

# Sobre la preparación de escarabajos para su estudio científico

Antonio Machado

C/ Chopin 1, 38208 La Laguna, Tenerife, España.

[antonio.machado@telefonica.net](mailto:antonio.machado@telefonica.net)

## Introducción

Existen numerosas y excelentes obras que tratan de la preparación y estudio de los insectos (Colas 1947, Oldroyd 1970, Márquez Luna 2005, Upton & Mantle 2010, etc.). Sin embargo, como bien dice el refrán: “cada maestrillo tiene su librillo”. Por ello, tras haber ayudado a algunos jóvenes y no tan jóvenes a iniciarse en el estudio de los coleópteros, me ha parecido útil exponer aquí la forma en que yo los preparo, paso a paso, incluidos esos pequeños trucos que hacen el oficio más eficaz y amable. No hay pues otra intención ni objetivo que facilitar el trabajo a los entomólogos noveles, que tal vez pueden verse confundidos por las muchas opciones que ofrece la literatura especializada (ver bibliografía selecta al final). Lo que aquí se explica es el modo en que a mí me ha funcionado razonablemente bien al estudiar la fauna coleopterológica de la Macaronesia —especies con tallas entre 1 y 30 mm— sin perjuicio de que pueda haber iguales o mejores técnicas para el mismo cometido.

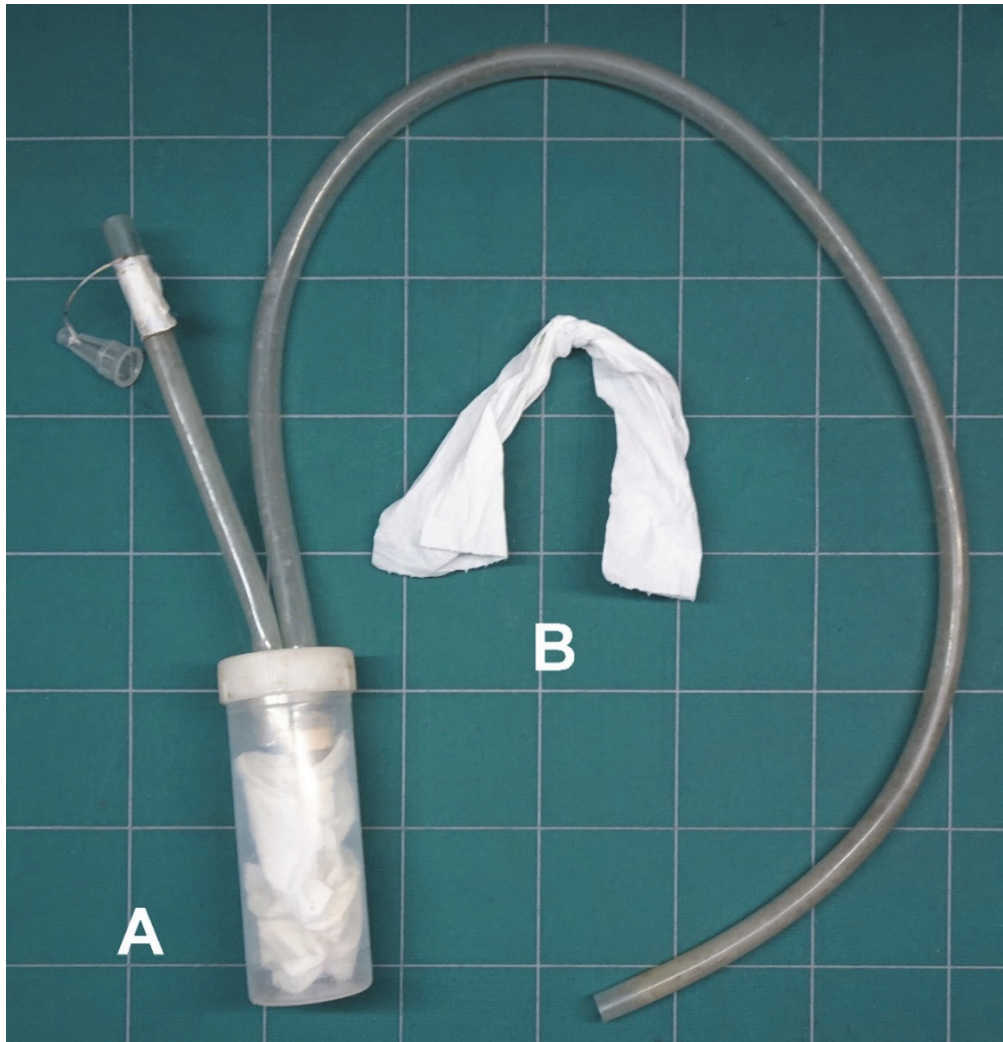
## Durante la colecta

Ya desde la recolección de especímenes hay aspectos a tener en cuenta para facilitar su posterior preparación. Hablo de coleópteros y sea donde quiera que se capturen y el método empleado (a mano, con batea, tamizando, etc.) siempre acaban en un recipiente cerrado. Yo uso habitualmente un aspirador de succión (Fig. 1) —“chupóptero” en jerga coloquial— construido con un bote cilíndrico de plástico semitransparente (140 ml). El tubo flexible usado para aspirar (el más largo) y el de succión (más corto) se fijan en la misma tapa<sup>1</sup>, de modo que se puede desenroscar y sustituir el bote con comodidad según cambiemos de localidad o hábitat. Al extremo externo del tubo de succión, cuya luz es de unos 8–10 mm, se le puede dotar de un tapón, para los momentos en que no se esté usando y prevenir que se escape algún ejemplar.

---

<sup>1</sup> En la tapa se perforan dos huecos con un sacabocados y se pasan los dos tubos plásticos flexibles. El extremo del de aspirar —idealmente de una luz algo mayor (8 mm)— se cubre con un pedazo de red de plancton (malla de 150–250 micras) fijándola con una anilla recortada de un tubo de diámetro inmediatamente superior o, en su defecto, con esparadrapo o cinta carrocera. El extremo del tubo de succión se deja libre, para que quede libre dentro del bote. Luego, se rellena la sección interior de la tapa con silicona de fundir, envolviendo la base de ambos tubos. Estas mangueras o tubos plásticos flexibles se pueden adquirir en las tiendas de acuariofilia, por ejemplo.

Los ejemplares capturados suelen agitarse en el bote y a menudo se muerden y mutilan entre ellos, sobre todo si las capturas son copiosas. Este serio problema se resuelve introduciendo dos hojas de papel higiénico enroscadas en espiral y plegadas al medio, de modo que los escarabajos se aferran a él o escabullen entre los pliegues y quedan tranquilos. Además, el papel higiénico<sup>2</sup> absorbe los vómitos o las excrecencias que expelen algunas especies, particularmente llegado el momento en que se les da muerte. Cuanto menos pringados lleguen los ejemplares al gabinete, tanto mejor.



**Fig. 1. A:** Aspirador entomológico de succión (con tapa). **B:** trozo de papel higiénico enroscado y plegado al medio. Cuadrícula del fondo 5×5 cm.

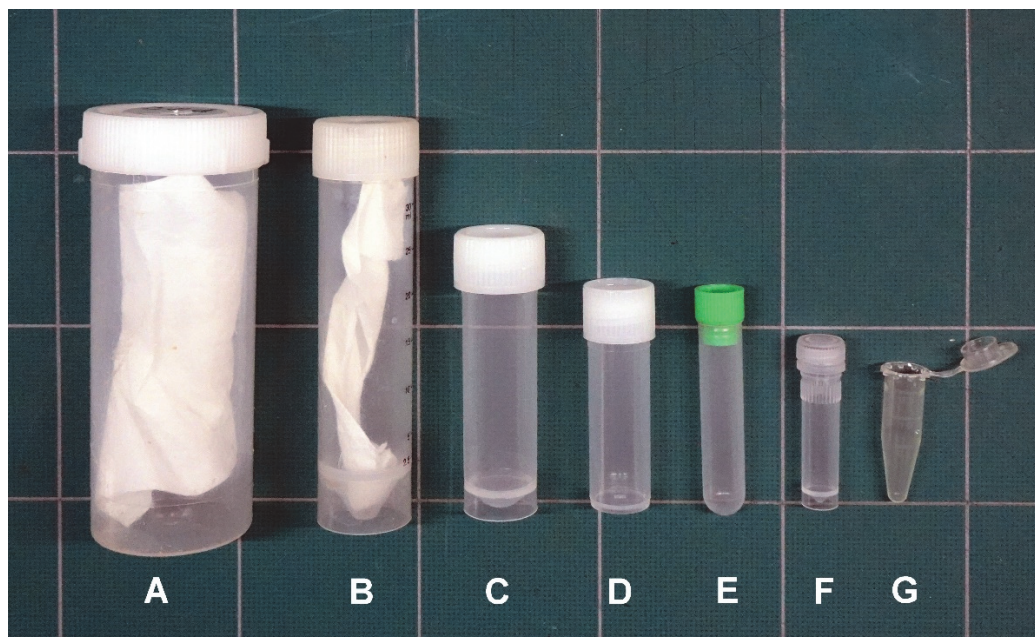
Si no se usa el “chupóptero” y se colecta a mano, los botes empleados —de 140 ml, por ejemplo, o de 35 ml (Fig. 2)— deben igualmente contener papel higiénico, pues una ventaja adicional de este método es que después de vaciar el bote y separar los bichos, el papel higiénico se tira junto con cualquier ejemplar que haya podido pasarse por alto. Cuando se emplea el clásico corcho molido u otro material reutilizable hay siempre algo de riesgo de trasladar ejemplares inadvertidos de una localidad a otra.

<sup>2</sup> Los papeles higiénicos de calidad son de fibra larga, no sueltan pelusa y tienen gran poder absorbente. Vienen preparados para rasgarse dejando hojas de aproximadamente 12×9,5 cm.

## Cuaderno de campo y etiquetas

La información sobre las localidades, hábitats y circunstancias de la colecta deben anotarse en un cuaderno de campo, no necesariamente *in situ*<sup>3</sup>, sino poco después y de manera ordenada.

Recomiendo conservar siempre este registro histórico (cuadernos sucesivos) al margen de que luego la información acabe volcada en la base de datos de la colección científica, cuando se registren las especies colectadas e identificadas. En todo bote de colecta debe introducirse una etiqueta con la localidad y fecha, o el eventual código de registro que se le asigne en el cuaderno de campo. Use lápiz o rotulador de tinta indeleble, y nunca fie la localidad a la memoria, aunque sea un simple bote con un único ejemplar. Si dispone de GPS, también han de registrarse las coordenadas geográficas de la localidad, o pueden añadirse posteriormente si uno se maneja bien con Google Earth.



**Fig. 2.** Botes de plástico: **A**= 140 ml, **B**= 35 ml, **C**= 20 ml, **D**= 10 ml, **E**= 4 ml, **F**= 2 ml y **G**= 1,5 ml (Eppendorf). Cuadrícula del fondo 5×5 cm.

## Muerte

Cuando no se vaya a dar otro destino a los ejemplares capturados —cría en vivo, fotografía, extracción de ADN— es conveniente darles muerte una vez finalizada la colecta. Para ello basta añadir tres o cuatro gotas de acetato de etilo ( $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ ) al papel higiénico que contiene el bote de captura. Esto se hace después de haber introducido la etiqueta con la localidad y fecha.

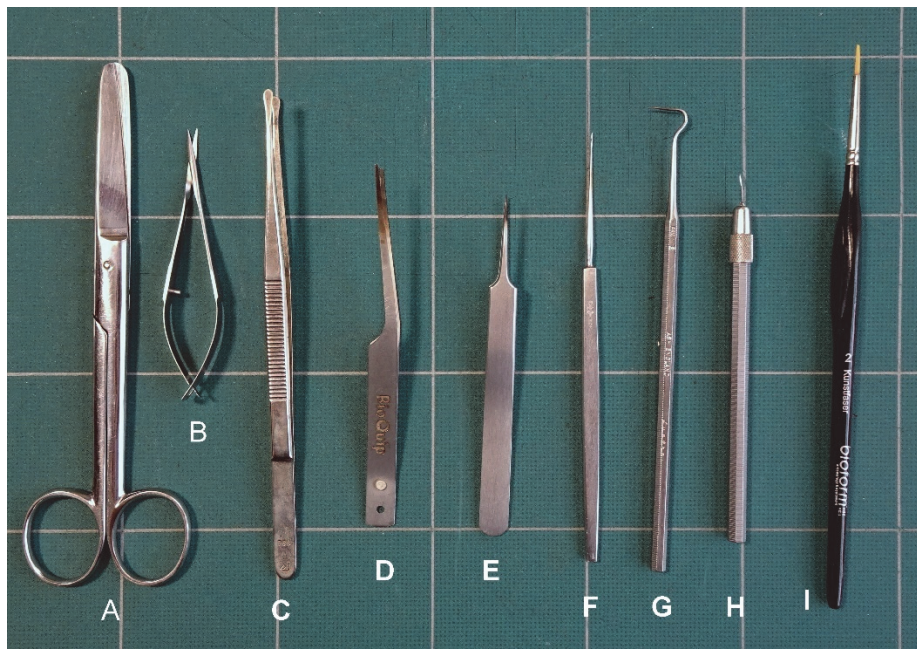
La forma en que se da muerte a los especímenes capturados repercute sensiblemente sobre su posterior preparación. Es esencial que los ejemplares queden blandos y con las extremidades flexibles una vez superado el *rigor mortis*, que viene a durar entre 6 y 24 horas. Esta flexibilidad se obtiene matándolos con acetato de etilo, o por congelación emplazando el bote en un frigorífico, si se tiene a mano.

Cada vez es más frecuente extraer el ADN a algunos ejemplares para su ulterior análisis molecular (estudios filogenéticos, poblacionales, de identificación, etc.). En los ejemplares que se han matado con acetato de etilo, el ADN se descompone a los pocos días, por lo que hay que pasarlos a alcohol

<sup>3</sup> En el campo se puede usar una libreta para notas rápidas o la grabadora del teléfono móvil.



absoluto lo antes posible, o para más garantía sacrificarlos metiéndolos directamente en el alcohol. A tal fin, es práctico ir provisto de tubitos (4 y 10 ml) con alcohol absoluto, sin perjuicio de renovar el alcohol al día siguiente de su uso para eliminar cualquier resto de agua aportado por el insecto. Estos tubitos, o mejor en otros que tengan tapa de rosca con toro (2 ml), se guardan en un congelador a baja temperatura ( $< 15^{\circ}\text{C}$ ) hasta el día de la extracción del ADN.



**Fig. 3.** Instrumentos. **A** = tijeras normales, **B** = microtijeras, **C** = pinzas filatélicas de punta roma, **D** = pinzas blandas (de relojero), **E** = pinzas de precisión de punta muy fina, **F**: aguja enmangada recta, **G**: aguja enmangada de punta curvada (sonda odontológica), **H** = porta-agujas y **I** = pincel de pelo de marta nº 2. Cuadrícula del fondo 5x5 cm.

## Almacenamiento provisional

Es idóneo preparar los ejemplares al día siguiente de su captura y muerte, o poco después. Sin embargo, es frecuente tener que almacenarlos por un tiempo prolongado, a veces años, hasta que se presenta la ocasión.

### En canutos de papel

Al día siguiente de su colecta y ya muertos, los ejemplares se colocan en el centro de una hoja de papel higiénico, usualmente de  $12 \times 9,5$  cm tras separarla del rollo por la línea de rotura /Fig. 4). El papel se enrolla formando un canuto que luego se dobla hacia dentro por ambos extremos para formar un único canuto de  $1/3$  de la longitud (aprox.  $4\text{--}5$  cm  $\times$   $1\text{--}1,3$  cm de diámetro). La correspondiente etiqueta de localidad se adosa al canuto y ambos se meten en un bote plástico de unos 10 ml añadiéndole luego unas gotas de acetato de etilo y/o varias de agua acidulada (2% ácido acético), con el objeto de generar humedad sin ensopar el contenido (riesgo de putrefacción). La etiqueta debe quedar legible desde el exterior del tubo. También se puede roturar con tinta indeleble sobre el plástico alguna indicación del contenido (p. ej. Tenebriónidos varios). Los tubos de 10 ml se venden con tapa simple o provista de toro. En los primeros –más baratos– la humedad suele perderse a la larga, lo cual implica un paso más previo a la preparación: reblandecer. Obviamente, hay tubos más grandes si fuere necesario albergar un canuto con ejemplares mayores (Fig. 2 B-C).





Fig. 4. Tubo de 10 ml y canuto de papel con ejemplares. Cuadrícula del fondo 5×5 cm.

### En medio líquido

Los mismos tubos de 10 ml se pueden emplear para almacenar el material capturado en medio líquido. Puede usarse alcohol al 70% o agua acidulada (ácido acético al 2%) que los mantiene más relajados. También sirve una dilución 1/4 de acetona comercial ( $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ ) en agua, Mercryl lauryl<sup>4</sup> sin diluir, o el líquido de Scheerpeltz<sup>5</sup>. Estos últimos suelen usarse con microcoleópteros con la ventaja o inconveniente, según se mire, de que hincha los ejemplares —abdomen y alas— o provoca la extrusión de la genitalia (p. ej. ovopositor, edeago). Téngase en cuenta, además, que los ejemplares no deben estar rígidos cuando se meten en el líquido, pues si se matan ahogándolos en él o poco después de haberlos sacrificado suelen conservar algo de *rigor mortis*. Ejemplares de *Laemostenus complanatus* —un carábido— metidos en acetona, Mercryl y Scheerpeltz se han mantenido completamente relajados tras 23 años, sin que se aprecien diferencias entre uno u otro producto.

### En congelación

Los botes de colecta con los ejemplares vivos o muertos pueden meterse directamente en el congelador de una nevera y dejarlos allí hasta el día en que vayan a ser preparados. Es importante que el bote mantenga el papel higiénico en su interior para absorber posibles gotas de agua. Una vez descongelados los ejemplares, estarán blandos y aptos para su preparación inmediata o al día siguiente (si hubo *rigor mortis*).

<sup>4</sup> Mercryl lauryl ( $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{ClHgNaO}_5\text{S}$ ) es un antiséptico jabonoso que se emplea en higiene dermatológica y se vende en farmacias.

<sup>5</sup> Líquido de Scheerpeltz: 60–65% de alcohol absoluto, 5% de ácido acético glacial y 35–30% de agua.

## Fijación de tejidos

Las larvas de muchos coleópteros son de tejido blando (p. ej. curculiónidos) y han de conservarse en un líquido fijador. Normalmente, y al igual que para los imagos<sup>6</sup>, se emplea el alcohol etílico al 70%–75%. No obstante, y de cara a su disección para estudios anatómicos internos, es preferible utilizar el líquido de Pampel<sup>7</sup>. La presencia de ácido acético facilita la distensión de los tejidos. Se guardan en tubos de 2 ml con tapa roscada provista de toro, y con su correspondiente etiqueta.

## Preparación de ejemplares

### Rehidratación

Cuando los insectos guardados se han secado y están rígidos hay que reblandecerlos antes de proceder a su preparación. Esto ocurre si se ha perdido la humedad en los tubos de almacenamiento, lo que se comprueba al abrirlos y tocar el papel higiénico. Es bastante común si la tapa de los tubos no está provista de toro de sellado y se emplearon solo un par de gotas de acetato de etilo (se evapora rápido). En tal caso, un día antes de iniciar la preparación se añaden unas 5-8 gotas de agua acidulada (ácido acético al 2%). Cuanto más grandes sean y más secos estén los ejemplares, más tardarán en rehidratarse. También se pueden sumergir directamente en un pocillo con agua acidulada, o incluso hervirlos para acelerar el proceso. En los casos más recalcitrantes cabe tratarlos con enzimas digestivas para que digieran la musculatura (ver preparación de pancreatina en el apartado de genitales).

Si al abrir el canuto de papel se comprueba que los ejemplares están secos, no deben guardarse de nuevo en el tubo por riesgo a rotura de las extremidades. Se trasladan con cuidado o con el mismo papel higiénico a una placa de Petri de cristal<sup>8</sup> (p. ej. 7,5 cm de diámetro), con el fondo cubierto de papel de filtro (Fig. 5). Luego se empapa con agua acidulada y se tapa dejando actuar 1-2 días. Si los ejemplares son demasiado grandes, se puede construir una cámara de rehidratación con un táper que sea más alto, colocando una capa de algodón o una esponja plana debajo del papel de filtro.

En escarabajos muy grandes la rehidratación de los tegumentos que unen las partes duras del exoesqueleto puede ser muy lenta. Este proceso se puede forzar metiendo los ejemplares en un tubo o frasco de vidrio de paredes gruesas relleno con agua acidulada y cuya boca debe rondar los 2,5 cm de diámetro (Fig. 12 A-B). Luego se aplica un tapón de goma (fisurado) de los que venden junto con una pequeña bomba manual para sacar el aire de las botellas de vino. Se hace el vacío y se deja reposar el tiempo necesario, que siempre será menor que en condiciones normales.

<sup>6</sup> Es raro que existan colecciones permanentes de coleópteros en medio líquido, como ocurre con otros insectos, pero es factible empleando alcohol al 70%.

<sup>7</sup> Líquido de Pampel: 15 partes de alcohol 95%, 6 partes de formol 40%, 4 partes de ácido acético glacial y 30 partes de agua destilada.

<sup>8</sup> Las placas de plástico son muy económicas, pero no cierran bien y las disuelve el acetato de etilo.



**Fig. 5.** Placa de Petri preparada como cámara de humedad. Cuadrícula 5×5 cm.

### Lavado

Antes de montar los ejemplares hay que lavarlos, aunque a primera vista parezcan limpios. Se emplea un colador de malla fina o mejor aún las redecillas plásticas semirrígidas que se venden para preparar infusiones, colgándolas dentro de la taza o la tetera. Las hay de varios tamaños y formas. La última que adquirí es cilíndrica y mide 6,5 cm de diámetro y 5,5 cm de altura (**Fig. 6**).



**Fig. 6.** Redecilla para el lavado de ejemplares y recipiente para guardarla

Los ejemplares se meten en la redecilla y se colocan directamente bajo el chorro de agua —no violento— en el lavabo. Deben estar blandos, o ser romperán las extremidades. Si se aprecia mucha suciedad o están grasientos, basta con añadir una gota de detergente antigrasa de cocina y lavar hasta que desaparece la espuma. El enjuague tarda entonces más, pero los ejemplares quedan impecables. La redecilla se sacude y luego se apoya sobre un pañuelo o toalla para eliminar buena parte del agua retenida. Después se voltea sobre una pieza de papel higiénico, dándole unos golpecitos en la base con las pinzas u otro objeto similar, a fin de que se desprendan todos los ejemplares. Si alguno pequeño quedara adherido, se ha de desprender con un pincel fino o con las



pinzas blandas. El papel higiénico absorbe el agua adherida a los ejemplares y se puede plegar sobre ellos para secarlos más rápido. De ahí, se pasan a la platina de preparación.

### Ensartado

Los ejemplares muy grandes ( $> 2$  cm) se ensartan con un alfiler entomológico<sup>9</sup> del número 3 ó 4 pinchando próximo al ángulo basal interno del élitro derecho (Fig. 7 punto rojo), y de modo que al asomar por debajo lo haga entre las patas intermedias y traseras, sin dañar las coxas. Se pincha hasta dejar libre un centímetro de alfiler, cómodo para cogerlo con los dedos. Luego se clava sobre un taco —grosor mínimo 4 cm— de corcho blanco (poliespán expandido) forrado con papel de filtro, hasta que el vientre repose sobre el papel y las extremidades queden a la misma altura. Éstas se recogen contra el cuerpo para reducir el riesgo de roturas accidentales al manipular el ejemplar. Si fuere necesario se usan alfileres para sujetar las patas y antenas en la posición deseada. Luego se deja reposar hasta que seque, proceso que se puede acelerar con calor, situando encima una lámpara con bombilla incandescente encendida (60 W).

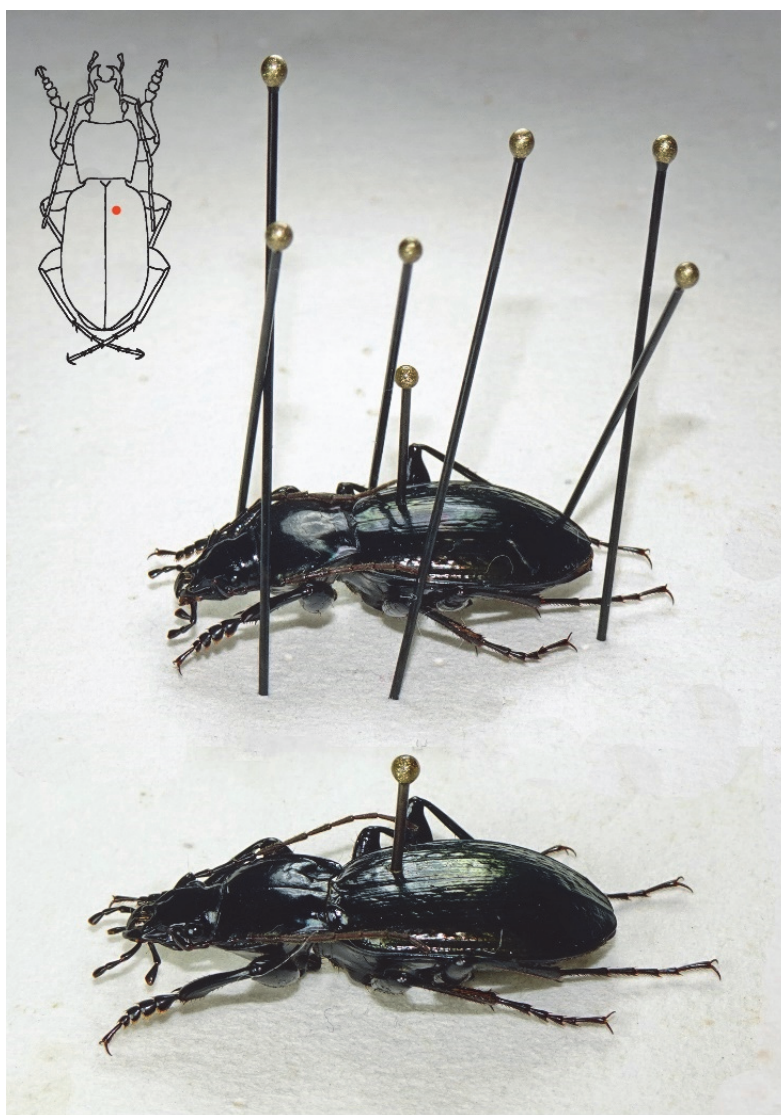


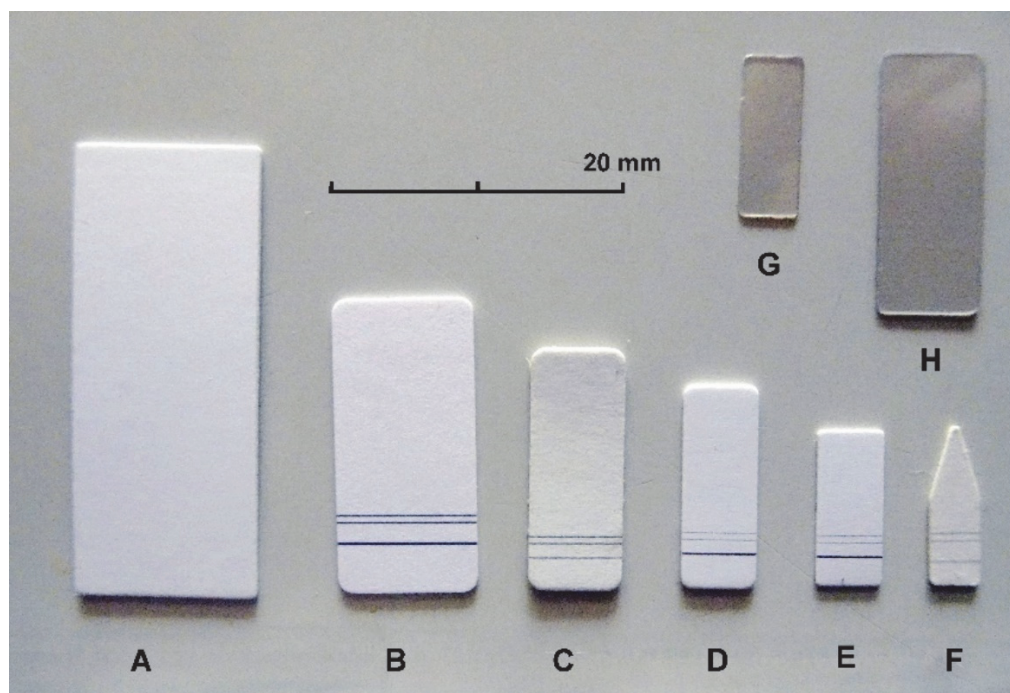
Fig. 7. Ejemplares de *Carabus faustus cabrerai* Enderlein, 1929 ensartados con alfiler.

<sup>9</sup> Para ensartar insectos es preferible usar alfileres de acero inoxidable, ya que no se oxidan como puede ocurrir con los alfileres negros (más baratos).

## Pegado

Si el tamaño del ejemplar lo permite ( $< 2$  cm), lo habitual es pegarlo sobre una cartulina de montaje (Fig. 8). Se venden en los comercios entomológicos y las hay de muchos tamaños y formas<sup>10</sup>, incluso algunas para ejemplares grandecitos (p. ej. nº 12, de 13×32 mm).

Hay colegas que pegan el ejemplar sobre la cartulina de montaje de cualquier manera, siempre que queden visibles los caracteres de interés, mientras que otros, entre los que me incluyo, nos tomamos la molestia de extender las patas y antenas guardando cierta simetría al pegarlas. El prepararlos así implica más trabajo, pero compensa porque le da a uno más tiempo para irse familiarizando con a la morfología de la especie, y luego facilitará grandemente la comparación de proporciones y otras características, además del plus estético, que no es baladí.



**Fig. 8.** Cartulinas de montaje. **A** = nº 12 (sin rallado), **B** = nº 9, **C** = nº 7, **D** = nº 6, **E** = nº 3 y **F** = nº 3 (punta afilada). Etiquetas plásticas **G** = 11×4 mm y **H** = 18×7 mm.

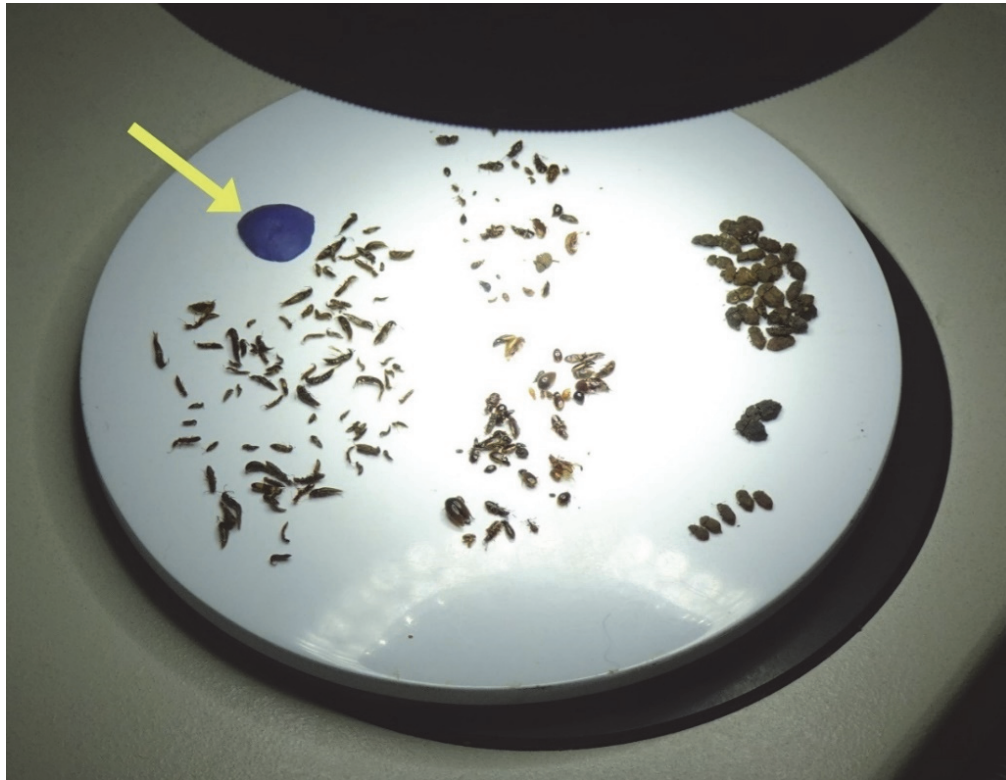
Si los ejemplares se han hinchado mucho tras haber sido conservados en medio líquido, es práctico pincharlos con un alfiler en el tegumento blando del cuello o del pronoto, para que pierdan el exceso de agua (sobre papel higiénico).

La separación de las extremidades se hace usualmente con el ejemplar boca arriba sobre una platina y bajo la lupa binocular ( $5\times$ – $25\times$ ), sujetándolo con una aguja enmangada en la mano izquierda mientras se manipula con la otra aguja en la mano derecha (los diestros). Empecé usando una mina de bolígrafo Parker con un alfiler del núm. 2 fijado con esparadrapo en su extremo; luego usé directamente dos alfileres entomológicos del núm. 3, y por último vengo trabajando con dos sondas de acero inoxidable que me regaló un entomólogo dentista. Una es recta y la otra con un quiebro terminal (Fig. 3 G), lo que permite atacar el ejemplar por la izquierda o la derecha aplicando un breve giro al mango. Para ejemplares muy pequeños empleo un porta-agujas con un alfiler del nº 1

<sup>10</sup> Personalmente empleo cuatro cartulinas básicas de forma rectangular: nº 3 (4,5×11 mm), nº 6 (5×14 mm), nº 7 (8×17 mm) y nº 9 (10×20 mm).

recortado para que no asome mucho (Fig. 3 H). Las minucias son más finas, pero demasiado flexibles y tienen el mal gusto de catapultar el ejemplar a distancia si se traban en alguna aspereza de la platina. La mismísima punta de este alfiler (o de la minucia) la doblo para que haga de gancho y permita arrastrar las patas de debajo del cuerpo, o tirar de la genitalia, etc.

Resulta muy práctico preparar los ejemplares sobre una platina adicional ubicada sobre la platina ordinaria que lleva incrustada la lupa binocular (Fig. 9). Esto facilita el desplazarla a uno u otro lado y situar el ejemplar objeto de atención bajo el eje de visión, o rotarlo si es necesario.



**Fig. 9.** Platina adicional bajo la lupa con muestra de coleópteros. La flecha señala un “volcancito” de plastilina para colocar boca arriba ejemplares muy convexos.

Para sujetar o para extender las extremidades —y eventualmente quitar algún cisco que otro— se puede usar también un pincel de pelo de marta de punta fina (p. ej. Nº 3, con el palo de sección triangular para que no rueda sobre la mesa).

Un artilugio casero pensado para sujetar coleópteros muy pequeños (1–3 mm) consiste en un trozo de pajita plástica —de las usadas para sorber refrescos— cortada en bisel doble y achaflanadas la puntas, por las que se hace pasar un cabello humano tenso, que luego se fija lateralmente con cinta carrocera (Fig. 10). A dicho cabezal-horquilla se le añade un mango de madera (p. ej. de un pincel). Con el arco de cabello se sujeta el ejemplar sin que la presión lo dañe, y así se pueden manipular las extremidades con comodidad. Lamentablemente no recuerdo en qué trabajo leí sobre este invento, por lo que no puedo dar el debido reconocimiento a su autor.





**Fig. 10.** Horquilla con cabello para sujetar ejemplares muy pequeños.

Los especímenes con élitros en forma de concha (p. ej. coccinélidos) no se dejan sujetar bien estando boca arriba y se giran al intentar manipularlos. Para evitar el correspondiente desespero se coloca sobre la platina un pequeño montículo de plastilina dándole forma de cono volcánico, en cuyo cráter se sitúa el ejemplar que quedará inmóvil. También, y con la ayuda de un taladro de dentista se pueden excavar pequeñas concavidades de diferente diámetro (e.g. 1,5–3 mm) sobre la propia platina de montaje, pero las concavidades serán permanentes.

Una vez listo el ejemplar, con sus extremidades extendidas, se procede a pegarlos sobre la cartulina de montaje. Ésta se embadurna con una fina capa de pegamento, bien empleando un pincelito — como los que se usan para pintar las uñas— o extendiendo una gotita con un punzón o con la cabeza de un alfiler entomológico pinchado en un tapón de corcho. Luego, mediante unas pinzas rígidas de punta roma se agarra y voltea la cartulina de montaje y se aproxima hasta tocar el ejemplar que está boca arriba, y así quedará pegado en posición correcta. En caso de estar el ejemplar boca abajo, se traslada hasta el pegamento de la cartulina asiéndolo con unas pinzas de relojero (suaves) o, lo más común, si no son grandes, mojando la punta de la pinza o de la aguja enmangada con saliva y adhiriendo el ejemplar por contacto en los élitros.

Después de ensayar varios tipos de pegamento, al final he optado por los de polisacáridos (celulosa) que se usan para pegar papel en las habitaciones. Una vez secas, las fibras no se aprecian, pero amarran al ejemplar por los pelos, tarsos o cualquier saliente, quedando todo muy firme y apto para zarandeos y transporte, sobre todo si se pegan todas las extremidades a la cartulina. Esos pegamentos tienen la ventaja adicional de que los especímenes se pueden despegar en cuestión de segundos tras aplicar una gota de agua jabonosa. El despegar un ejemplar puede ser necesario para estudiar la cara ventral, para hacerle una fotografía, o por cualquier otro motivo. También es práctico montar uno directamente boca arriba, en caso de que se tengan varios. El único inconveniente de los pegamentos de polisacárido es que se descomponen rápidamente por levaduras

al poco de haber sido expuestos al aire, salvo que se les haya añadido algo de timol o antifúngico equivalente. La buena noticia es que hay formulaciones en el mercado que ya vienen con el fungicida incorporado<sup>11</sup>; muy recomendables.

La densidad óptima del pegamento se mantiene a gusto añadiendo gotitas de agua o dejando evaporar en el frasco abierto. Su evaporación sobre la cartulina debe dar tiempo para recolocar las extremidades a conveniencia, pero si está muy líquido la tensión superficial suele provocar que las patas se retraigan bajo el cuerpo del animal. Para evitarlo, se emplea el pegamento más denso y en capa más fina, o bien antes de pegar el ejemplar se le seca primero a temperatura moderada, por ejemplo, acercándole un flexo con bombilla incandescente de 50–60W.

Las cartulinas de montaje se pinchan con un alfiler entomológico de número 3 o 4 en su extremo basal. Los hay de acero inoxidable, que son más caros que los negros, pero necesarios si hay alta humedad ambiente, lo cual nunca es bueno para una colección entomológica (riesgo de que se desarrollen hongos).

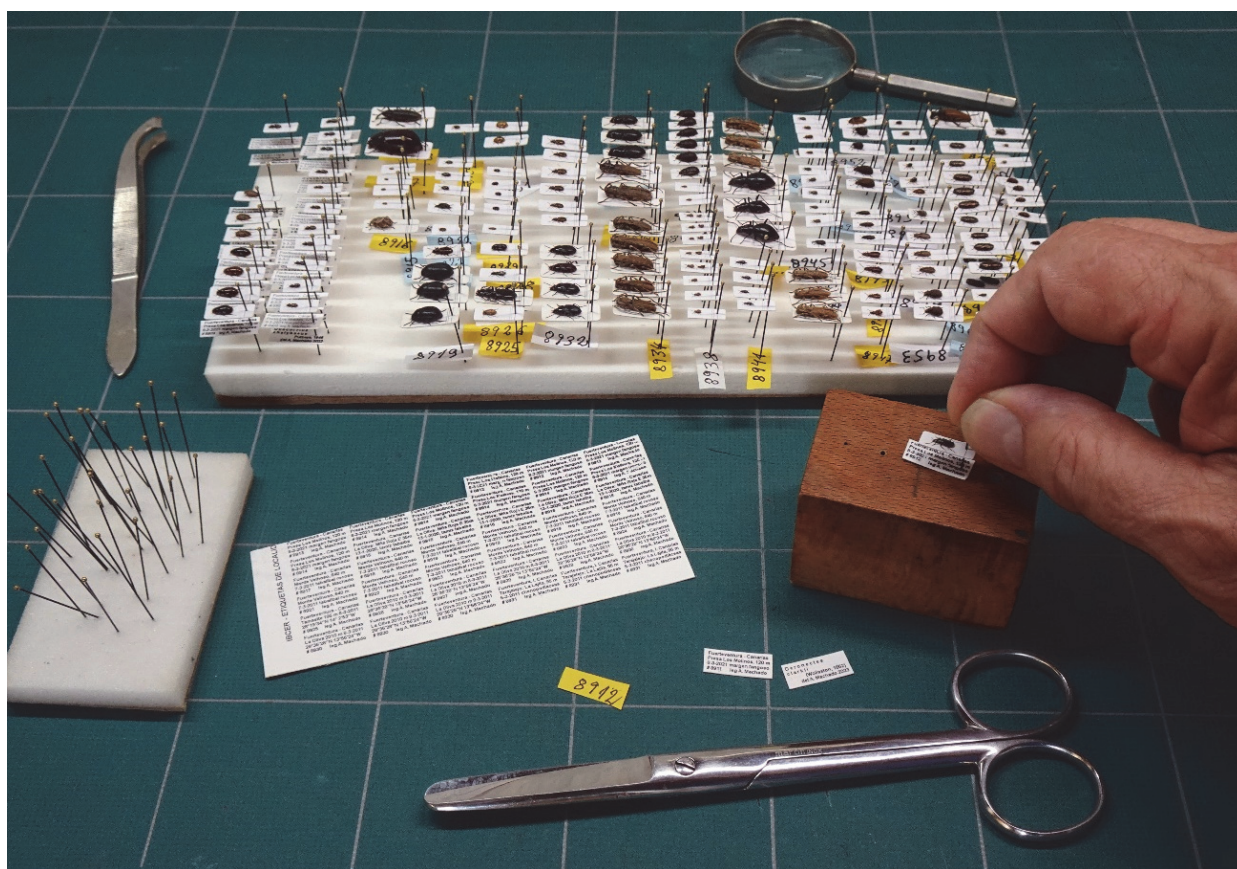


Fig. 11. Colocación de etiquetas definitivas a los ejemplares usando un dado de montaje.

Es conveniente que todas las cartulinas porta-ejemplares queden a la misma altura y esto se consigue usando un dado o escalera de montaje (Fig. 11), que tiene perforaciones verticales por donde se introduce el alfiler hasta un tope. El primero y más profundo es para la cartulina con el ejemplar, el segundo para la etiqueta de localidad y el tercero para la de identificación. Esto es lo

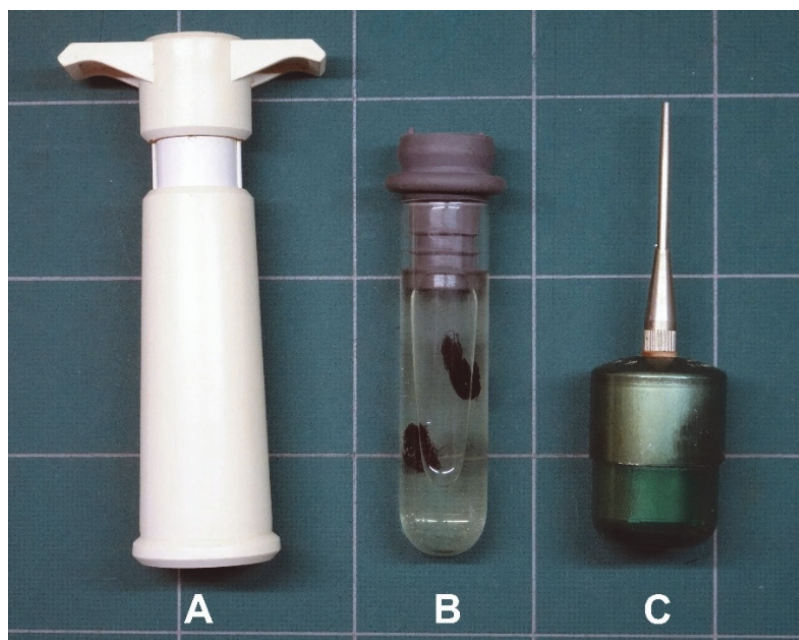
<sup>11</sup>. *Metylan Special*, de la casa Henkel Ibérica S.A. (en polvo). Espolvorear 10 gr de polvo en 200 ml de agua mineral fría. Revolver muy bien y repetir a los 30 minutos; puede tardar un par de horas en homogeneizar y quedar sin grumos. No se descompone.

mínimo, pero también se pueden añadir más cartulinas con ejemplares (montaje en batería si se quiere ahorrar alfileres y espacio), una etiqueta plástica o un vial con la genitalia (Fig. 14 y 15), u otras etiquetas según sea necesario (datos ecológicos, registros de museo, de préstamo, ejemplar fotografiado, etc.).

Si a medida que se preparan los ejemplares se les va dando de alta en la base de datos, bastará de momento con añadir su número de registro en una etiqueta provisional hecha a mano, hasta que se impriman las etiquetas definitivas. Este proceder ahorra mucho trabajo.

## Limpieza

El polvo o ciscos indeseables que puedan aparecer en los ejemplares recién montados o bien en los de colección se barren con cuidado mediante un pincel suave, o se pueden soplar empleando una perilla o pulsador de aire, como los que usan los relojeros (Fig. 12-C). También sirve soplar a través de un tubo plástico con la boca más estrecha (p. ej. un bolígrafo BIC sin la mina).



**Fig. 12.** **A:** Bomba de vacío. **B:** tubo de cristal robusto con tapón para extraer el aire. **C:** Perilla de relojero.

Si hubiera restos de pegamento, estos se retiran con un pincel humedecido en agua, pero si se trata de grasa expelida por la cutícula del coleóptero, entonces se usa el pincel mojado en benceno (es tóxico), gasolina de mechero, o alcohol con timol disuelto. Este último sirve para prevenir el desarrollo de hongos o para eliminarlos en caso de haberlos y siempre que su desarrollo no haya sido excesivo.

Si el ejemplar va a ser destinado a fotografía con un microscopio electrónico de barrido, la limpieza ha de ser más concienzuda de lo normal. Los autores que se dedican a ello (p. ej. Harrison, 2012) recomiendan un tratamiento de 1-2 minutos con microondas, y peinado con Decon 90<sup>12</sup> si hubiese emplastes grasientos.

<sup>12</sup> Decon 90 es un detergente para descontaminación radiactiva que se vende en el mercado. Si se usa luego hay que aclarar bien con agua. Para limpieza total se usa diluido al 20%, unas dos horas. También sirve para digerir tejidos, al 100% en 1-2 días. En ambos casos, aclarar con agua pues contiene hidróxido de potasa.



## Etiquetado

A todo ejemplar montado debe acompañarle al menos la etiqueta de localidad, y la de identificación una vez haya sido determinada la especie a la que pertenece. Antes se hacían a mano y con tinta china, pero los ordenadores y las impresoras láser son una opción moderna muy práctica y rápida. Hay programas específicos para diseñar e imprimir etiquetas<sup>13</sup>, o se puede trabajar con Word o con Excel de Microsoft, usando una fuente simple (Arial, Calibri, etc.) y tamaño de letra pequeña (3–4 pt), pero sin que lo sea tanto como para necesitar una lupa de mano a la hora de leerlas.

Mis etiquetas las hago del mismo tamaño que una cartulina de montaje del nº 7 (8×17 mm), lo que me permite escribir cuatro líneas. Haciéndolas un poco más anchas cabrían cinco líneas, pero a coste de no poder arrimar tanto los ejemplares montados cuando se quieren comparar bajo la lupa binocular. En la Fig. 13 hay ejemplos de etiquetas de localidad y determinación. Nótese que el #número de registro corresponde a la base de datos de mi colección, donde se recoge esta misma información además de cualquier otra de interés (ecología, incidencias, etc.), incluidas las coordenadas geográficas de la localidad. La tendencia actual es añadir las coordenadas en las etiquetas que acompañan al ejemplar, bien en una línea adicional o en una etiqueta independiente.

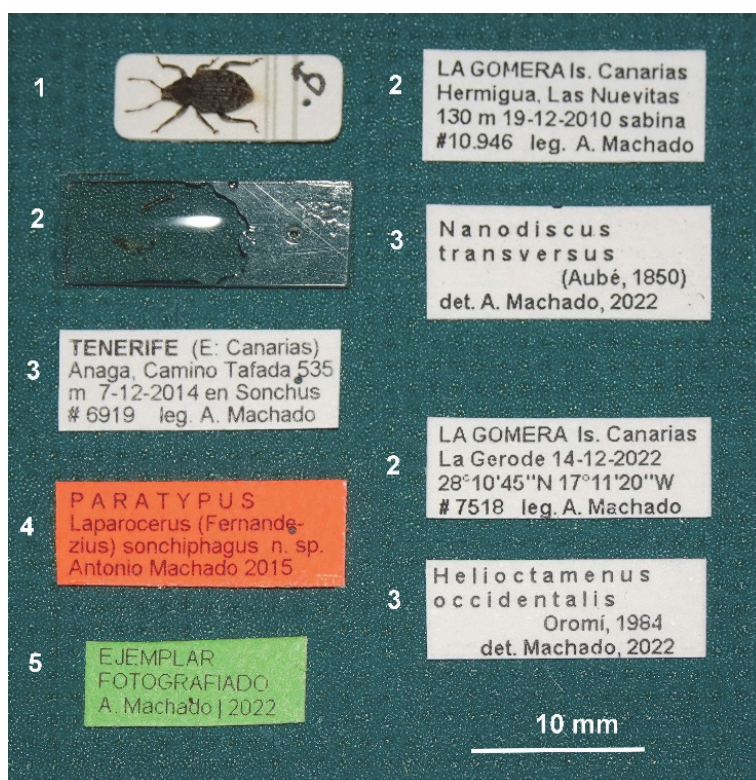


Fig. 13. Ejemplos de etiquetas y orden en el alfiler que las porta.

Las etiquetas de identificación referentes a tipos (holotipos, paratipos, etc.) las imprimo sobre cartulina de color rojo luminoso (Pantone 811 C 2X), donde la tinta negra destaca bien. Además, en el caso de holotipos coloreo con un rotulador rojo la base de la cartulina de montaje (del alfiler hacia abajo) para facilitar su localización visual en las cajas.

<sup>13</sup> Yo empleo Labeljoy Version 5.4 (programa de pago) e imprimo en cartulinas de 7,5×12,5 cm (antiguas fichas para bibliografía) donde caben diez filas de seis etiquetas. Un programa freeware reciente y prometedor es EntomoLabels (<https://labels.entomo.pl/>), igualmente muy versátil.

También uso la base de las cartulinas de montaje (sin superar el rayado) para anotar el sexo (♂ o ♀) con un rotulador del 0.1, particularmente en aquellos ejemplares que solo se puede determinar inspeccionando la cara ventral.

### Disciplina

Muchos errores de localidad nacen por descuido en la mesa de trabajo y acaban por convertirse en una pesadilla. No se debería trabajar a la vez con material de varias localidades. Acabar primero con una, etiquetar al menos con etiqueta provisional y solo después abordar el material de la siguiente localidad.

Otra recomendación es distribuir los instrumentos (agujas, pinzas, etiquetas, etc.) y frascos (acetato, pegamento, agua acidulada, etc.) en la mesa de trabajo y superficies anejas de forma estratégica según su uso, y mantener una disciplina férrea en dicha distribución. A la larga, se agradecerá.

## Preparación de la genitalia

La extracción de la genitalia a algún que otro ejemplar es práctica habitual para la caracterización morfológica de las especies y necesaria en muchos casos para una identificación segura.

### Extracción

Si los especímenes son pequeños y han estado conservados en líquido de Scheerpeltz, es frecuente que acaben con el abdomen hinchado y la genitalia parcialmente extruida (edeago u ovíscapo). Siendo así, basta tirar de la pieza que asoma con unas pinzas hasta extraerla del todo.

En ejemplares frescos de talla grande o media, se levanta el último ventrito abdominal y se introduce la punta muy fina de una pinza —o una aguja o minucia con la punta recurvada— hasta enganchar la genitalia y tirar de ella. Si el espécimen es pequeño o no está del todo fresco, es preferible levantar todos los ventritos o desprender el abdomen para poder retirar su contenido, que incluirá la genitalia. Luego los ventritos se vuelven a colocar en su sitio o, alternativamente, se pegan junto al imago en la misma cartulina u otra adicional.



Fig. 14. Microviales de plástico y de cristal para guardar genitalias u otras piezas.

Cuando los ejemplares están secos (p. ej. de colección) o no demasiado blandos, un método expedito consiste en meterlos (con cartulina incluida) en un tubo de ensayo corto con algo de agua y llevarla a ebullición un par de veces, sobre la llama de un mechero de alcohol. Hay que agitar el tubo continuamente y retirarlo de la llama a tiempo para que el agua no se proyecte fuera del tubo. Luego se sacan del tubo y se secan sobre papel higiénico, quedando listos para proceder a la extracción de la genitalia. Si no estuvieran suficientemente blandos, se repite la faena y se deja reposar un tiempo en el agua caliente.

### **Limpieza**

El edeago se sumerge en una o dos gotas de glicerina ( $C_3H_8O_3$ ) sobre la propia platina, o en un pocillo de vidrio con glicerina, y se limpia a mano bajo la lupa binocular con ayuda de alfileres o agujas enmangadas finas. Los restos de tejido (músculos, etc.) se retiran respetando las piezas esclerotizadas y membranas interconectivas que interese conservar. También se puede ayudar con unas microtijeras (Fig. 3-B) para cortar en vez de desgarrar. Sin embargo, lo ideal— y particularmente conveniente con la genitalia femenina, más delicada—, consiste en emplear enzimas digestivas que eliminan todos los tejidos menos la quitina. Este método es excelente y preferible al tradicional uso de la potasa (KOH) o la sosa (NaOH) cáusticas al 10–15%, que también sirven, pero son muy corrosivas y hay que vigilar su acción, pues conlleva riesgo de destruir microesculturas cuticulares y piezas internas.

Utilizo pancreatina en solución acuosa tamponada con bórax<sup>14</sup> que reparto en un buen número de viales de Eppendorf (1,5 ml) hasta la mitad y guardo en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ , a modo de arsenal siempre a disposición. Son de un solo uso. La genitalia o el paquete abdominal completo se introduce en el vial sobre la pancreatina congelada o ya líquida, y se cierra. La digestión de los tejidos se produce en unas dos horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , o requerirá casi un día completo a temperatura ambiente. Si no se dispone de una estufa autorregulada y son pocos viales, los coloco en mi entrepierna, bajo los pantalones, mientras sigo preparando ejemplares. A las dos horas, todo queda limpio.

### **Montaje**

La genitalia limpia, o incluso recién extraída, se puede guardar en glicerina en microviales de cristal o de plástico (Fig. 14) que se pinchan por el tapón en el mismo alfiler que porta el ejemplar diseccionado (Fig. 15). En el momento de cerrarlos hay que introducir por la boca el tapón junto con la punta de un alfiler para que el aire salga, y luego retirar el alfiler (cierre firme). A la hora de estudiarla se coloca en un portaobjetos excavado, con una gota de glicerina, y puede voltearse a gusto (vista dorsal o de perfil).

Los edeagos pueden pegarse sobre la misma cartulina de montaje del insecto, bien por delante, al medio, o en una de las esquinas traseras. Sin embargo, si las genitalias van a examinarse con un microscopio es preferible montarlas en un medio hidrosoluble sobre etiquetas de plástico

---

<sup>14</sup> La pancreatina es un extracto de las glándulas pancreáticas porcinas que contienen múltiples enzimas: tripsina, amilasas, lipasas, ribonucleasas y proteasas. Se puede adquirir como medicamento en farmacias (p. ej. Pankreoflat). Primero se prepara una solución saturada de bórax ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) en agua caliente (65 gr en 100 ml de agua) y se deja enfriar a temperatura ambiente (se forman cristales en el fondo). Luego se disuelven 3 gr de pancreatina en 210 ml de agua destilada y se le añaden 90 ml de bórax saturado. Se mezcla bien y se filtra con algodón en un embudo. Se ha de conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Protocolo según Alvarez-Padilla & Hormiga (2008).



traslúcidas<sup>15</sup>(Fig. 8 G-H), fáciles de colocar sobre un portaobjetos. Luego se pincharán como segunda etiqueta bajo el ejemplar diseccionado. Utilizo indistintamente DMHF (dimetil hidrantoína formaldehído) o alcohol de polivinilo<sup>16</sup>, que siempre se pueden reblandecer con una gotita de agua para cambiar la posición de la genitalia si hiciera falta. Las clásicas resinas de montaje (bálsamo de Canadá, Depex, Euparal, etc.) son un auténtico engorro (deshidratación progresiva en alcohol y uso de xilol) y las abandoné hace tiempo, aunque tenían la ventaja de permanecer sólidas. Los medios hidrosolubles pueden escurrirse en la etiqueta si se guardan en posición vertical y hay humedad ambiente, lo que obliga a guardar las cajas de colección siempre horizontales.



**Fig. 15.** Alfiler con ejemplar montado en cartulina, vial con genitalia y etiquetas de localidad y determinación.

Las genitalias se pueden teñir usando negro de clorazol—unos cuantos segundos y enjuague—, si bien rara vez he tenido que recurrir a ello. El microscopio que uso está equipado con contraste de fases y permite observar bien los tegumentos por muy translúcidos que sean.

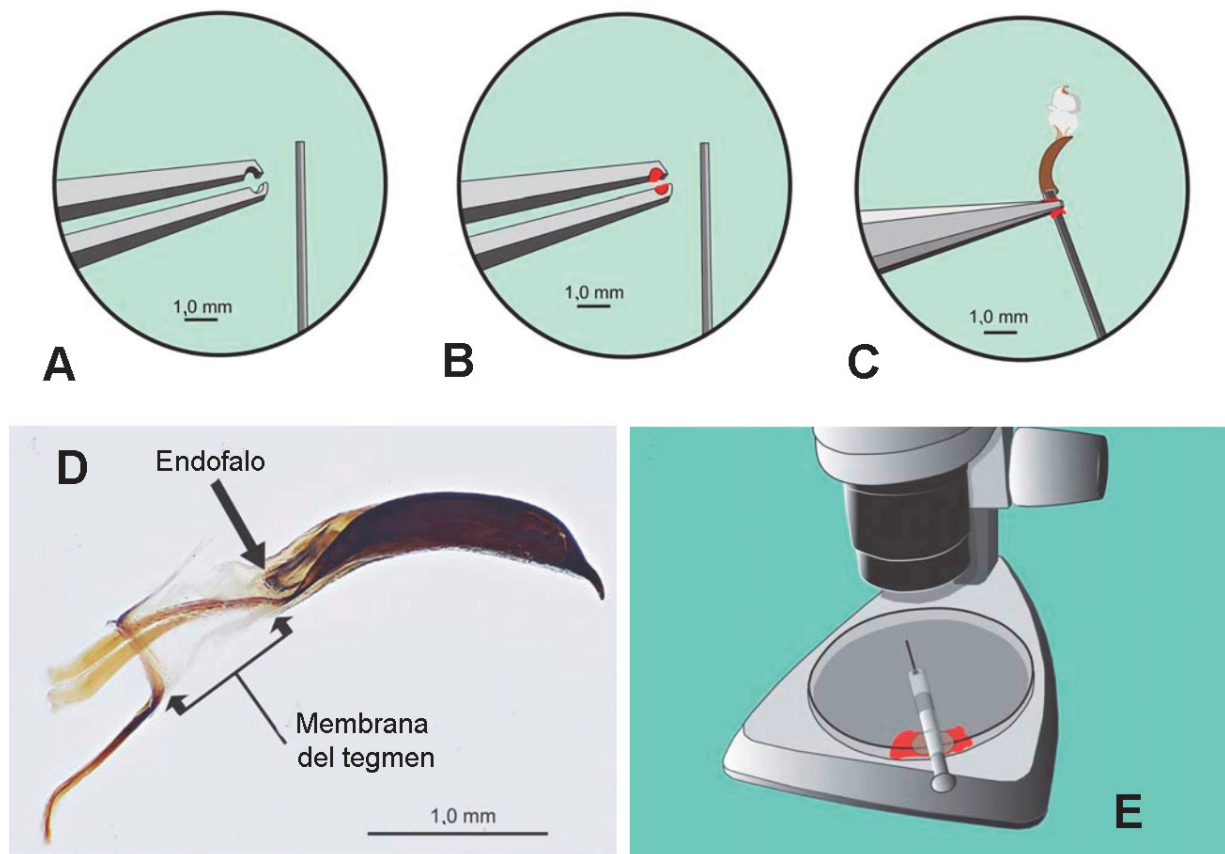
### Eversión del endofalo

El endofalo o saco interno del edeago es un tubo que normalmente reposa dentro del pene y se proyecta por la abertura apical cuando entra en funcionamiento. Puede contener estructuras (dientes,

<sup>15</sup> Se venden en varios tamaños (<http://www.entosphinx.cz/en/168-nalepovaci-stitky-transparentni>) aunque también puede hacerse manualmente recortando hojas de acetato transparente de 0,1–0,2 mm de grosor.

<sup>16</sup> Se adquiere como polvo y se prepara: 1,66 gr de alcohol polivinílico, 10 ml de agua destilada, 10 ml de ácido láctico y 1 ml de glicerina. Seguir esta secuencia.

espínulas, etc.) o formas volumétricas (digitaciones, glóbulos, protuberancias, etc.) de interés taxonómico. Algunas de las primeras pueden verse por transparencia, sobre todo si el endofalo en estado de reposo supera el pene por detrás, pero nunca su estructura tridimensional. Tampoco es frecuente el estudio de esta última, dada lo difícil que resulta de evertir.



**Fig. 16.** Eversión del endofalo. **A.** fórceps de Pierce y aguja de jeringa con la punta roma. **B:** concavidad del fórceps rellena de plastilina. **C:** fórceps agarrando la base del edeago, la membrana conectiva y punta de la aguja. **D:** edeago en vista lateral mostrando parte del endofalo y la membrana conectiva entre el tegmen y el pene. **E:** jeringuilla apoyada en una placa de Petri sujeta para dar estabilidad. Adaptado de Van Dam (2014).

Si por un casual se ha sacrificado una pareja mientras copulaba, basta con separar los ejemplares con cuidado para obtener el endofalo evertido. Pero si no hay tal suerte, la eversión manual es posible, aunque solo en especies de cierto tamaño. El edeago debe estar muy blando y limpio, tratado con enzimas previamente. Hay quienes tiran del endofalo por la apertura apical del pene, poco a poco, ayudándose de una minucia con punta en gancho (en *Carabus*, por ejemplo), pero no acaba inflado. Van Dam (2014) ha desarrollado un método pensado en curculiónidos, y funciona bien siempre que el endofalo no sea mucho más largo que el pene y asome excesivamente por detrás. Consiste en inyectar gel viscoso (p. ej. gel vaginal K-Y) por la abertura basal del pene mediante una jeringuilla de aguja muy fina cuya punta se ha cortado para que sea roma (de las que se usan para insulina, por ejemplo). La aguja se introduce por el anillo del tegmen y luego se abraza junto con la base del pene a nivel de la membrana interconectiva con unas pinzas que tienen una pequeña muesca preapical (se usan en oftalmología, e.g. *Pierce corneal forceps* nº 18155-13). Las muescas se rellenan con un poco de plastilina para garantizar que sellen bien. Entonces, cuando

todo queda bien sujeto, se inyecta el gel con la jeringa y la presión hace que el endofalo se proyecte por la abertura apical, mostrando su estructura tridimensional, que se mantendrá al estar rellana de gel (Fig. 17). Esta operación se realiza en una placa de Petri llena de alcohol 70% (12 cm de diámetro), y requiere cierta pericia. Para más detalles recomiendo echar un vistazo al trabajo original de Van Dam (2014) —ver (Fig. 16)— así como practicar con ejemplares sin interés antes de lanzarse al material definitivo.

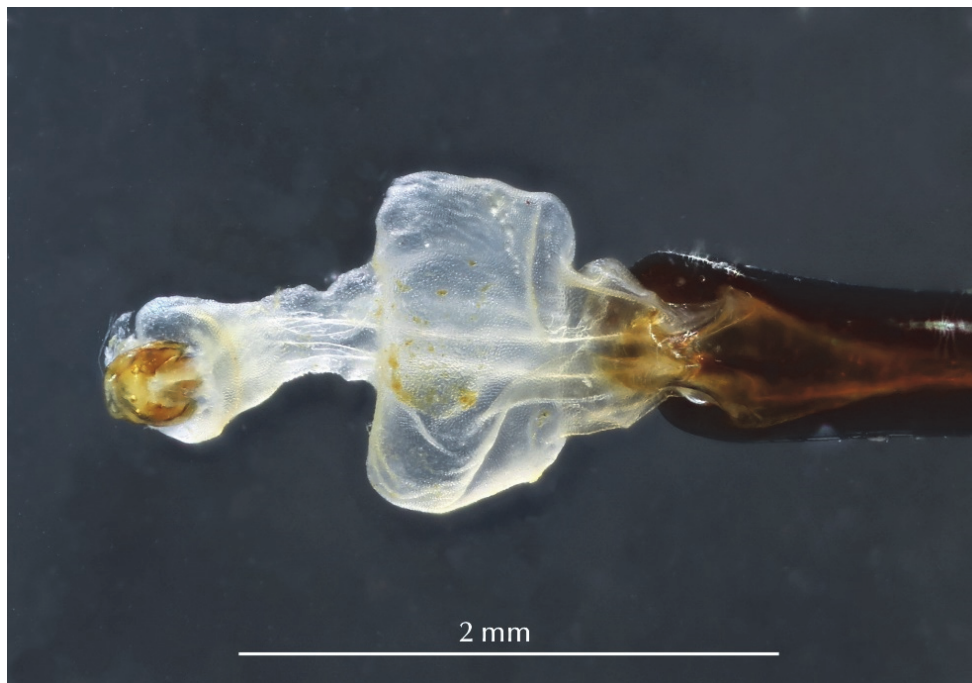


Fig. 17. Endofalo evertido de *Herpisticus laesicollis* Germar, 1824.

## Preparación de otras piezas

En estudios anatómicos detallados es necesario despiezar el insecto para separar y dibujar diferentes piezas o bien órganos y estructuras internas.

### Piezas duras

Lo más habitual suelen ser las piezas bucales y el metendosternito. Ha de usarse material fresco, bien “hervido”, o tratado con pancreatina antes de proceder a la separación mecánica de estas piezas usando agujas enmangadas, pinzas agudas y microtijeras (para abrir la cavidad abdominal, por ejemplo). Se trabaja en glicerina dentro de un pocillo de cristal o en un par de gotas directamente sobre la platina de la lupa. Las piezas individuales se pueden pegar con pegamento hidrosoluble sobre una cartulina de montaje, embutirlas en alcohol polivinilo o en DMHF sobre etiqueta plástica, o guardarlas en microviales con glicerina.

### Estructuras blandas

Si se trata de estudiar estructuras blandas (tubo digestivo, ovarios, testículos, sistema nervioso, tejidos, etc.), los ejemplares han de conservarse en un líquido fijador tras su muerte: por ejemplo, en líquido de Pampel<sup>17</sup>. La disección se realiza en una placa de Petri con el fondo relleno de plastilina para sujetar el ejemplar y los órganos extraídos con alfileres; todo ello sumergido en glicerina, que

<sup>17</sup> El líquido de Pampel se prepara con 4 partes de ácido acético glacial, 6 partes de formol al 40%, 15 partes de alcohol etílico al 95% y 30 partes de agua destilada.



además evita los destellos del sistema de iluminación de la lupa. Las agujas enmangadas, las microtijeras o un microbisturí son necesarios si se van a extraer órganos. Finalizada la disección, el ejemplar abierto y los eventuales órganos retirados se guardan en viales de Eppendorf con glicerina, debidamente etiquetados.

## Larvas y pupas

Las larvas y pupas de tejido blando se mantienen en colección en medio líquido tal como se comentó al tratar sobre la fijación de tejidos. Además del líquido de Pampel ya referido, otro fijador apropiado es una mezcla de alcohol etílico 70%, glicerina 1-2% y ácido acético 1%.

Llegado el momento de su estudio, si solo se pretende observar la morfología externa a la lupa, basta colocarlas en un pocillo con glicerina, tras teñirlas con negro de clorazol, de ser necesario. Para ver bien las diferentes placas tegumentarias deben tratarse primero con pancreatina, vaciarlas por aplastamiento y luego rellenarlas con glicerina hasta que queden bien hinchadas. Si no se quiere teñir, se puede usar un fondo oscuro e iluminación lateral rasante, lo cual pone de relieve todas las estructuras.

Para estudiarlas al microscopio (quetotaxia y otros microdetalles) se montan en glicerina entre un portaobjetos y cubreobjetos, tras el debido tratamiento con pancreatina. Conviene teñir si no dispone de un microscopio con contraste de fases. Finalizada la observación, se devuelven a los tubitos originales con el fijador, o con glicerina en caso de haber sido tratadas con pancreatina.

## Extracción del ADN

Ya se comentó en el primer apartado, que los ejemplares para extracción de ADN han de conservarse en alcohol absoluto inmediatamente o al poco de ser sacrificados y, si es por largo tiempo, a baja temperatura ( $-20^{\circ}\text{C}$ )<sup>18</sup>. Llegado el momento de abordar el análisis molecular, se procede a separar la cabeza y pronoto del resto del cuerpo con ayuda de una o dos pinzas, cuyas puntas han de ser flameadas en un mechero de alcohol cada vez que se vaya a manipular un ejemplar diferente (para evitar contaminación de ADN). Estos ejemplares se remiten al laboratorio en alcohol absoluto dentro de tubos individuales (p. ej. viales Eppendorf), con su correspondiente número de registro anotado externamente (mejor que en etiqueta interior). Allí se procede a extraer el ADN usando algún kit de extracción, como el DNeasy Blood & Tissue Kit (250) de Quiagen, que aplica directamente la proteinasa K sin mediar fenoles ni cloroformo.

Este procedimiento tiene la ventaja de que los ejemplares quedan completamente reblandecidos y aptos para su posterior montaje con pegamento, momento en que se vuelven a unir el pronoto y la cabeza con el resto del cuerpo. Dicho ejemplar preparado, o devuelto a su tubo, ha de señalarse como el origen (*voucher*) de la muestra de ADN con la correspondiente etiqueta adicional y anotación en la base de datos. Es el único garante para vincular la morfología con los datos moleculares obtenidos, fundamental a la hora de su identificación taxonómica. Algunos proyectos

---

<sup>18</sup> En la actualidad se vienen desarrollando técnicas de extracción de ADN de ejemplares secos de colección, incluso de los muy antiguos. Parece prometedor, al respecto al mitocondrial.

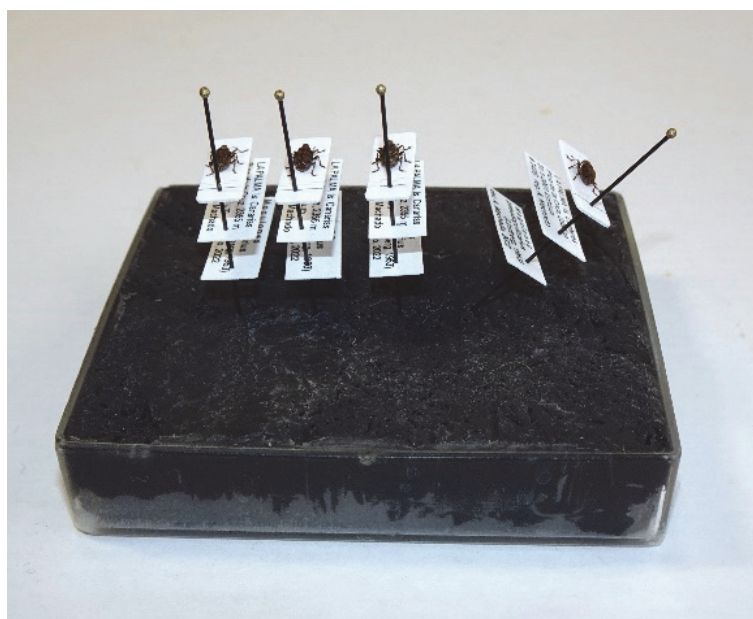
recientes, como el Barcoding (Herbert et al. 2003), suelen requerir que adicionalmente se tome una fotografía del ejemplar.

El método de extraer ADN de todo el cuerpo del insecto tiene el inconveniente de arrastrar ADN de nematodos parásitos —próximos a los insectos— si los hubiere, lo que puede complicar posteriormente el procedimiento o el propio análisis de las secuencias obtenidas. Esto se remedia utilizando solo una pata del ejemplar (normalmente se emplea la intermedia), pero a menudo la cantidad de ADN obtenida es baja, lo que, por otro lado, complica un poco el proceso de amplificación.

## Observación

### Estudio a la lupa

La morfología de los coleópteros se estudia ordinariamente a la lupa binocular (estereomicroscopio) a aumentos que varían entre 7×–80×, y algunas de sus piezas al microscopio ordinario cuando se requieren grandes aumentos (edeagos, espermatecas, piezas bucales, etc.). Yo empleo un modelo ya antiguo de Olympus, la SZX12<sup>19</sup>, a la que he cambiado el objetivo 1× estándar por otro 0,75× a fin de contar con un campo de visión más amplio (49 mm de diámetro) al trabajar con el mínimo aumento (oculares de 10×). Esto es muy práctico a la hora de distribuir y preparar ejemplares, tema del que nos venimos ocupando. Cuando requiero fuertes aumentos para estudiar detalles, sustituyo los oculares 10× por otros 20×.



**Fig. 18.** Cubeta plástica rellena de plastilina para observar ejemplares bajo la lupa

Los alfileres con el ejemplar atravesado o en su cartulina de montaje se pinchan en tiras de poliespán<sup>20</sup>, y se colocan bajo la lupa. Sin embargo, es más práctico rellenar una tapa de una caja plástica rectangular (por ejemplo, 7×6×1,5 cm) con plastilina y pinchar los alfileres en ella (Fig.

<sup>19</sup> En el mercado actual hay excelentes lupas binoculares a precios muy razonables. La Motic SMZ168, por ejemplo, ofrece una distancia de trabajo de 113 mm y un campo de 30,7 mm, con un zoom en versión estándar (objetivo 1× y oculares 10×) que cubre 7.5×–50× aumentos.

<sup>20</sup> Este material se ha convertido en algo omnipresente en Entomología, dada la facilidad con que se pinchan los alfileres en él, una y otra vez, y casi sin dejar rastro. Se emplea sobre todo en los fondos de las cajas de colección, pero se puede adquirir en láminas sueltas para recortarlas a voluntad.

18). Al ser blanda, se puede dar la inclinación apetecida al alfiler sin tener que despinchar y volver a pinchar. Adicionalmente, y para la observación de ejemplares en visión completamente lateral, he rellenado con plastilina una esquinera plástica (aprox. 4×4×4 cm) con igual eficacia. También sirve para este último propósito un tapón de corcho que tenga la cabeza ancha (p.ej. de botella de coñac), colocándolo del revés (Fig. 19). Hay quienes estudian los ejemplares sosteniendo el alfiler con los dedos, pero hay que tener buen pulso, sobre todo a grandes aumentos. En cualquier caso, si se van a tomar mediciones con la ayuda del micrómetro del ocular, es preciso que el ejemplar esté completamente firme, o sea, pinchado.

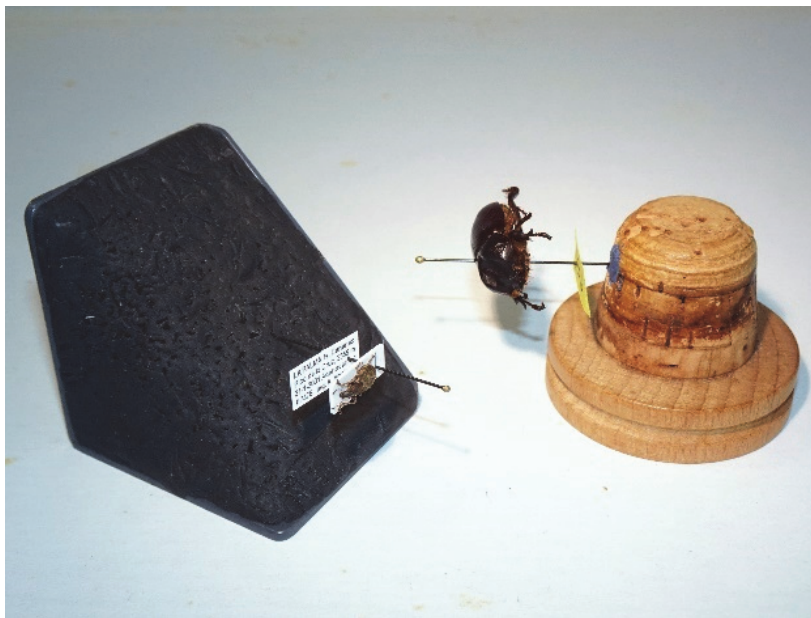


Fig. 19. Dispositivos para la observación de ejemplares en vista lateral.

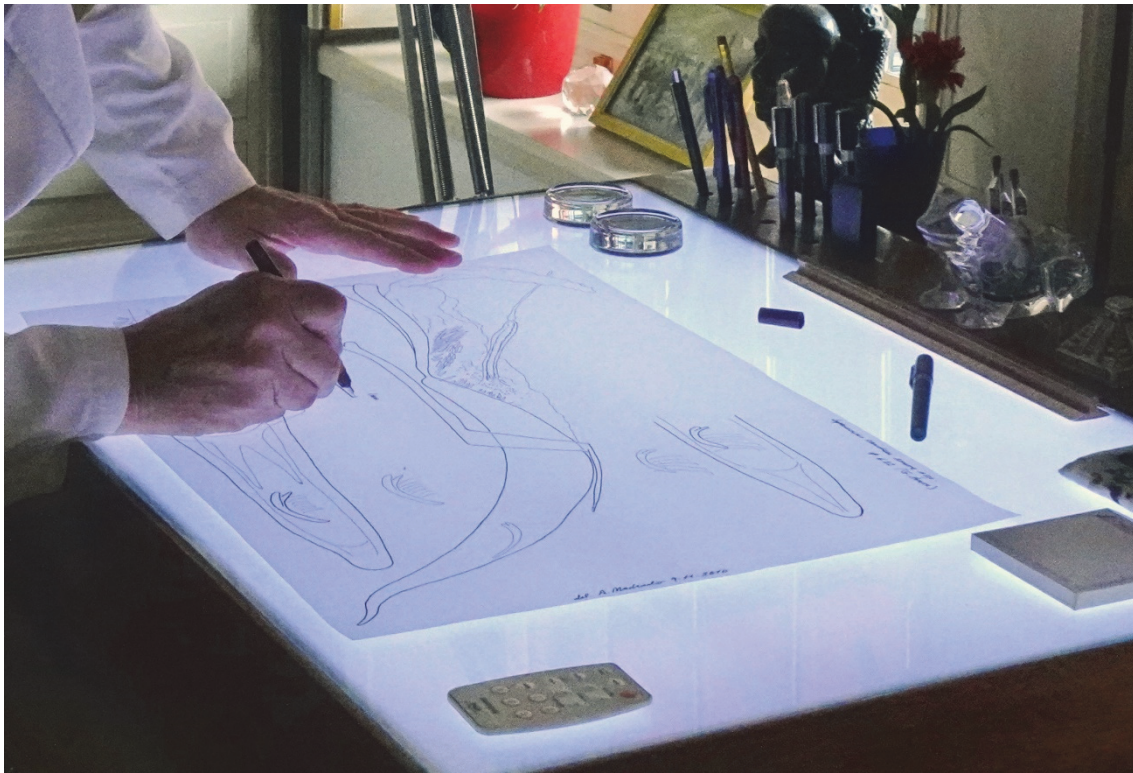
Finalmente, y si le resulta incómodo o tedioso ir haciendo anotaciones en una libreta a la vez que estudia un ejemplar, puede recurrir a una cinta grabadora comandada con un pedal, o a las de arranque automático en presencia de voz. Luego pasará las observaciones a papel o al ordenador con total tranquilidad.

## Dibujo

Aunque las técnicas de fotografía, y particularmente la macrofotografía, han avanzado tremendamente gracias al mundo digital, el dibujo sigue siendo práctica habitual en muchos estudios científicos. Para ello se equipa la lupa y el microscopio con una cámara clara<sup>21</sup>, que permite ver una imagen del ejemplar sobrepuesta a una hoja de papel adyacente, sobre la que se realiza el dibujo respetando las proporciones. Hay que tener en cuenta que, en el caso de la lupa, la imagen procede de uno solo de los oculares, por lo que el ejemplar debe inclinarse un poco para que quede alineado con el eje de observación. El dibujo se realiza con lápiz y es muy común que solo abarque una parte del individuo. Luego habrá que ensamblar los dibujos parciales sobre una hoja común, calcando sobre una mesa de luz. No debe olvidarse colocar una regla o un pedazo de papel milimetrado bajo la lupa y con el mismo aumento, para así contar con una escala fiel.

<sup>21</sup> A falta de cámara clara, se puede emplear un ocular con cuadrícula, que facilitará mantener las proporciones al dibujar a mano alzada sobre un folio con una cuadrícula equivalente.





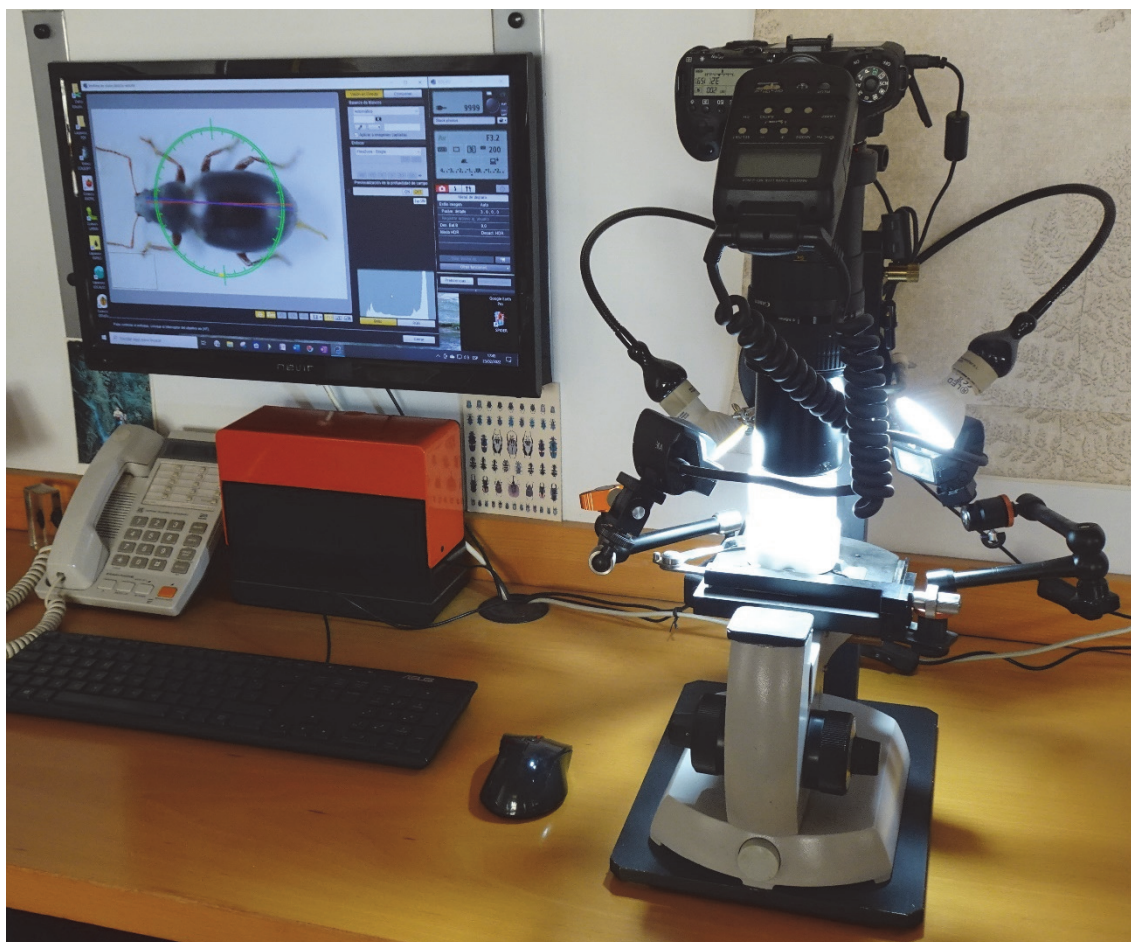
**Fig. 20.** Pasando el dibujo de una genitalia a tinta china sobre una mesa de luz

El dibujo ensamblado lo paso luego a tinta china en papel vegetal sobrepuesto, utilizando rotuladores del número 0.3 y 0.6, o si es de tamaño muy grande (DIN A2) del número 0.4 y 0,8 ya que luego hay que reducirlo mucho a la hora de publicar. El nuevo dibujo se transfiere al ordenador escaneándolo a 600 dpi en blanco y negro. Luego, con la ayuda de un programa gráfico (Adobe Photoshop, p. ej.) se dan los últimos retoques, se limpia lo superfluo, se dibuja la escala y se introducen las demás anotaciones necesarias para la leyenda (trabajar con capas). También se pueden combinar varios dibujos para formar una lámina compleja. El acople de la imagen y reducción al tamaño definitivo de publicación se hace al final del todo (mantener entre 600 y 1200 bpi), reservando siempre un archivo maestro, con las capas y la definición original.

### **Fotografía por apilamiento**

La fotografía digital ha abierto las puertas a las imágenes generadas por apilamiento (stack-photography) empleando un software especial, lo que elimina el problema de la profundidad de campo que padecía la macrofotografía convencional. En el mercado hay ya un arsenal de cámaras digitales adaptables al microscopio o a la lupa binocular (triocular, en este caso).

Yo prefiero usar una cámara digital convencional full-frame (Canon EOS 6D) que tengo destinada exclusivamente a este fin. Está montada en un sólido pedestal sobre una regleta que permite ganar o acortar distancia de trabajo y luego queda firmemente atornillada para evitar la más mínima vibración. Uso un objetivo macro especial (Canon MPE65) que cubre el rango de aumentos 1–5×, lo que evita el estar añadiendo o quitando anillas de extensión o tener que usar un fuelle con un objetivo normal.



**Fig. 21.** Equipo para fotografía por apilamiento. Cámara réflex con macroobjetivo montada sobre pedestal y pie de microscopio (cortado) con plataforma móvil por micrómetro. Iluminación focos led o flash. Se opera desde el ordenador.

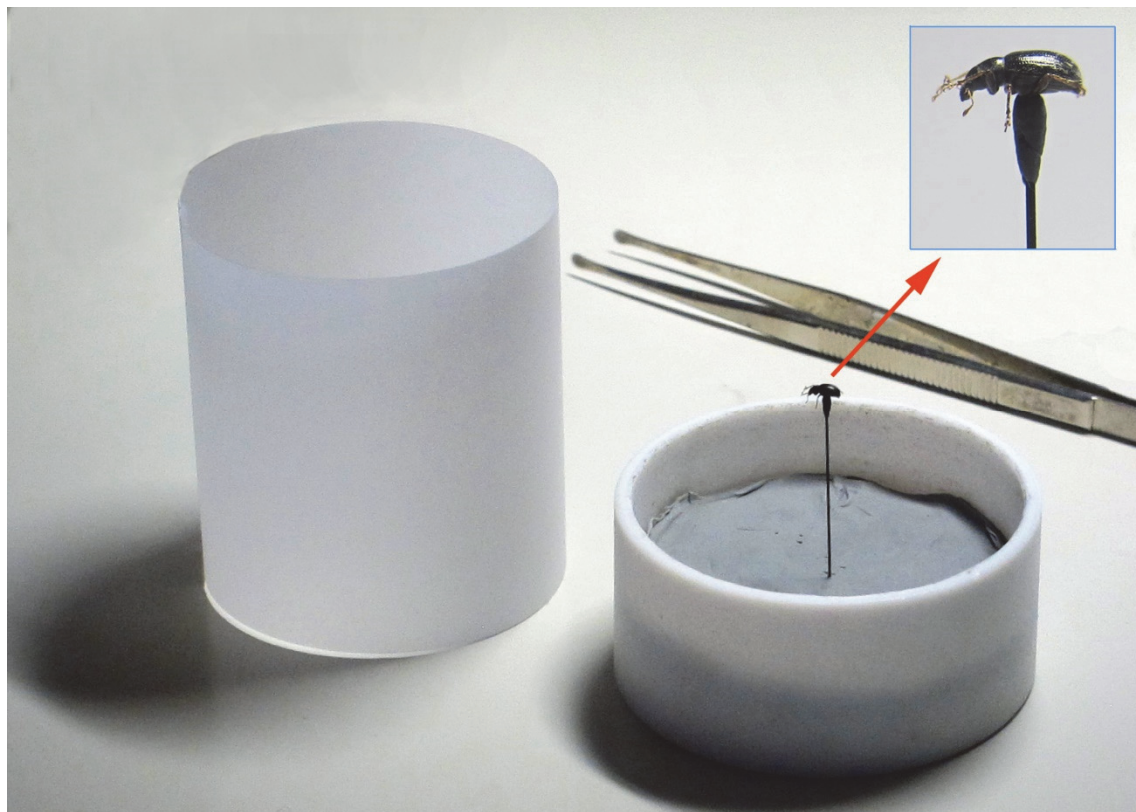
El ejemplar por fotografiar se sitúa debajo en un pequeño artilugio que se describe más adelante (Fig. 19), depositado sobre la plataforma de un viejo microscopio que dispone de micrómetro para desplazarla en la vertical, y cuyo tubo de observación he cortado para que no moleste. Así, girando el micrómetro manualmente, se puede acercar o alejar el ejemplar progresivamente a medida que se van disparando fotos sucesivas. Las micras de avance o retroceso dependen del aumento empleado, ya que mantengo el diafragma de la cámara siempre en 3.2 (resultados óptimos). Es importante que la profundidad de enfoque obtenida en una imagen se solape un poco ( $1/3$  lo ideal) con la de la siguiente, lo que se consigue con la práctica. Nótese que en esta disposición es el objeto y no la cámara la que se mueve<sup>22</sup>. La cámara, una vez encendida y ajustado el primer enfoque, no se ha de tocar para nada.

Los ajustes requeridos y los disparos se hacen desde un ordenador anejo empleando el software de gestión de la propia cámara (EOS 6D Utility), configurada para trabajar con enfoque manual, apertura de diafragma fija y dejando que calcule el tiempo de disparo. El visor de la cámara hay que tenerlo tapado para que no entre luz parásita. La imagen se redirige a la pantalla del ordenador, lo

<sup>22</sup> Actualmente hay empresas que ya ofrecen railes motorizados para hacer fotos de apilamiento de modo automatizado (e.g. WeMacro). No son baratos, pero sí eficientes a la hora de hacer muchas fotos. Por lo general, es la cámara la que se desplaza.



mismo que los archivos de cada imagen tomada, a su disco duro. Un escarabajo de 10 mm puede requerir 50 imágenes o más.



**Fig. 22.** Caja de luz para fotografiar ejemplar adherido al extremo de un alfiler. El cilindro de papel se coloca en el soporte anular, donde encaja.

El artilugio porta-ejemplares (Fig. 22) consiste en una anilla de PVC o teflón (6,5 cm de diámetro) con el fondo tapado y relleno con 1 cm de plastilina gris (o blanca, si se prefiere). En paralelo, se dispone de varios cilindros<sup>23</sup> confeccionados con papel cebolla grueso (100-120 gr) cuyo diámetro es algo inferior para que encaje dentro del cilindro y actúe como difusor (caja de luz).

El ejemplar escogido —perfectamente preparado y limpio— se despegas de su cartulina con unas gotas de agua jabonosa (aplicada con una jeringuilla), y se deja secar sobre papel higiénico boca arriba. Si son grandecitos, se toca en el mesoventrito con un alfiler sin cabeza sobre cuyo extremo se ha colocado un poquitín de masilla adhesiva<sup>24</sup>, lo mínimo para que quede oculta bajo el ejemplar una vez se coloque derecho el alfiler. El ejemplar queda adherido, perpendicular al alfiler y con las patas al aire. De este modo no se producirán sombras en la foto como ocurriría de estar pegado sobre una cartulina. Luego se pincha el alfiler en el centro del disco de plastilina de modo que el ejemplar quede perfectamente horizontal. Después se añade el cilindro-difusor de luz, y el artilugio completo se traslada a la plataforma del microscopio, bajo el objetivo de la cámara. El encuadre se hace a mano con desplazamientos laterales o girando a voluntad.

<sup>23</sup> Las varias alturas de los cilindros (4, 6 y 8 cm) son para que queden próximos, pero no tropiecen con el objetivo de la cámara, ya que la distancia de trabajo se acorta a medida que se emplea más aumento.

<sup>24</sup> Se venden para adherir cuadros y láminas a las paredes, sin usar clavos. Por ejemplo: BricoFácil de Ceys o Pritt-MultiTack 55.





**Fig. 23.** Imagen de *Lema bilineata* Germar, 1823 tomada por apilamiento.  
Longitud 6,5 mm.

Si los ejemplares son muy pequeños (< 4 mm) se emplea un alfiler fino, también sin cabeza, cuyo extremo se ha doblado brevemente (1 mm) en ángulo recto. Esta parte se unta en pegamento hidrosoluble y se deja secar un poco antes de aproximarlo en vertical al ejemplar que reposa boca arriba, hasta que lo toque y quede adherido. Luego se procede igual que se ha descrito en el párrafo previo.

Para la iluminación empecé usando dos flashes, pero van igual de bien dos foquitos led de haz estrecho montados independientemente en tubos flexibles (cuello de cisne). Se apuntan sobre el difusor de luz, uno incidiendo desde las diez (un poco más cercano) y otro desde las cinco (algo más alejado), para conseguir un sombreado que refleje el volumen del insecto. Con el difusor de luz se pierde algo del brillo de los tegumentos, pero se gana en detalle y eliminan los destellos de la luz directa. Finalmente, se tomará una foto de una regla para disponer de la escala exacta a la que se trabajó.

Hay varios programas para apilar las secuencias de fotos (Zerene Stacker, por ejemplo). Los gratuitos no suelen tener capacidad para apilar cantidad de imágenes de mucho peso (3,5 Mb en JPG cada una) y se eternizan o colapsan.

La foto compilada —con el algoritmo PMax— se traslada luego a Photoshop o programa equivalente y se edita (balance de blancos, contraste, encuadre, remoción de ciscos, escala, etc.). Al final, la imagen (Fig. 23) acaba con un detalle asombroso y al observarla en pantalla a tamaño 1:1 es equivalente a ver el ejemplar bajo la lupa a gran aumento, pero con todo enfocado y más cómodo a la hora de trabajar con el zoom. Además, usando dos pantallas o dividiendo una en dos ventanas, se pueden enfrentar dos imágenes en paralelo y ello a gran aumento (para comparar detalles, por ejemplo).

Los ejemplares fotografiados conviene señalarlos mediante una etiqueta más que indique tal circunstancia y, eventualmente, el año o la fecha completa de cuando se fotografió.

## Base de datos

En la actualidad no hay excusa para que una colección entomológica que se precie no lleve aparejada una base de datos, aunque sea una simple tabla Excel con los campos requeridos. Por otro lado, existen programas informáticos más o menos complejos para gestionar colecciones científicas. Lo malo es que suelen estar pensados para grandes colecciones de instituciones (incorporan imágenes, sonidos, gestión de préstamos, información genética, cartografía, etc). Con todo, si uno va a empezar de cero no es mala opción evaluar algunos de los que son gratis y ver si se adaptan a nuestras necesidades, sin perderse en excesivas opciones. Cabe considerar: Specify, Papis, Taxis, Elysia (de GBIF España), etc.

Lo dicho, para una colección particular modesta basta con crear una tabla ad-hoc en Excel (Microsoft) o, si prefiere y se maneja con la informática, diseñar una base de datos relacional en Access (Microsoft) o dBase (dBase LLC), que le permitirá ir creciendo y complementarla a voluntad<sup>25</sup>. En mi caso sigo usando un sistema simple de registro único que gestiono tras haber configurado un viejo programa de bibliografía (Procite)<sup>26</sup> ya descatalogado, pero muy seguro y eficiente de cara a la edición. Los campos por registro son los siguientes (sirven igualmente para crear una hoja Excel):

Reg.	11128 [valor único, automático]
Género	<i>Philorhizus</i>
Especie & autor	<i>bravoorum</i> Mateu, 1957
Det.	A. Machado 2007
Región	La Gomera
Localidad	Hermigua: s. Ermita San Juan, 400 m
Coord.	28°09'41"N 17°12'15"W
Exx.	5+
(en etanol)	Box 12 /A-4 (3 exx)
Fecha	19-2-2007
Leg.	A. Machado
Colección	AMC
Notas	Vareando <i>Adenocarpus foliolosus</i> de noche
Familia	Carabidae

<sup>25</sup> Empezar con tres módulos básicos: especies, localidades y muestreos (fecha, número de ejemplares, colector), que se relaciona con los otros dos.

<sup>26</sup> También se pueden adaptar otros programas de gestión bibliográfica, como EndNote (Thompson Reuters), que tienen módulos de creación de grupos automáticos y manuales, lo que facilita grandemente la organización del trabajo (familias, ejemplares dudosos, material prestado, pendiente de secuenciar ADN, etc.).

Hay quien registra cada ejemplar por separado (base de datos mucho más grande) y quien registra la serie capturada en una misma localidad y fecha (ejemplo previo). En este último caso el signo + en Exx. señala que hay más ejemplares en alcohol, o si se añade un número entre paréntesis (p. ej. Exx. 5 (12)), revela el material que hay guardado sin preparar. Si luego se quiere individualizar un espécimen concreto (voucher de ADN, por ejemplo) se le añade una letra al número de registro (p. ej. 11128a). En el campo Notas se indicará si se trata de holotipos, paratipos, etc. También se puede crear un segundo modelo de registro (Workform) con campos añadidos, por ejemplo, para indicar la ubicación de los ejemplares, introducir las referencias a secuencias de ADN, o las propias secuencias, etcétera. Es práctico que el campo “Familia” actúe como palabra clave.

## Comercios entomológicos

La oferta de artilugios específicos para la captura de insectos, de instrumentos para su preparación y de opciones de almacenaje es en la actualidad pasmosa y quizás algo abrumadora. Aunque el entomólogo novel suele iniciarse fabricando su propia instrumentación, recomiendo que eche un vistazo a los catálogos online disponibles en la mayoría de comercio especializados. Véase una selección de ellos:

<https://www.bioform.de/>

<https://www.bioquip.com/>

<https://entomopraxis.com/>

<http://www.insectnet.eu/>

<http://www.entosphinx.cz/en/>

<https://www.omnesartes.com/en/>

<https://www.watdon.co.uk/>



## Referencias y bibliografía selecta

- Alvarez-Padilla, F. & Hormiga, G. 2008. A protocol for digesting internal soft tissues and mounting spiders for scanning electron microscopy. *The Journal of Arachnology* 35 (2007): 538-542.
- Benítez Morera, A. 1936. *Manual de Entomología, especialmente referido a la caza, preparación y conservación de los insectos y demás artrópodos*. Espasa-Calpe, S.A. Madrid. 168 pp.
- Beirne, B. P. 1955. Collecting, preparing and preserving insects. Canada Department of Agriculture, Entomology Division. Pub. 923. 133 pp.
- Colas, G. 1947. *Préparation et conservation des collections d'insectes*. Paris: Editions de l'Entomologiste, 79 pp.
- González Peña, C. F. 1997. La preparación de coleópteros. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 18: 53-56.
- Harrison, J. 2012. Cleaning and preparing adult beetles (Coleoptera) for light and scanning electron microscopy. *African Entomology* 20: 395-401.
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S. y de Waard, J., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B* (270): 313-321.
- Krogmann, L. & Holstein, J. 2010. Preserving and specimen handling: insects and other invertebrates. *ABC Taxa* 8(1): 463-481.
- Márquez Luna, J. 2005. Técnicas de colecta y preservación de insectos. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 37: 385-408.
- Oldroyd, H. 1970. *Collecting, preserving and studying insects*. Hutchinson Scientific and Technical. London. 336 pp.
- Smart, J., Cogan, M. B. & Smith, K. G. V. 1974. *Instructions for collectors No. 4a. Insects*. Trustees of the British Museum (Natural History). London. 169 pp.
- Upton, M. S. & Mantle, B. L. 2010. *Methods for collecting, preserving and studying insects and other terrestrial arthropods*. Vol. 3. Miscellaneous Publication. Australian Entomological Society. Canberra. 5<sup>th</sup> edition. 91 pp.
- Van Dam, M. H. 2014. A simple, rapid technique for the inflation of the endophallus, with particular focus on the Curculionoidea (Coleoptera). *The Coleopterists Bulletin* 68 (2): 263-268.
- Youdeowei, A. 1977. *A laboratory manual of Entomology*. Oxford University Press. Ibadan. 208 pp.