

GENITALIA INTERNA DE CUATRO ESPECIES DEL GÉNERO *Conocephalus* Thunberg, 1815 (ORTHOPTERA: TETTIGONIIDAE)

Lizeth Berenice Cedillo-Salinas, Ludivina Barrientos-Lozano✉, Aurora Y. Rocha-Sánchez, Pedro Almaguer-Sierra y Alfonso Correa-Sandoval

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

✉Autor de correspondencia: ludivinab@yahoo.com

RESUMEN. En Orthoptera la delimitación de especies se basa en primera instancia en caracteres morfológicos. Sin embargo, la presencia de especies crípticas dificulta frecuentemente la correcta determinación. Otras técnicas de utilidad para delimitar los taxa en este grupo son el comportamiento acústico y la genitalia interna de los machos. Esta última es de gran valor taxonómico ya que generalmente es especie-específica, y por estar involucrada en el proceso de apareamiento (cópula) es un conjunto de caracteres que a menudo diverge más rápidamente que otros caracteres morfológicos. Esto se atribuye a que los caracteres de la genitalia, externos e internos, están sujetos a una intensa presión de selección sexual. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la genitalia del género *Conocephalus* Thunberg y utilizar estos caracteres para delimitar los taxa. Se realizaron disecciones y se extrajo la genitalia interna de los machos, para comparar su estructura y morfología entre especies. Se muestra la variación inter-específica para cuatro taxa: *Conocephalus (A.) ictus*, *C. (A.) magdalenae*, *C. (A.) cinereus* y *C. (A.) strictus*; se enfatiza la utilidad de este carácter para separar especies en el género *Conocephalus* y se presentan las características de esta estructura para cada uno de cuatro taxones estudiados.

Palabras clave: Orthoptera: Conocephalinae, especies crípticas, caracteres morfológicos.

Internal genitalia of four species of genera *Conocephalus* Thunberg, 1815 (Orthoptera: Tettigoniidae)

ABSTRACT. In Orthoptera, the delimitation of species is based primarily on morphological characters. However, the presence of cryptic species often makes correct determination difficult. Other useful techniques to delimit species in this group are the acoustic signals and the internal genitalia of males. The latter technique is of great taxonomic value, since genitalia is generally species-specific, and because it is involved in the mating process it is a set of characters that often diverges more rapidly than other morphological characters. This is attributed to the fact that genitalic characters, external and internal, are subject to an intense sexual selection pressure. This work aimed to study male genitalia of members of the genus *Conocephalus* Thunberg and to use this character in the delimitation of taxa. We performed dissections to extract males' internal genitalia and compare its structure and morphology between taxa. Interspecific differences are documented in four species: *Conocephalus (A.) ictus*, *C. (A.) magdalenae*, *C. (A.) cinereus*, and *C. (A.) strictus*. The usefulness of this character and its components to separate taxa in the genus *Conocephalus* is emphasized and internal genitalia features of the four taxa studied are presented herein.

Key words: Orthoptera: Conocephalinae, cryptic species, morphological characters.

INTRODUCCIÓN

El género *Conocephalus* Thunberg, 1815 está representado por 151 especies aproximadamente, distribuidas mundialmente (Cigliano *et al.*, 2019). De éstas, en México se presentan máximo 15 especies (Cedillo-Salinas, 2018). Para la delimitación de especies en Orthoptera (Ensifera: Tettigoniidae), en primera instancia se utilizan caracteres morfológicos (Naskrecki, 2000; Rocha-Sánchez *et al.*, 2016; Walker, 2019). En el género *Conocephalus*, entre los caracteres de diagnóstico con más valor taxonómico están los siguientes: forma y tamaño tanto del fastigio del vertex y fastigio frontalis, así como la forma dorsal y lateral del pronoto. En machos el aparato estridulador, cercos vista dorsal, lateral y ventral, plato subgenital y estilos. En hembras el plato

subgenital, ovipositor y lóbulo del ovipositor (Naskrecki, 2000; Cedillo-Salinas *et al.*, 2017). Sin embargo, la delimitación de especies se dificulta frecuentemente debido a la presencia de especies crípticas morfológicamente similares y difíciles de separar con base en caracteres morfológicos tradicionales. En estas circunstancias, otros caracteres como la señal acústica o la genitalia de machos y hembras pueden ser de utilidad para diagnosticar los taxones (Walker *et al.*, 2003; Dutta *et al.*, 2017).

En Orthoptera (Ensifera: Tettigoniidae) y otros grupos de insectos, es generalmente aceptado que la genitalia es especie-específica, y en especies estrechamente relacionadas el conjunto de caracteres que la integran divergen más rápidamente en comparación a otros caracteres morfológicos (Simmons y García-González, 2011; Wulff y Lehmann 2014; Van Haren *et al.*, 2017). Diversos trabajos han mostrado que la presión de selección sexual afecta la forma y a menudo la función de las estructuras genitales (Eberhard 2004, 2010; Simmons y García-González, 2011; Evans, 2013; Wulff y Lehmann 2014; Van Haren *et al.*, 2017). La rápida evolución de estas estructuras puede explicarse a través de dos procesos: a) las hembras pueden explotar los mecanismos de selección post-copulatorios para favorecer los rasgos genitales masculinos preferidos (elección críptica femenina = cryptic female choice; CFC); b) las hembras pueden desarrollar estructuras o comportamientos que mitiguen el costo directo impuesto por los genitalia masculina (conflicto sexual=sexual conflicto; CS). En ambos procesos los rasgos reproductivos de macho y hembra coevolucionan, ya sea a través del modelo clásico Fisheriano de coevolución de rasgos de preferencia (CFC) o mediante selección sexual antagonica (SC) (Evans, 2013).

En la familia Tettigoniidae los machos de ciertas especies poseen estructuras genitales internas esclerotizadas llamados titillators, los cuales durante la cópula entran en contacto íntimo con la genitalia femenina. Estos titillators son estructuras en pares, ocultas en el interior de la terminalia del macho. Sin embargo, la presencia de los titillators no es homogénea en la familia Tettigoniidae. Por ej., en las subfamilias Tettigoniinae y Bradyporinae, todas las especies poseen titillators; mientras que en la subfamilia Phaneropterinae, la mayoría de las especies carecen de esta estructura (Wulff y Lehmann, 2014). Chamorro-Rengifo y Lopes-Andrade (2014) revisaron la morfología del complejo fálico en Tettigoniidae, estableciendo éste como un carácter importante en la delimitación de especies, además señalan la falta de descripciones adecuadas del complejo fálico como una laguna en la sistemática del grupo; por otro lado, el limitado número de trabajos de estas estructuras, obstaculiza el entendimiento sobre evolución de la cópula. Rocha-Sánchez *et al.* (2016), muestran la importancia de la genitalia interna como carácter determinante para delimitar taxa en el grupo de géneros *Dichopetala* (Phaneropterinae). Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la genitalia interna en el género *Conocephalus* (Conocephalinae) y mostrar su utilidad en la delimitación de especies de este grupo.

MATERIALES Y MÉTODO

Ejemplares del género *Conocephalus* se recolectaron en el periodo 2010-2015, en el noreste de México, por Barrientos-Lozano y colaboradores (Cuadro 1).

El material revisado se encuentra depositado en la colección de ortópteros del Instituto Tecnológico de Cd. Victoria-Tecnológico Nacional de México (ITCV-TecNM). Para el presente trabajo se estudiaron cuatro especies: *Conocephalus (Anisoptera) ictus*, *C. (A.) magdalanae*, *C. (A.) cinereus* y *C. (A.) strictus*. Se revisaron 10 ejemplares de cada una de las cuatro especies en estudio, las cuales se determinaron mediante claves taxonómica y/o recursos en línea (Naskrecki, 2000; Walker, 2019; Cigliano *et al.*, 2019) y se extrajo la genitalia de al menos tres machos por especie.

Cuadro 1. Localidades de colecta de especies del género *Conocephalus* spp., estudiadas. Noreste de México.

Especie	N° de ejemplares	Localidad de colecta (Edo-Municipio)	Fecha de colecta	Coordenadas
<i>C. (A.) ictus</i>	10 machos	San Luis Potosí, Tamazunchale-Cd. Valles	28.11.2015	21°14'25.71''N 98°48'30.39''O
<i>C. (A.) magdalenae</i>	10 machos	Tamaulipas, Hidalgo	22.10.2015	24°14'41.66''N 99°26'15.11''O
<i>C. (A.) cinereus</i>	10 machos	Tamaulipas, Tampico	01.11.2010	22°17.029'N 97°53.716'O
<i>C. (A.) strictus</i>	10 machos	Carretera estatal 66, Cd. Mante-Cd. Valles	27.11.2015	22°20'43.22''N 99°02'03.98''O

La extracción se realizó siguiendo la metodología de Chamorro-Rengifo y Lopes-Andrade (2014), con pequeñas adaptaciones. Previo a la extracción, los ejemplares se colocaron en agua tibia (5-10 min) para ablandar la terminalia y facilitar su manejo, posteriormente se colocó una a dos gotas de amonía sobre la placa subgenital para facilitar la extracción, dejando reposar el ejemplar un minuto aproximadamente, para que la amonía relaje y suavice el tejido. Con la ayuda de un alfiler entomológico-doblando un poco en la punta- se procedió a realizar la extracción de la genitalia. Para ello se baja el plato subgenital y se introduce la punta del alfiler para su extracción. Una vez extraída la genitalia se le pone una a dos gotas de KOH y se deja reposar de 10-15 minutos o hasta que se haya removido la mayor parte del músculo. Pasado ese tiempo se enjuaga con agua para eliminar el exceso de KOH. Se deja secar y se le coloca una gota de Hematoxilina, la cual se deja actuar por un minuto para teñir la estructura.

La terminología utilizada en las diferentes estructuras de la genitalia interna es la proporcionada por Chamorro-Rengifo y Lopes-Andrade (2014). Los componentes de la genitalia interna que se utilizaron (Fig.1B) son: vesícula(s) eyaculadora(s) (EJV), titillators (TS) y apodemas (AP). Las fotografías se tomaron a 20X con un microscopio estereoscópico marca MOTIC-SWZ168[®] equipado con cámara digital de 10 mp.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La genitalia interna de los machos de cada una de las cuatro especies de *Conocephalus* consideradas en este estudio se presenta en las Figuras 1-4. Al igual que en otros Tettigoniidae la genitalia es simétrica y las estructuras que la integran se presentan por pares, vesículas eyaculadoras, titillators y apodemas (Fig. 1B) (Chamorro-Rengifo & Lopes-Andrade, 2014; Wulff & Lehmann, 2014; Rocha-Sánchez *et al.*, 2016;).

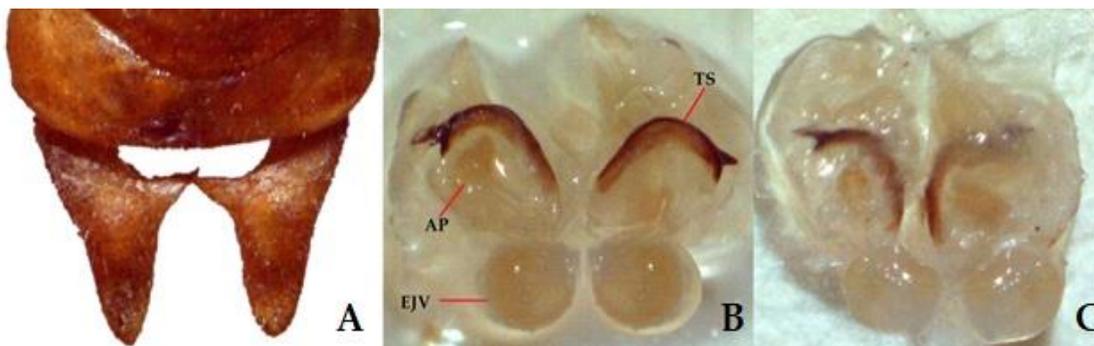


Figura 1. *Conocephalus (A.) ictus*. A, cercos del macho vista dorsal. B, genitalia interna y principales componentes, vista dorsal; C, genitalia interna vista ventral. **EJV:** vesículas eyaculadoras; **AP:** apodemas; **TS:** titillators.

Las vesículas eyaculadoras están representadas por un par de estructuras membranosas ovaladas o semi-redondas; mientras que los apodemas y los titillators son esclerotizados. Los titillators varían tanto en tamaño (largo y ancho) como en color (café claro a café oscuro, de acuerdo al grado de esclerotización) y se bifurcan distalmente; el tamaño del titillator y la asimetría de las espinas que se proyectan después de la bifurcación varían considerablemente, entre especies. De igual manera varían los apodemas en forma y tamaño entre especies.

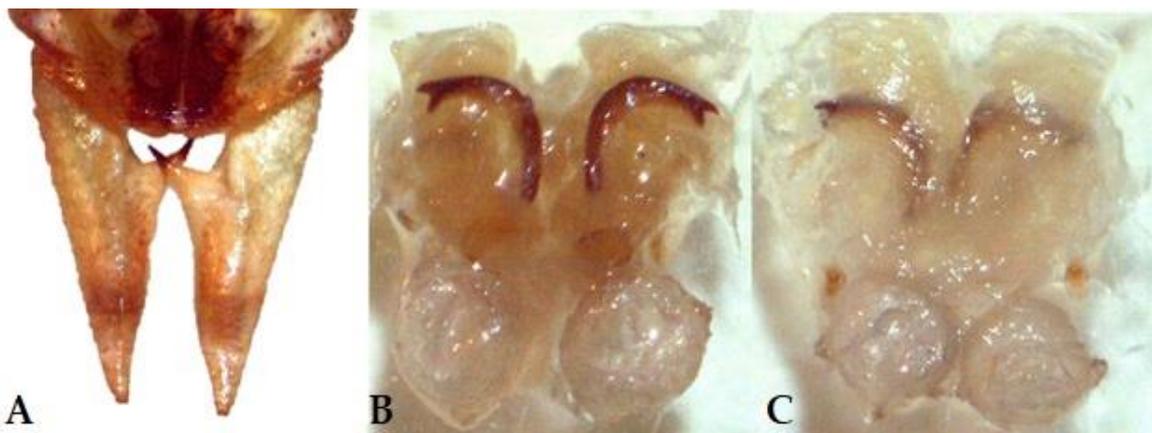


Figura 2. *Conocephalus (A.) magdalenae*. A, cercos del macho vista dorsal. B, genitalia interna vista dorsal. C, genitalia interna vista ventral.



Figura 3. *Conocephalus (A.) cinereus*. A, cercos del macho vista dorsal. B, genitalia interna vista dorsal. C, genitalia interna vista ventral.

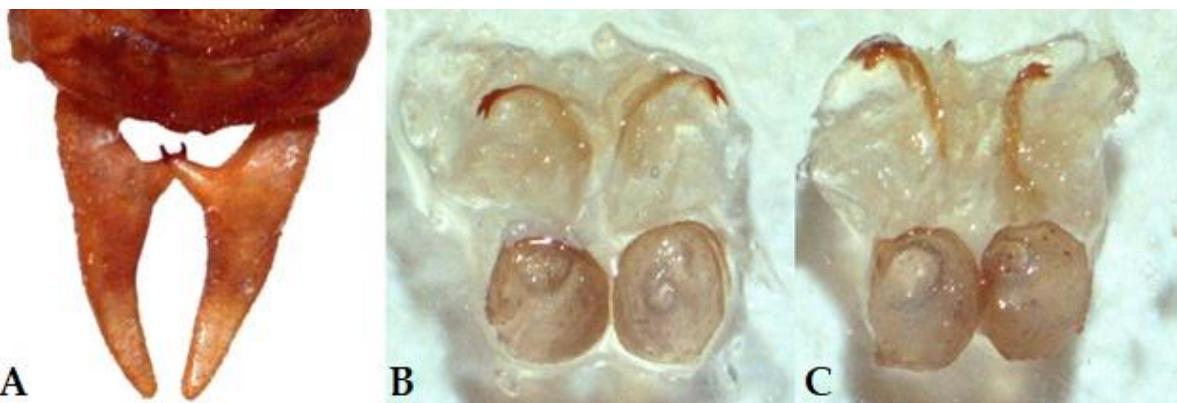


Figura 4. *Conocephalus (A.) strictus*. A, cercos del macho vista dorsal. B, genitalia interna vista dorsal. C, genitalia interna vista ventral.

La morfología y la variación que muestran las genitalias y sus componentes son adecuadas para separar los taxones del género *Conocephalus*. En el caso de *C. (A.) ictus* y *C. (A.) magdalenae* (Figs. 1, 2) los titillators son más robustos en comparación con *C. (A.) cinereus* y *C. (A.) strictus* (Figs. 3, 4); mientras que en *C. (A.) cinereus* los titillators son los más esclerotizados (Fig. 3) y en *C. (A.) strictus* (Fig. 4) se observan menos esclerotizados, ambos en referencia a las otras tres especies. Aunque en diversos trabajos sobre el género *Conocephalus*, se abordan las especies que aquí se presentan (Naskrecki, 2000; Cedillo-Salinas *et al.*, 2018; Walker, 2019), la genitalia interna ha sido poco estudiada y generalmente no se presenta en las descripciones originales de los taxones en estudio. Poco se sabe sobre la función de la genitalia interna y sus componentes, ya que por ser estructuras alojadas en el interior de la terminalia de los machos han sido poco estudiadas. Sin embargo, trabajos recientes indican que en otros Tettigoniidae, *i.e.*, *Metrioptera roeselii* (Hagenbach, 1822), tienen como función estimular a la hembra durante la cópula y transferir de forma correcta el espermatóforo a la hembra (Wulff y Lehmann, 2014, 2016). Estudios adicionales sobre miembros del género *Conocephalus* y otros grupos de Tettigoniidae son necesarios para fortalecer el conocimiento sobre estas estructuras internas, su valor taxonómico y su función durante la cópula y los procesos evolutivos de divergencia y especiación. La variación intra-específica que se observó en cada una de las especies estudiadas es menor; por otra parte, es importante mencionar que estos caracteres son de gran utilidad en aquellas especies que presentan estructuras morfológicas muy similares, *i.e.*, cercos.

CONCLUSIONES

Se muestra la estructura de la genitalia interna en cuatro especies del género *Conocephalus*; esta estructura y sus componentes son de utilidad para delimitar los taxa a nivel de especie. Hay poca información sobre la estructura de la genitalia interna en miembros del género *Conocephalus*, ya que son estructuras poco estudiadas por encontrarse en el interior del cuerpo del insecto. Se desconoce la función de esta estructura durante la cópula. Se considera importante ampliar este tipo de estudios en este y otros Ensifera, para fortalecer la sistemática de los ortópteros mexicanos.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico de Cd. Victoria-TecNM por el apoyo para llevar a cabo actividades de muestreo y recolecta de ejemplares en campo. Al 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 Lizeth Berenice Cedillo Salinas para llevar a cabo estudios de Doctorado (Beca No. 003351).

LITERATURA CITADA

- Cedillo-Salinas, L.B., Barrientos-Lozano, L., Rocha-Sánchez, A.Y., Almaguer-Sierra, P., Correa-Sandoval, A. 2017. Revisión de *Conocephalus* Thunberg (Orthoptera) depositados en la colección de ortópteros del Instituto Tecnológico de Cd. Victoria, Tamaulipas, México. *Entomología Mexicana*, No. 4: 738-743. ISSN: 2448-475X
- Cedillo-Salinas, L. B. 2018. Revisión del género *Conocephalus* Thunberg, 1815 (Orthoptera) en la colección del Instituto Tecnológico de Cd. Victoria-(TecNM-ITCV). Tesis de Maestría, sin publicar. 78 pp.
- Chamorro-Rengifo, J. y Lopes-Andrade, C. 2014. The phallus in Tettigoniidae (Insecta: Orthoptera: Ensifera): Revision of morphology and terminology, and discussion on its taxonomic importance and evolution. *Zootaxa*, 3815(2):151-199. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3815.2.1>

- Cigliano, M.M., Braun, H., Eades, D.C. & Otte, D. 2019. Orthoptera Species File. Version 5.0/5.0. <http://Orthoptera SpeciesFile>. [Fecha de acceso: 05/03/2019].
- Dutta, R., Tregenza, T., Balakrishnan, R. 2017. Reproductive isolation in the acoustically divergent groups of tettigoniid, *Mecopoda elongata*. *PLoS ONE*, 12(11): e0188843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188843>
- Eberhard, W.G. 2004. Rapid divergent evolution of sexual morphology: comparative tests of antagonistic coevolution and traditional female choice. *Evolution*, 58(9):1947-70. DOI: 10.1554/04-143.
- Eberhard, W. G. 2010. Evolution of genitalia: theories, evidence, and new directions. *Genetica*, 138: 5–18. DOI 10.1007/s10709-009-9358-y
- Evans, J., Van van Lieshout, E., Gasparini, C. 2013. Quantitative genetic insights into the co-evolutionary dynamics of male and female genitalia. *Proceedings of the Royal Society B*, 280: 20130749. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.0749>
- Naskrecki, P. 2000. *Katydids of Costa Rica. Volume 1. Systematics and bioacoustics of the coneheaded katydids (Orthoptera: Tettigoniidae: Conocephalinae sensu lato)*. Orthopterists Society. Philadelphia, Pennsylvania, USA. 164 pp.
- Rocha-Sánchez, A.Y., Barrientos-Lozano, L., Zaldívar-Riverón A., Almaguer-Sierra P. 2016. Importancia de la genitalia en la delimitación de especies de la subfamilia Phaneropterinae (Orthoptera: Tettigoniidae). *Entomología Mexicana*, Vol. 3. 943-949. ISSN: 2448-475X
- Simmons, L. W., Garcia-Gonzalez, F. 2011. Experimental coevolution of male and female genital morphology. *Nature Communications*, 2, 374. doi: 10.1038/ncomms1379
- Van Haren, M.M., Rönn, J.L., Schilthuizen, M., Arnqvist, G. 2017. Postmating sexual selection and the enigmatic jawed genitalia of *Callosobruchus subinnotatus*. *The Company of Biologists Ltd. Biology*, 6: 1008-1012. doi:10.1242/bio.025684
- Walker, T.J. 2019. Singing Insects of North America. Conocephalinae. <https://entnemdept.ifas.ufl.edu/walker/buzz/s220a.htm> [Fecha de acceso: 05/03/2019].
- Walker T.J., Forrest T.G. & Spooner J.D. 2003. The rotundifolia complex of the genus *Amblycorypha* (Orthoptera: Tettigoniidae): songs reveal new species. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 96 (4), 433-447. <http://entnemdept.ufl.edu/walker/buzz/s0011wf03.pdf> [Fecha de acceso: 05/03/2019].
- Wulff, N., Lehmann, G. 2014. Manipulation of internal genitalia in a bushcricket (Orthoptera: Ensifera: Tettigoniidae): anchors or stimulatory devices. *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie*, 19:169-172.
- Wulff, N., Lehmann, G. 2016. Function of male genital titillators in mating and spermatophore transfer in the tettigoniid bushcricket *Metrioptera roeselii*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 117: 206–216. doi: 10.1111/bij.12661