos hileras de espinas en el área lateral externa.

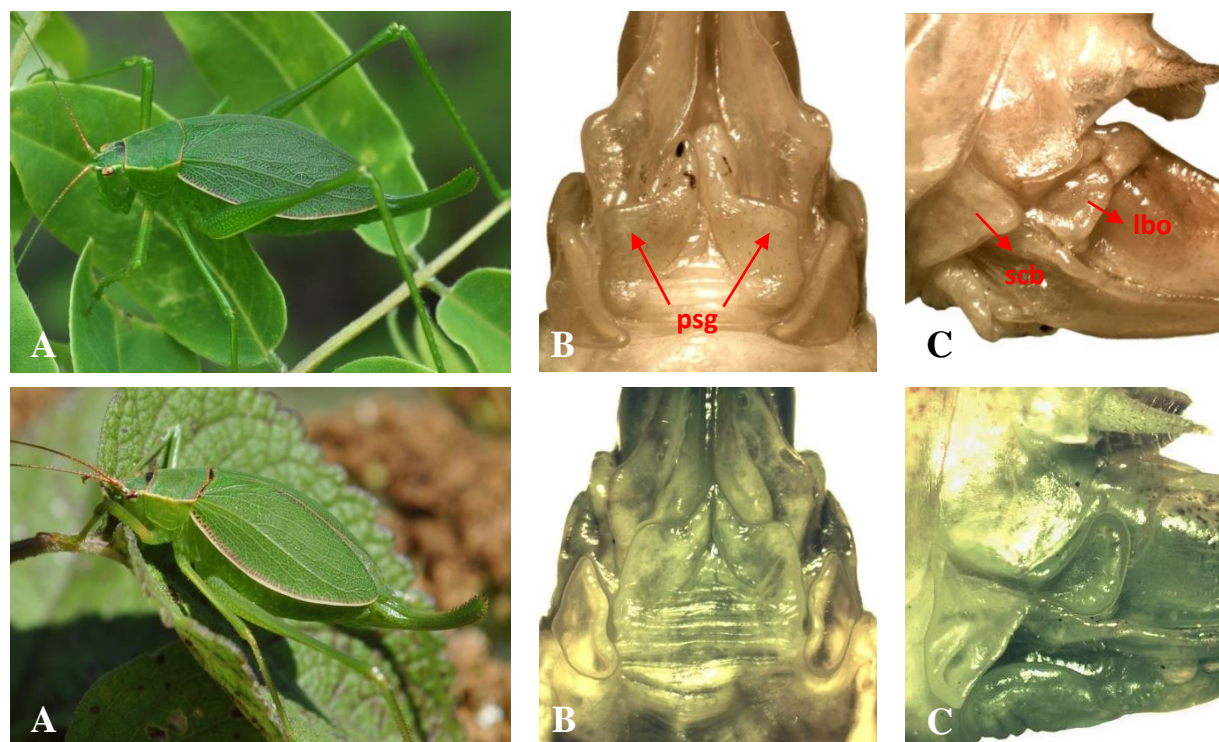


Figura 2. Hembra. Arriba, *P. tuliensis*. Abajo, *P. cieloï*. A-A', habitus. B-B', plato subgenital (psg)-vista ventral. C-C', esclerito basal (scb) y lóbulo del ovipositor (lbo)-vista lateral.

La morfología de los titillators varía entre *P. tuliensis* y *P. cieloï*, y entre otras especies congénicas, así como la disposición, número y tamaño de las espinas. Se sabe poco sobre la estructura y función de los titillators, ya que durante la cópula están insertados en la cámara genital de la hembra y no pueden observarse. Eberhard (2010b) y Wulff *et al.* (2015a, 2015b) proponen que los titillators son un dispositivo de cortejo que estimula internamente a la hembra durante la cópula, conduciendo a la selección sexual mediante la elección críptica de la hembra. Estudios recientes (Wulff *et al.*, 2015a, 2015b) muestran además, que los titillators tienen una función importante en la transferencia del espermatóforo y evitan el rechazo de la hembra durante la cópula. En hembras de *P. tuliensis* y *P. cieloï*, la forma del plato subgenital (psg), del esclerito basal y del lóbulo del ovipositor (lbo) son especie-específicos (Fig. 2). Sin embargo, se desconoce en detalle la función de estas estructuras durante la cópula. Estudios recientes (Wulff *et al.*, 2015a) indican que las hembras carecen de una estructura interna esclerotizada, homóloga a los titillators en los machos y enfatizan la necesidad de profundizar en el conocimiento y evolución de la genitalia de la hembra (Simmons, 2014; Wulff *et al.*, 2015a, 2015b).

**2) Otro caso en el que la genitalia proporciona caracteres de diagnóstico para delimitar taxa congénicos es el género *Obolopteryx*.** En la figura 3 y 4 se muestra a *Obolopteryx truncoangulata* Barrientos-Lozano y Rocha-Sánchez, 2015 vs. *O. brevihastata*. En machos, variación inter-específica se puede observar en cercos, plato subgenital, epiprocto y titillators. En hembras, en plato subgenital, esclerito basal y lóbulo del ovipositor.

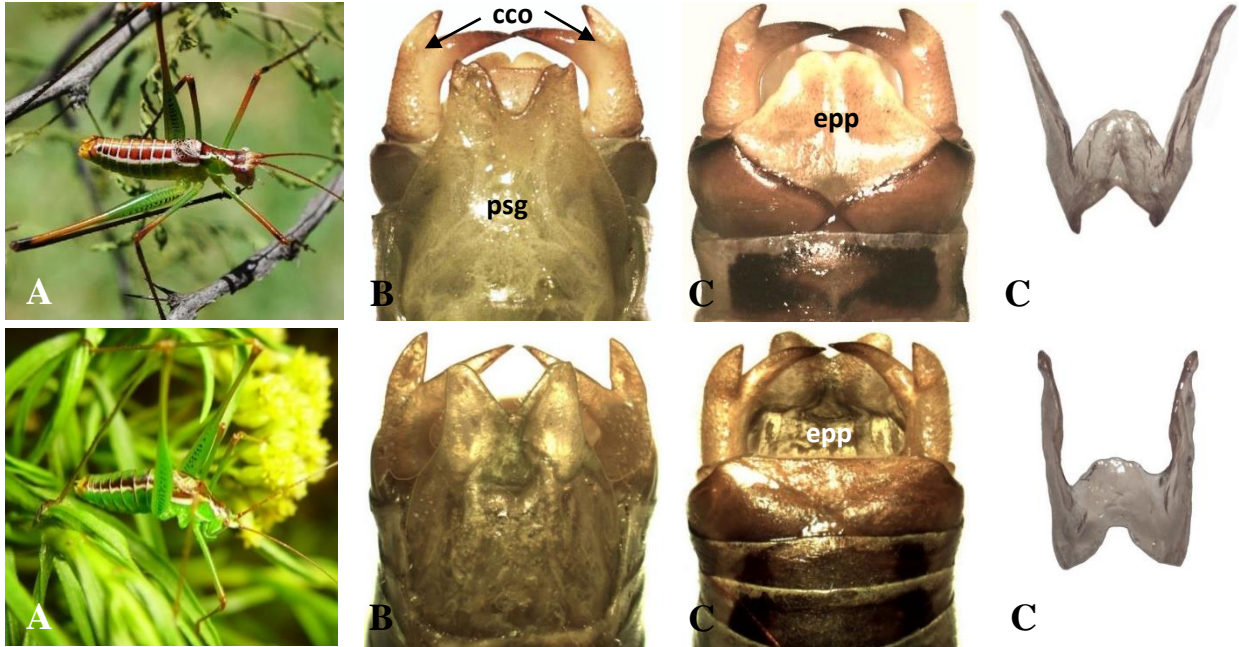


Figura 3. Macho. Arriba, *O. truncoangulata*. Abajo, *O. brevihastata*. A-A', habitus. B-B', cercos (cco) y plato subgenital (psg)-vista ventral. C-C', epiprocto (epp) y cercos-vista dorsal. D-D', *titillators*-genitalia interna.

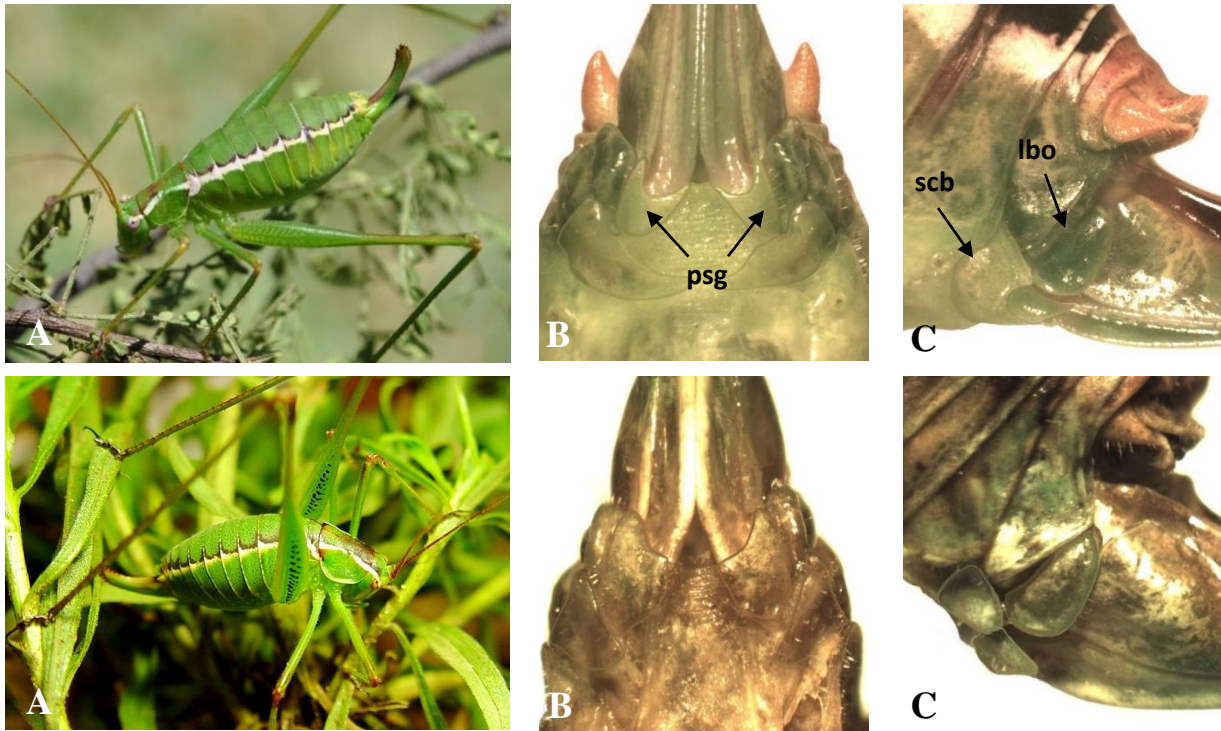


Figura 4. Hembra. Arriba, *O. truncoangulata*. Abajo, *O. brevihastata*. A-A', habitus. B-B', plato subgenital (psg)-vista ventral. C-C', lóbulo del ovipositor (lbo) y esclerito basal (scb)-vista lateral.

En el presente trabajo se muestra la variación interespecífica, en hembras y machos, de caracteres de la genitalia externa, o relacionados a ésta durante la cópula, y *titillators* (genitalia interna) en los machos. Aunque en el caso de la genitalia interna, no se estudiaron todas las estructuras que integran el complejo fálico, se sabe que en tetigónidos las estructuras del complejo

fálico varían a nivel específico, genérico y supra genérico (Chamorro-Rengifo y Lopes-Andrade, 2014).

## CONCLUSIÓN

Para muchas especies de la subfamilia Phaneropterinae no se dispone de información sobre la genitalia, ya que muchos taxa fueron descritos a principios del siglo XX. Por lo que la mayoría de los géneros deben revisarse, considerando estas estructuras y técnicas adicionales como comportamiento acústico y estudios a nivel molecular. Caracteres morfológicos asociados a la genitalia externa (cercos, plato subgenital, plato supranal, epiprocto) y la genitalia interna (titillators) aportan caracteres de diagnóstico para separar especies crípticas. Información sobre la genitalia interna complementa descripciones taxonómicas y fortalece la sistemática del grupo. Permite además, profundizar en el conocimiento de su estructura y función y los mecanismos que actúan en la rápida divergencia y evolución de las mismas. Así como en el entendimiento y función de ésta durante la cópula. También es relevante el conocimiento de la genitalia interna y estructuras especie-específicas asociadas a la genitalia externa (plato subgenital, esclerito basal, lóbulo del ovipositor, entre otras) de la hembra. Esto permitirá comprender su estructura, función y evolución en relación a la genitalia de los machos.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para realizar el proyecto: Sistemática y Biogeografía de los Phaneropterinae Mexicanos (Orthoptera: Tettigoniidae). Clave: CB-2013/0219979. Así como el apoyo proporcionado a la C. Aurora Y. Rocha Sánchez para llevar a cabo estudios de Doctorado.

## Literatura Citada

- Alexander, R. D. and D. Otte. 1967. The Evolution of Genitalia and Mating Behavior in Crickets (Gryllidae) and other Orthoptera. *Miscellaneous Publications Museum of Zoology, University of Michigan*, 133: 5–45.
- Alexander, R. D., Marshall, D.C. and J. R. Cooley. 1997. Evolutionary perspectives on insect mating. Pp. 4–31. *In: Choe, J. C. and B. J. Crespi (Eds.). The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids.* Cambridge University Press. Cambridge, U. K. 378 p.
- Barrientos-Lozano, L., Rocha-Sánchez, A. Y., Buzzetti, F. M., Méndez-Gómez, B. R. y J. V. Horta-Vega. 2013. *Saltamontes y Esperanzas del Noreste de México. Guía Ilustrada.* Editorial Porrúa, México. 385 p.
- Barrientos-Lozano, L. and A. Y. Rocha-Sánchez. 2013. A new species of the genus *Pterodichopetala* (Orthoptera: Tettigoniidae: Phaneropterinae) from northeastern Mexico. *Journal of Orthoptera Research*, 22: 3–13.
- Chamorro-Rengifo, J. and C. Lopes-Andrade. 2014. The phallus in Tettigoniidae (Insecta: Orthoptera: Ensifera): revision of morphology and terminology, and discussion on its taxonomic importance and evolution. *Zootaxa*, 3815: 151–199.
- Debelle, A., Ritchie, M. G. and R. R. Snook. 2014. Evolution of divergent female mating preference in response to experimental sexual selection. *Evolution*, 68(9): 2524–2533.
- Eberhard, W. G., 1985. *Sexual Selection and Animal Genitalia.* Harvard Univ. Press, Cambridge. 244 p.
- Eberhard, W. G. 2004. Rapid divergent evolution of sexual morphology: comparative tests of antagonistic coevolution and traditional female choice. *Evolution*, 58(9): 1947–1970.
- Eberhard W. G. 2010a. Cryptic Female Choice. Pp. 430–434. *In: Breed, M. D. and J. Moore (Eds.). Encyclopedia of Animal Behavior, Vol. 1, Oxford: Academic Press.*
- Eberhard, W. G. 2010b. Evolution of genitalia: theories, evidence, and new directions. *Genetica*, 138: 5–18.
- Simmons, L. W. 2014. Sexual selection and genital evolution. *Austral Entomology*, 53: 1–17.

- Song, H. 2009. Species-specificity of male genitalia is characterized by shape, size, and complexity. *Insect Systematics & Evolution*, 40: 159–170.
- Song, H. and R. Mariño-Pérez. 2013. Re-evaluation of taxonomic utility of male phallic complex in higher-level classification of Acridomorpha (Orthoptera: Caelifera). *Insect Systematics & Evolution*, 44: 241–260.
- Wulff, N.C., Lehmann, A. W., Hipsley, C. A. and G. U. C. Lehmann. 2015a. Copulatory courtship by bushcricket genital titillators revealed by functional morphology, mCT scanning for 3D reconstruction and female sense structures. *Arthropod Structure & Development*, 44: 388–397.
- Wulff, N. C. and G. U. C. Lehmann. 2015b. Function of male genital titillators in mating and spermatophore transfer in the tettigoniid bushcricket *Metrioptera roeselii*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2015: 1–11.