

UTILIZACIÓN DE LAS AGAROSAS EN ENTOMOLOGÍA

Francisco de la Torre

C/ Miranda 14,1º A .09002 Burgos (España) – eduredes@teleline.es

Resumen: Se dan instrucciones para la utilización de las agarosas en Entomología, dirigidas a la preparación y conservación de microartrópodos. Se indica también su utilización en la evaginación y conservación de las genitalias, con ejemplos de aplicación a los géneros *Rhizotrogus*, *Amphimallon* e *Iberodorcadion*, y asimismo se dan referencias para el mejor conocimiento de la agarosa, gel de origen vegetal marino.

Palabras Clave: *Rhizotrogus*, *Amphimallon*, *Iberodorcadion*, entomología, genitalias, agarosas.

Utilization of agaroses in Entomology

Abstract: Instructions are given for the use of agaroses in entomology, aimed at the preparation and preservation of microarthropods. Their use is also indicated in the evagination and preservation of genitalia, with examples applied to *Rhizotrogus*, *Amphimallon* and *Iberodorcadion*, and references are also given for a better knowledge of agarose, a gel of marine vegetable origin.

Key Words: *Rhizotrogus*, *Amphimallon*, *Iberodorcadion*, entomology, genitalia, agarose.

Introducción

Todos conocemos las dificultades que se presentan cuando hay que realizar el estudio de la morfología externa de muchos microartrópodos, sobre todo cuando hace tiempo que están conservados en líquidos como el alcohol-agua-glicerina con diferentes concentraciones, ácido láctico con tetraborato sódico, líquidos de Hoyer, Marc André, Gisin etc. si previamente no han sido convenientemente preparados, entre porta y cubreobjetos, con Eukitt, Bálsamo de Canadá, Euparal, DMHF, etc.

En la observación de microartrópodos conservados sumergidos, el estudio puede complicarse, ya que normalmente la mayoría de ellos están provistos de apéndices muy delicados, como antenas, setas, patas, alas, etc. que se desprenden con gran facilidad durante las manipulaciones posteriores, aunque es frecuente que los ejemplares hayan sido desmembrados y preparados por partes, es decir, patas por un lado, alas por otro etc. entre porta y cubre.

Ello se debe principalmente a que después de la muerte y sumergidos en los líquidos conservantes, los miembros se repliegan y quedan totalmente encogidos, y para su estudio deben ser manipulados con gran peligro de rotura. En otras ocasiones, en las preparaciones realizadas, aparecen roturas durante el secado de los medios utilizados. Aunque éstas no aparezcan, la posibilidad de recuperar en buenas condiciones cualquiera de estas especies, es bastante reducida, y además normalmente se encuentran aplastadas si no hemos usado los separadores apropiados. En otras ocasiones, los insectos son de mayor tamaño, pero que tienen sus cuerpos tan blandos que deben ser conservados sumergidos para evitar la retracción de sus abdómenes o encogimientos por secado, como es el caso de los arácnidos, bastantes dípteros, y muchos otros insectos.

En BARRIENTOS (1988) se muestran numerosos procedimientos con los que actualmente se realizan estas preparaciones. Sin embargo, se echa de menos un medio que permita la colocación de ejemplares enteros y con sus apéndices bien situados, de tal modo que no se muevan y queden protegidos, y sobre los cuales puedan hacerse observaciones desde cualquier ángulo sin peligro de roturas; también es deseable que el método utilizado permita la rápida y fácil recuperación de la muestra, en no más de 15 minutos, cuando sea necesario.

En el presente artículo se muestra una técnica que aparentemente cumple con estos requisitos. Se trata de una disolución de agarosas en agua y glicerina, a la que añadimos un potente conservante muy estable. La agarosa es un gel bastante rígido, de origen vegetal, fracción muy purificada del agar-agar industrial que se extrae de ciertas algas marinas. Es también el nombre genérico de una serie de productos derivados de ella, con diferentes propiedades, según los usos a los que están destinadas. Sus disoluciones son incoloras, y por enfriamiento forman geles, muy transparentes en pequeños espesores, en los que se mantienen en un estado excelente las preparaciones que se incluyen en ellos. Véase la tabla de propiedades de algunas de ellas en el artículo de MAGRO & TORRE (2002). En dicho trabajo, también se da información sobre sus principales aplicaciones, y la fórmula para su empleo en la inyección de genitalias evaginadas de lepidópteros.

Uso de Agarosa G y Agarosa I

Nuestro conocimiento de las agarosas, tras haber trabajado en esta industria durante unos treinta años, y después de más de tres dedicados a sus aplicaciones a la entomología, nos ha permitido llegar a la formulación de dos productos: *Agarosa G* utilizado en la inyección de genitalias de lepidópteros para su posterior conservación en seco o en húmedo y *Agarosa I* desarrollado para la inclusión de microartrópodos, con tegumentos blandos o no, conservados en húmedo o entre porta y cubre con separadores. Estas preparaciones, son sumergidas después en un líquido conservante. Las fórmulas correspondientes son:

AGAROSA I (Para inclusiones en gel)

Agua desionizada	50 ml
Glicerina (densidad 1,26)	20 ml
Agarosa TYPE 1B (De SIGMA)	1 g
Agarosa TYPE 9A (De SIGMA)	4,5 g
Urea en perlas	38 g
Cloruro de cetilpiridina	0,02g
TOTAL (aprox.)	100 ml

Para conservar sumergidos estos geles, con las preparaciones o ejemplares incluidos, debe utilizarse el siguiente líquido:

PREPARACIÓN DE CONSERVACIÓN I

Agua desionizada	71,5 ml
Glicerina (densidad 1,26)	28,5 ml
Cloruro de cetilpiridina	0,02g
TOTAL	100 ml

La composición de la agarosa G, para la inyección en genitales evaginadas, fue tratada en MAGRO & TORRE (2002):

AGAROSA G (Para la inyección y mantenimiento en húmedo o en seco de genitales evaginadas)

Agua desionizada	45 ml
Glicerina (densidad 1,26)	55 ml
Agarosa TYPE 1B	2,5 g
Agarosa TYPE 9A	1,5 g
Cloruro de cetilpiridina	0,02 g
TOTAL (aprox.)	100 ml

PREPARACIÓN DE CONSERVACIÓN G

Agua desionizada	45 ml
Glicerina (densidad 1,26)	55 ml
Cloruro de cetilpiridina	0,02 g
TOTAL	100 ml

Las temperaturas de fusión y gelificación de ambas agarosas, son las siguientes:

Tipo de Agarosa:	Temperatura de	
	fusión	gelificación
I con urea	Desde 45 a 60 °C	5 °C (18 °C)
I sin urea	Desde 65 a 77 °C	Desde 45 a 35 °C
G	Desde 75 a 85 °C	Desde 48 a 38 °C

La explicación de la tabla es la siguiente: Cuando el gel se calienta, llega un momento en que comienza a fundirse, se ablanda y finalmente se hace líquido viscoso. Lo mismo ocurre cuando el líquido se enfría. De ello resulta que estos geles pueden ser manejados en estado líquido en un amplio margen de temperaturas (ver más adelante). La urea, que puede añadirse a la agarosa I para facilitar su uso, una vez que ha gelificado, debe eliminarse mediante lavados del gel, al objeto de elevar las temperaturas de fusión y gelificación, y reducir además su fuerte presión osmótica. Si la agarosa I se conserva con la urea por debajo de 19 °C, terminará por gelificar también al cabo de unos días.

Para manejar con comodidad la agarosa I, recomendamos guardarla en jeringas de 10 ml de capacidad, desde las cuales, estando líquida, es muy fácil obtener las gotas necesarias en cada caso. De este modo se evitan pérdidas por manejo con varillas y contaminaciones exteriores. También se utilizan las jeringuillas especiales en la inyección de insulina, con las agujas más finas. Éstas son rellenas hasta la mitad por detrás, quitándoles el émbolo previamente y expulsando después todo el aire. Con las agujas cortadas, dejando sólo unos 10 mm, se pueden dosificar muy bien las cantidades necesarias. Para fundir la agarosa, si está gelificada, debe mantenerse la jeringa introducida en agua a más de 60 °C hasta algo más del nivel de la agarosa, durante unos 10 o 15 minutos y sin el capuchón protector de la aguja. Las jeringuillas hay que calentarlas no menos de 15 segundos a la misma temperatura. Una vez fundida, si ésta no baja de los 20 °C, se mantendrá en estado líquido indefinidamente.

Respecto a la agarosa G, también puede usarse una jeringa de 10 ml para el almacenamiento, a la que debe extraérsele con unos alicates la aguja del porta-agujas plástico de sujeción. Fundiendo a continuación ligeramente el extremo libre de este porta agujas, se obtiene el tapón para cuando se almacene o sea necesario fundirla al baño María, a unos 85 °C durante unos 15 minutos. Con la agarosa fundida, se llena hasta algo más de la mitad y por la parte posterior, las jeringuillas de insulina, como se ha indicado previamente, sacando para ello sus émbolos. Éstas serán usadas para realizar las inyecciones a las genitales, una vez

evaginadas. El bisel de estas agujas debe ser cortado, lijado y redondeado, a fin de evitar contratiempos a la hora de introducir las en dichas genitales, como se indica en MAGRO & TORRE (2002).

Como datos orientativos, con 10 ml de la agarosa G, es posible preparar cerca de mil inyecciones destinadas a genitales de Noctuidos. Para realizar las inclusiones, con 10 ml de la agarosa I se pueden realizar unas 100, dependiendo del tamaño de los bloques de gel.

Las disoluciones de agarosas, tienen una gran diferencia entre sus temperaturas de fusión y gelificación. Se le llama precisamente "histéresis de fusión-gelificación", y es lo que permite su manejo en estado de líquido viscoso entre unos amplios márgenes de temperaturas. Dependiendo del tipo, resultan: de 85 °C hasta 38 °C para la G, cuando es fundida para inyectarla en genitales evaginadas, y de 60 °C hasta 5 °C para la I destinada a inclusiones. Ambas, en forma de gel, tienen una resistencia muy apreciable.

La "memoria de hidratación" es otra propiedad muy importante de estos geles, los cuales se comportan como una esponja. Consiste en que una vez que han gelificado, los puntos de unión entre sus moléculas se mantienen aunque se produzca una pérdida de líquidos por evaporación o presión. Esto significa que la malla tridimensional que forman al gelificar, se encogerá o deformará, pero manteniendo sus uniones originales. Si a este gel encogido o deformado se le suministra de nuevo agua-glicerina, las irá absorbiendo poco a poco hasta retomar de nuevo la forma y volumen que tuvieron al gelificar. Por evaporación solo habrá pérdida de agua, y por presión será de ambos líquidos.

El alto contenido en glicerina de la agarosa G, permite mantener sin sumergir, es decir al aire, las genitales inyectadas. También contribuye a darles más transparencia. No obstante, debemos indicar que en ambientes muy húmedos o muy secos, dichas preparaciones pueden absorber o evaporar pequeñas cantidades de agua, manteniendo siempre sus formas originales. No obstante, si van a utilizarse sobre ellas mediciones precisas, es aconsejable que previamente (una hora antes) se sumerjan en la preparación G que hemos indicado más arriba.

Las genitales que se van a conservar al aire, una vez expandidas con la agarosa G, son insertadas en filamentos apropiados de polipropileno, nylon, fibra de vidrio etc. de unos 20 a 25 mm de longitud, y 0,2 a 0,4 mm de diámetro, según el orificio donde se van a insertar, teniendo el cuidado de poner después un poco de cola plástica de carpintero o de polivinilo, para unir el filamento con la genitalia, ya que la agarosa es un gel que no tiene propiedades adhesivas. Después, estas fibras pueden ser pegadas a un alfiler, o directamente a su correspondiente etiqueta, o bien clavadas en un pequeño trozo de Icolén u otro plástico expandido y éste a su vez en la aguja del insecto. También pueden ser guardadas dentro de pequeños frascos, pegando el extremo de estas fibras en la parte interior del tapón.

Otra opción consiste en mantener todas las preparaciones hechas con agarosa, sumergidas, sin fibras insertadas. Para ello se pueden usar pequeños viales (frascos) de cristal con tapa roscada, de cuatro o cinco ml de capacidad, llenos hasta la mitad de las preparaciones G o I, según la agarosa que se ha utilizada. Sus transparencias permiten la observación con lupa desde cualquier ángulo, sin necesidad de sacarlas. De este modo quedan más protegidas y no se producen variaciones en sus dimensiones.

No obstante, todas las preparaciones pueden ser extraídas de sus envases. Para ello es recomendable utilizar una microcucharilla o espátula. Una vez en el porta, añadir unas gotas de su líquido de inmersión. Las pinzas no deben usarse, ya que estos geles, aun cuando son bastante duros, no soportan la presión que puede ejercerse con ellas. En el caso de las genitales inyectadas, las pinzas solo deben utilizarse en puntos concretos donde no exista relleno de agarosa.

El cloruro de cetilpiridina es un potente conservante muy estable, que evitará el posible deterioro por hongos y bacterias.

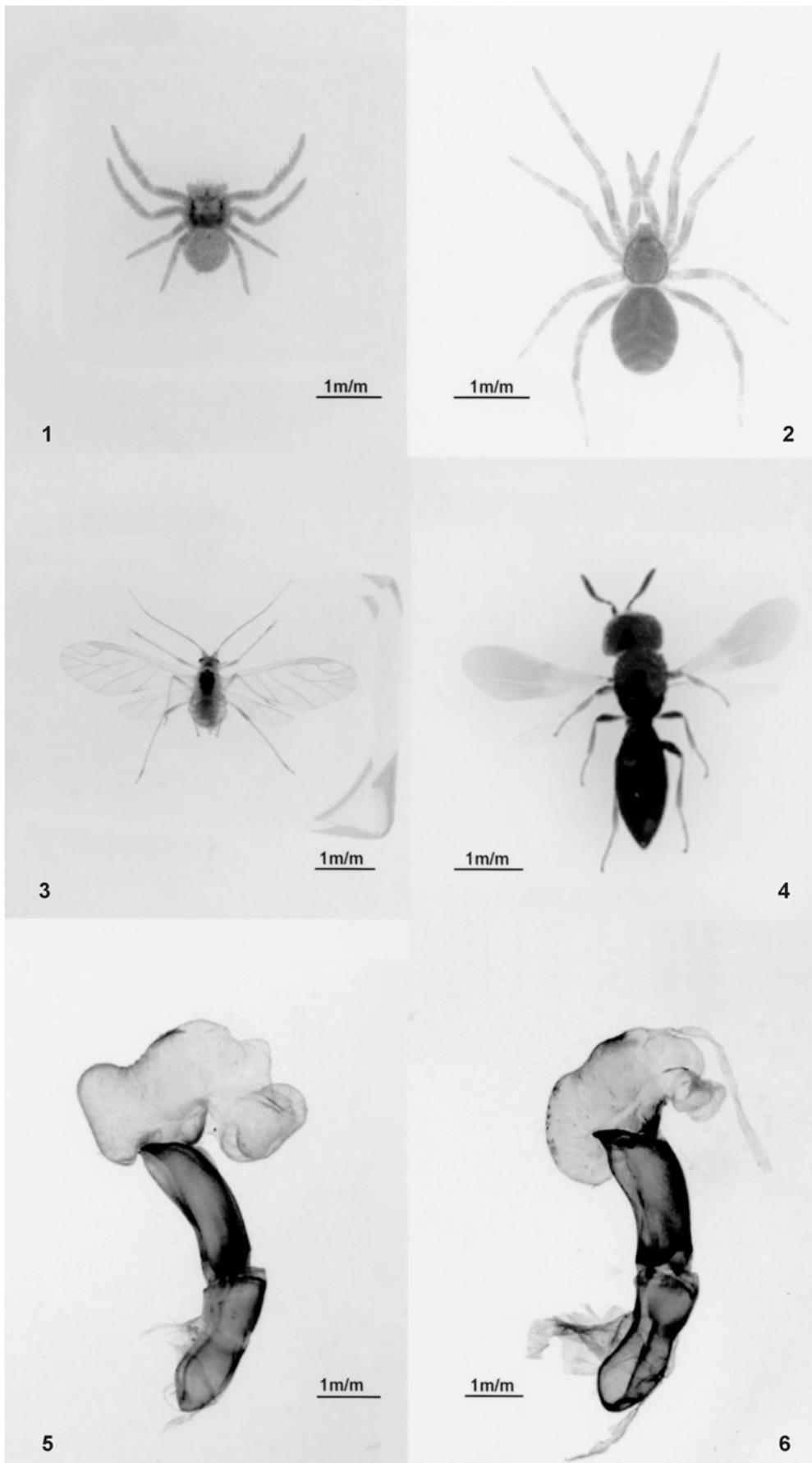


Fig. 1 y 2. Arácnidos Tomisidae y Araneae. **Fig. 3.** Hemíptero Aphididae. **Fig. 4.** Himenóptero Proctotrupidae. **Figs. 5 y 6.** Edeago evaginado y en visión lateral derecha de los escarabeidos *Amphimallon pini* Olivier, 1789 (5) y *Amphimallon solstitialis* Linnaeus, 1758 (6).

Pueden utilizarse otros conservantes, como la azida sódica, si tampoco tienen reacción sobre la agarosa, colorantes y tejidos. Aconsejamos hacer pruebas previamente.

Respecto a la urea, tiene una función temporal. Este producto, y algunos más, llamados caotrópicos, tienen la particularidad de apoderarse de protones cuando están en disolución. Ello se traduce a nuestros efectos, en la alteración de las temperaturas de fusión y gelificación de las disoluciones de agarosa, que es debida a la fuerza de unión de sus moléculas por puentes de hidrógeno (protones) y a sus enroscamientos en hélice. Al eliminar esta urea por diálisis (lavados) de las inclusiones, se establecen nuevas uniones, causa de la elevación de las temperaturas de gelificación y fusión.

Debe indicarse que con las agarosas no pueden utilizarse alcoholes concentrados (la glicerina es una excepción) ni ácidos. Los primeros la precipitan, y los segundos la despolimerizan con pérdida de su fuerza para formar gel.

El agua desionizada indicada anteriormente, es la que actualmente se vende en botellas de plástico en los supermercados, para las planchas de ropa y para rellenar las baterías de vehículos. Equivale al agua destilada.

El presente estudio está basado en la preparación de poco más de 500 genitalias, que hemos evaginado e inyectado, de las cuales 21 pertenecen a tres especies del género *Amphimallon* Berthold, 1827, 46 a siete del género *Rhizotrogus* Berthold, 1827, y 56 a tres del género *Iberodorcadion* Breuning, 1943. El resto pertenecen en su gran mayoría a noctuidos, y las diferencias que hemos encontramos en estos órganos, salvo escasísimos casos como *Euxoa crypta* (Dadd, 1927) y *Euxoa tritici* (Linnaeus, 1761), en que dichos edeagos son muy parecidos, permiten diferenciar cada especie con gran facilidad.

Antes de terminar este apartado, hay algunos datos importantes a consignar. Las agarosas en polvo, tal como se comercializan, dan los mismos resultados de análisis después de treinta años de almacenamiento. Con anterioridad a esta fecha no se fabricaba este producto en España. Por tanto, la duración de estas preparaciones debe de ser muy larga. A modo de prueba se ha mantenido desde hace tres años, en un pequeño vaso de precipitados, un trozo de la agarosa G sumergida en el líquido conservante, sin tapar, es decir al aire, y hasta la fecha solo se aprecian muy pequeños cambios en el volumen del líquido de inmersión, según la humedad ambiental.

Preparación de las inclusiones de microartrópodos

Colocar en el centro de un portaobjetos una gota de agarosa I. Con la punta de un pincel fino o de una aguja enmangada, tocar ligeramente la gota y a continuación al insecto o artrópodo que deseamos preparar, que quedará pegado y podrá ser fácilmente trasladado, bajo la lupa binocular, hasta el centro de la gota. Una vez que se ha pegado a ella, con una aguja enmangada roma se sumerge suavemente, y también con suavidad se empiezan a situar bien sus apéndices. Si es necesario se añaden unas gotas más, según el tamaño del artrópodo, hasta que quede ligeramente cubierto, pero es preferible utilizar la menor cantidad posible. Es muy conveniente humedecer antes con alcohol muy rebajado (50%) los ejemplares que deseamos incluir, para evitar la aparición de burbujas de aire en sus tegumentos.

Al colocarlos en la gota de agarosa, si es que estaban vivos, la viscosidad impedirá sus movimientos, y morirán rápidamente. Las pequeñas burbujas de aire, o partículas que pueden quedar adheridas o sueltas en esta agarosa, pueden ser arrastradas lentamente al exterior, con la punta de la aguja enmangada.

Una vez situados todos los apéndices en los lugares deseados, colocar este portaobjetos en posición horizontal, en el congelador de un frigorífico, en el que debe permanecer un par de horas. Con ello se consigue que la gelificación de la agarosa, que ya no volverá a fundirse hasta que su temperatura sea de unos 60

°C. Al sacar el porta debe comprobarse que efectivamente se ha formado el gel, presionando ligeramente un lateral de la agarosa. Debe estar elástica, no pegajosa. Si el insecto mantiene sus apéndices bien colocados, debemos ahora eliminar la urea por diálisis, utilizando para ello la preparación I, con lo que se elevará sus temperaturas de fusión y gelificación, y el gel ganará en rigidez.

En muy pocas ocasiones puede llegar a ocurrir que por evaporación de parte del agua, la urea cristalice, quedando la preparación de color blanco opaco. Sin embargo, al eliminar la urea en el paso siguiente desaparece el problema.

La diálisis o lavado se realizará del siguiente modo: A temperatura ambiente, se introduce el porta-objetos con la preparación gelificada, en un vaso pequeño o tubo grueso y en posición más o menos vertical. Se añade con precaución la preparación I hasta cubrir ligeramente el gel. Debe dejarse en diálisis no menos de dos horas. Con esto se eliminará prácticamente toda la urea y se obtendrá un gel más duro, que tendrá incluido al insecto. Sólo queda recortar el bloque de gel formado, a las dimensiones deseadas, con una cuchilla para obtener bordes rectos, y guardarlo en el vial apropiado, lleno hasta la mitad con nueva preparación I, y con su correspondiente etiqueta. La eliminación de la urea, es decir la diálisis o lavado del gel, debe hacerse lo más pronto posible, ya que su alta concentración puede producir que en insectos muy blandos, aparezcan contracciones debidas a las diferentes presiones osmóticas dentro y fuera de ellos. En ciertos casos, puede ser conveniente la inyección de esta agarosa, directamente al interior de los abdómenes, a veces excesivamente blandos, una vez que han quedado incluidos y vemos que se han deprimido. Para ello deben usarse agujas muy finas con las puntas sin modificar, y la agarosa I utilizada deberá estar líquida. De realizar este relleno, deberá ser anotado en el archivo de datos.

Si después de la gelificación en el congelador, el insecto no ha mantenido sus apéndices como deseamos, debemos eliminar la agarosa, fundiéndola en un tubo que contenga unos tres o cuatro ml de agua, calentándolo a unos 65 °C durante unos diez minutos. Colocar al insecto recuperado de nuevo en el porta, secar bien el líquido con papel absorbente y añadir de nuevo la gota de agarosa I, repitiendo el proceso que indicado mas arriba. Véanse las Figs. 1 a 4, que corresponden a inclusiones. Estas preparaciones pueden ser observadas a la lupa estando en el interior de sus frascos, pero si se desean sacar para fotografiar o hacer mediciones, etc., el bloque de gel debe ser manejado con una microcucharilla o espátula, como se ha indicado previamente. Para recuperar a los insectos incluidos en los geles con la urea ya eliminada, deben ponerse en un tubo con unos cuatro o cinco ml de agua y calentarlo durante unos diez o quince minutos a unos 85 °C.

Evaginación y llenado de los edeagos de *Amphimallon* y *Rhizotrogus*

Sobre la evaginación y preparación con euparal, o llenado con silopreno de las genitalias de noctuidos, y en general de los lepidópteros, existe ya una amplia bibliografía; véase para ello las referencias señaladas En MAGRO (1994) y MAGRO & TORRE (2002). Respecto a su aplicación a coleópteros, no parecen existen antecedentes, aunque son numerosas a referencias al estudio de sus edeagos sin producir ni llenar estas evaginaciones. Existen sin embargo llamadas de atención al respecto como por ejemplo BARAUD (1977), MARTÍN-PIERA (1985 y 1986), y una muy buena aproximación en COCA-ABIA & MARTÍN-PIERA (1998).

Durante 1999 fueron preparadas diversas genitalidad de Melolonthini procedentes de nuestra colección e identificados a partir de las claves de BÁGUENA (1967), MARTÍN-PIERA (1985, 1986), BARAUD (1977) y PAULIAN & BARAUD (1982). En las dos últimas aparecen los dibujos de sus edeagos, y a la vista de ellos se procedió a la extracción de las genitalias, con el fin de comprobar las determinaciones realizadas.

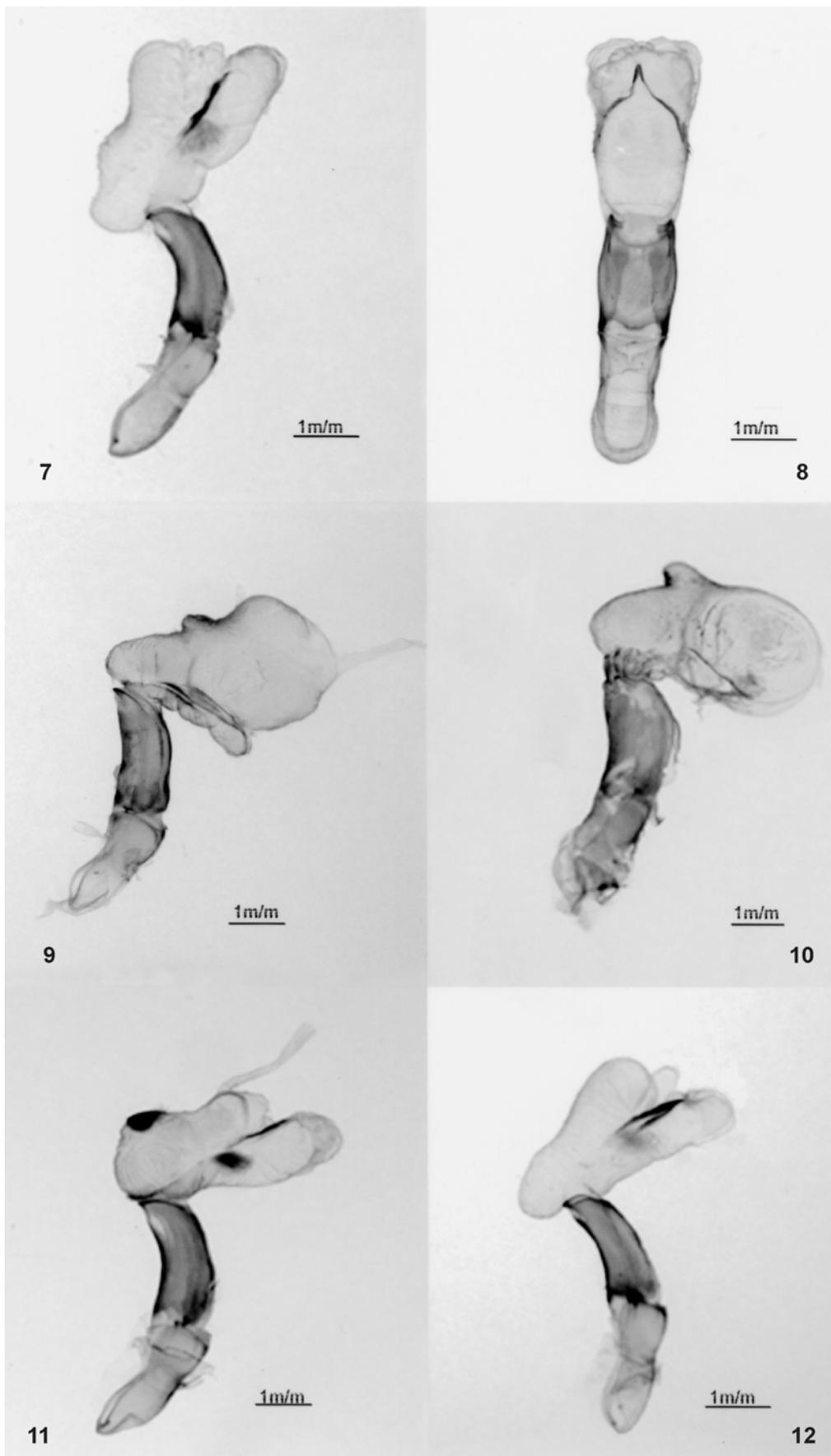


Fig. 7-12. Eedeagos evaginados de Escarabeidos: *Rhizothrogus camerosensis* Báguena Corella, 1955, en visión lateral derecho (7) y dorsal (8). **Figs. 9.** *Rhizothrogus marginipes* Mulsant, 1842. **Fig. 10.** *Rhizothrogus mascarauxi* Desbrochers, 1895. **Fig. 11.** *Rhizothrogus cicatricosus* Mulsant, 1842. **Fig. 12.** *Rhizothrogus monticola* Blanchard, 1859 en visión lateral derecha.

Para la realización de las extracciones, se ha seguido el siguiente procedimiento: Utilizando un líquido preparado con agua y un detergente (5%), se inyectó y llenó el abdomen de los ejemplares macho. Después de media hora a temperatura ambiente, apoyando la punta de una aguja enmangada en el borde inferior del pigidio, desde el lado ventral, se procedió a su apertura, extrayendo con unas pinzas finas el edeago junto con otros restos abdominales.

Para su limpieza, se introdujo en un tubo con unos tres o cuatro ml de hidróxido potásico al 10 % (tal y como se hace con los noctuidos), manteniéndolo unos treinta minutos a 85 ° C. Pasado este tiempo, y después de agitar el tubo enérgicamente, se añadieron un par de gotas de alcohol isopropílico para eliminar las espumas. La genitalia fue pasada a otro tubo, en el que ha sido lavada dos veces con unos cinco ml de agua desionizada caliente, y colocada en una pequeña cubeta o placa excavada, donde fue coloreada muy ligeramente con negro de clorazol E. A continuación, se procedió al cambio de agua, y añadiendo un par de gotas de agua-glicerina, se procedió a su observación bajo lupa, apareciendo el edeago completamente limpio, acompañado de restos de otros conductos y órganos internos, prácticamente limpios también.

Todas las membranas y conductos que aparecen por el ostium de la falobase fueron eliminados (ver página 23 de COCA-ABIA & MARTIN-PIERA, 1998). Lo poco que aún quedó de ellos fue introducido en su interior.

A la vista de los resultados se pensó en la posibilidad de realizar en estos insectos una evaginación similar a la utilizada con lepidópteros. En ellos también existe un delgado conducto, el ductus ejaculatorius, que antes de la evaginación aparece también por el extremo posterior del edeago, como se indica en MAGRO & TORRE (2002).

El procedimiento utilizado para evaginar es el siguiente: Bajo la lupa, se introduce ligeramente, por el ostium de la falobase, la punta lijada y redondeada de una aguja de 0,4 mm de diámetro de una jeringa cargada de agua. El tegmen o edeago debe poder ser sostenido en el aire colocado en dicha aguja. A continuación se eleva el sistema óptico de la lupa para poder colocar y ver el dedo índice de la mano izquierda, en el que se apoya el edeago sostenido suavemente entre el dedo y la aguja. Manteniendo una pequeña presión, se procede a inyectar el agua hasta producir la evaginación del endofalo. Ésta debe realizarse lentamente mediante pequeñas presiones. Es muy conveniente colocar frente a la aguja, y apoyado en la columna de la lupa, un plástico, para recoger la genitalia en caso de que la presión ejercida al inyectar la hiciera salir despedida. Este proceso, que parece complicado, resulta sumamente sencillo después de realizado un par de veces. Sin embargo, debe aclararse que en ocasiones no ha sido posible conseguir una buena evaginación por diversas causas, entre ellas, por ejemplo, la imposibilidad de conseguir un buen ablandado de las membranas internas, que en ocasiones están muy sucias. Si éste es su aspecto después de los tratamientos con potasa y los lavados, conviene dejarla con agua-detergente hasta el día siguiente, antes de proceder a la evaginación.

Una vez conseguida ésta, se vuelve a realizar un lavado, después una ligera tinción, y a continuación se procede a inyectar la agarosa G, que debe tenerse preparada en la jeringuilla para insulina, con aguja de 0,3 mm de diámetro, calentada inmediatamente antes a baño María, a unos 85 ° C, bastando para ello unos quince segundos. Recordamos que el bisel de esta aguja, debe estar también cortado y redondeado. Antes de la inyección debe comprobarse que la agarosa de la jeringuilla no contiene burbujas de aire. La aguja debe introducirse con cuidado, lo más al fondo posible del endofalo, buscando, si las hay, las burbujas de aire del interior, para que al ir entrando la agarosa, dichas burbujas vayan retrocediendo hacia el exterior. Se termina la inyección cuando la agarosa comienza a salir por el ostium de la falobase, retirando entonces poco a poco la aguja hasta su liberación del edeago, el

cual debe hacerse caer en un pocillo, que contenga unas diez gotas de la preparación G a temperatura ambiente para dejarla gelificar. El endurecimiento o gelificación comienza en unos minutos.

Si la inyección de la agarosa no ha dado buenos resultados, colocar el edeago en un tubo que contenga unos cuatro o cinco ml de agua y calentarlo unos diez minutos a unos 85 ° C. Agitando un poco, la agarosa introducida habrá fundido y se disolverá, después de lo cual procederemos a realizar una nueva inyección.

En las Figs. 5 y 6 pueden verse los resultados con *Amphimallon pini* Olivier, 1789 y *Amphimallon solstitiale* Linnaeus, 1758, este último con un trozo del conducto seminal, que también ha quedado evaginado. En las Figs. 7 a 12, las dos primeras corresponden a *Rhizotrogus camerosensis* Báguena, 1955; las cuatro restantes pertenecen a las especies *Rhizotrogus marginipes* Mulsant, 1842, *Rhizotrogus mascarauxi* Desbrochers, 1895, *Rhizotrogus cicatricosus* Mulsant, 1842 y *Rhizotrogus monticola* Blanchard, 1859 respectivamente. En las Figs. 9 y 11 también se aprecia el conducto seminal evaginado.

En la Fig. 10 aparece el edeago del *Rh. mascarauxi* Desbrochers, 1895 con algunas roturas y por esta causa, mal evaginado. Ello ha impedido que las membranas inferiores, bajo la tigilla, se evaginen como en la Fig. 9, correspondiente a la especie *Rh. marginipes* Mulsant, 1842.

Iberodorcadion (Breuning, 1943)

El método descrito ha sido igualmente aplicado a representantes del género *Iberodorcadion* (Breuning, 1943) previamente clasificados con VIVES (1983). En estas especies, los resultados han tardado más en tener éxito, y en cierto modo consideramos los resultados como parciales. Ello es debido a que sus edeagos aparecen, en todos los ejemplares con los que hemos trabajado, totalmente invaginados (es el "saco interno" como se indica en HERNÁNDEZ (2000), es decir, lo que en los lepidópteros es la vesica). Los intentos para evaginarlas no nos han dado resultado hasta ahora. Por esta causa, se decidió aplicar la inyección de agarosa en los edeagos invaginados.

El proceso ha sido el siguiente: Se ha introducido al insecto entero, con el alfiler que lo atraviesa, dentro de un pequeño cristizador con el agua detergente suficiente para cubrirlo, y se ha calentado a unos 80 ° C durante una media hora. Con este tratamiento las articulaciones han quedado totalmente flexibles. Después se ha lavado con agua desionizada caliente para eliminar el detergente. Para extraer el abdomen, con el índice y pulgar izquierdo se ha sujetado el alfiler y al insecto boca arriba, y bajo la lupa, se ha procedido a cortar el primer esternito después de las coxas posteriores, no profundamente. A continuación, utilizando unas pinzas, se ha separado dicho abdomen del resto del cuerpo. Cuando el corte se ha sido profundo o con unas microtijeras se ha producido igualmente el corte del extremo del saco interno, que está totalmente invaginado y es muy largo.

El abdomen ha sido tratado con hidróxido potásico al 10 % durante unos 30 minutos y a 85 ° C. Mientras tanto, con papel absorbente, se ha secado el insecto, sin frotar, hasta que han aparecido sus escamas bien limpias. Después de colocar bien sus patas y antenas, se ha dejado secar para guardarlo de nuevo con sus etiquetas.

Concluido el tratamiento con el hidróxido potásico del abdomen, se agita el tubo con tapón enérgicamente, añadiendo unas gotas de alcohol isopropílico para eliminar las espumas; después se cambia de tubo y se lava agitándolo en agua caliente. Finalmente, se coloca en una pequeña cubeta con un par de gotas de agua. Utilizando las agujas enmangadas, se eliminan los anillos abdominales, respetando todo su contenido, hasta llegar al VIII el cual debe separarse de lo que es propiamente la genitalia.

Separada ésta con su saco interno invaginado del resto de estructuras y órganos, se entabren las dos valvas que forman el extremo del edeago. Después de añadir unas 10 gotas de agua, se realiza una ligera tinción con negro de clorazol E, y se procede al

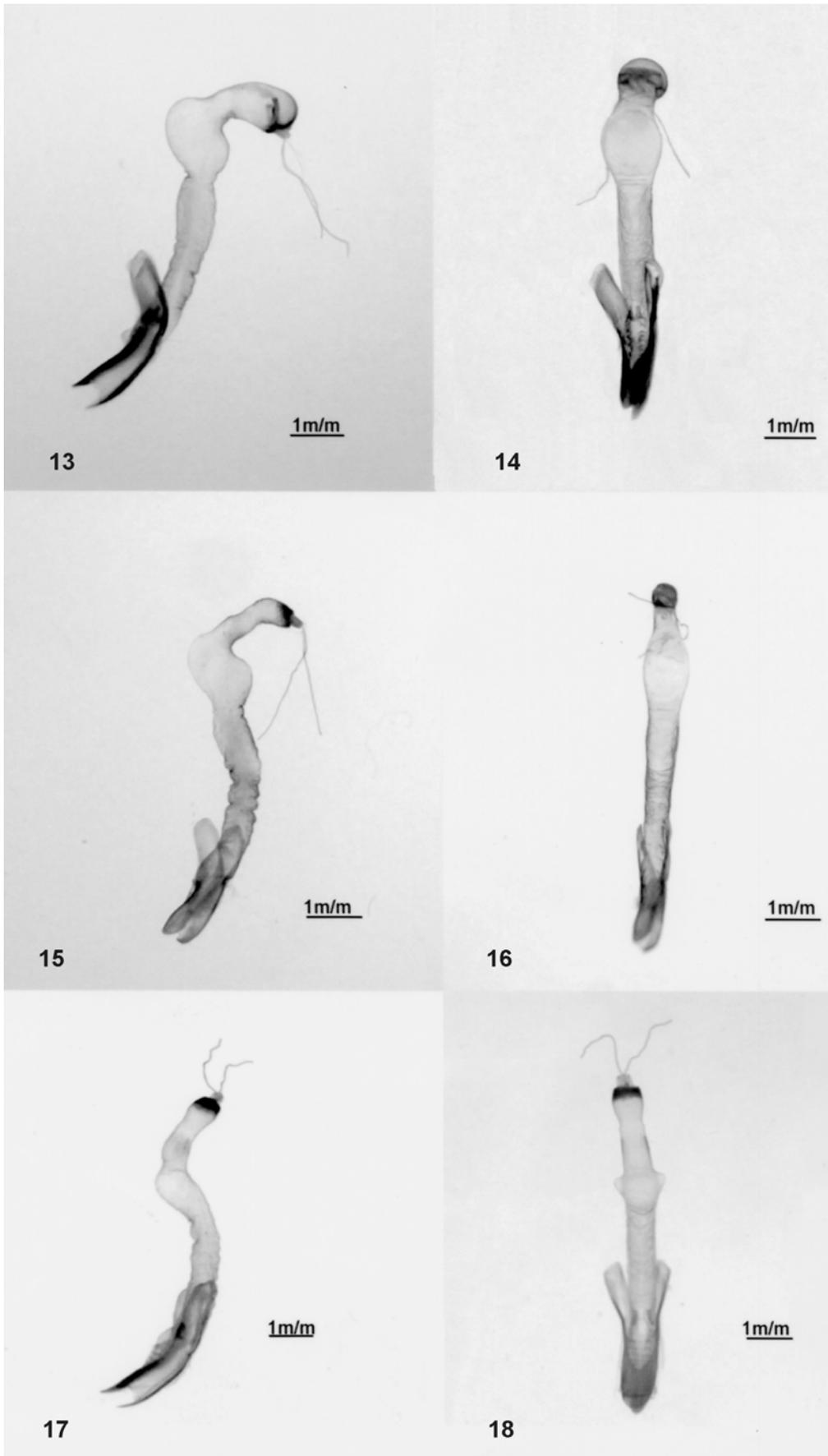


Fig. 13-18. Eedeagos invaginados en visión lateral izquierda y dorsal de los cerambicidos Lamiinae *Iberodorcadion*: (*Hispanodorcadion circumcinctum* (Chevrolat, 1862) (13-14), (*Hispanodorcadion neilense* (Escalera, 1902) (15-16) e (*Iberodorcadion spinolae* (Dalman, 1817) (17-18).

cambio de agua y limpieza de la genitalia. Los finos conductos que salen de lo que es en realidad el extremo interior del saco interno cuando se evagina, son cortados, dejando solo un trozo de ellos. Después hemos introducido entre las valvas la aguja de 0,3 mm de diámetro, con punta redondeada, de la jeringuilla para insulina que contiene la agarosa G, previamente calentada a unos 85 °C. Dicha aguja se lleva hasta casi el final, y a continuación se inyecta la agarosa lentamente, sujetando y dejando resbalar la genitalia, entre el dedo y la aguja, para que el hinchamiento sea el adecuado. El extremo del saco interno, que tiene los conductos, y el bulbo, deben de quedar con las superficies lisas. Hacia las apófisis basales (véase HERNÁNDEZ, 2000), este saco interno queda siempre algo más arrugado; debe procurarse evitarlo inyectando por segunda vez y lentamente en esta zona, si es necesario, calentando de nuevo la agarosa. La inyección nunca debe forzar estas estructuras para evitar la rotura de los tejidos.

Debe tenerse en cuenta que estas invaginaciones inyectadas, dan una imagen especular de las genitales; como un calcetín del revés, pero en ellas pueden verse las mismas diferencias y semejanzas entre especies que si se hubieran evaginado. Véanse las Figs. 13 y 14 de *Iberodorcadion (Hispanodorcadion) circumcinctum* (Chevrolat, 1862), 15 y 16 de *Iberodorcadion (Hispanodorcadion) neilense* (Escalera, 1902) y las 17 y 18 de *Iberodorcadion (Iberodorcadion) spinolae* (Dalman, 1817)

Resultados y conclusiones

Aun cuando existen actualmente otros medios para producir inclusiones de pequeños insectos, el uso de las agarosas brinda una visión más amplia de estos. Utilizando estos geles, es posible hacer preparaciones de insectos de tegumentos débiles o no, completos y con sus apéndices bien colocados, insectos que normalmente son guardados sumergidos en líquidos, en los cuales se encuentran casi siempre retraídos o entre porta y cubreobjetos con separadores. Pero incluidos en los geles de agarosa, no se deforman, rompen, ni secan; además, siempre están dispuestos, en pocos minutos, para poder utilizar con ellos otros medios mejores de preparación que pudieran aparecer en el futuro. La Fig. 3 corresponde a un hemíptero *Aphididae*. Puede observarse el bloque de gel en el que está incluido. En las Figs. 1, 2 y 4, correspondientes respectivamente a un *Tomisidae*, a un *Araneae* y a un himenóptero *Proctotrupidae*, no se aprecian por estar dichos bloques sumergidos en el líquido conservante.

Respecto de las inyecciones de agarosa en genitales evaginadas o invaginadas, la inyección de agarosa G, desarrolla la morfología de las membranas internas de estos órganos; al gelificar se mantienen estas formas, las cuales permiten apreciar las semejanzas y diferencias que existen entre ellas. De este modo, se pueden establecer, con un buen grado de seguridad, sus caracteres. Por otro lado, la facilidad de eliminación por disolución en caliente de las agarosas, permite recuperar estas genitales de forma rápida y simple, y repetir las inyecciones, o bien utilizar otros productos de inyección.

En el trabajo de PEYERIMHOFF (1949) respecto de los *Rhizotrogus* Berthold, 1827, después de un análisis bastante exhaustivo de las distintas partes de su anatomía para determinar cuales son las mas indicadas para ser utilizadas en la clasificación de estos insectos, dice refiriéndose al eedeago: “*A l’interieur, la pièce médiane, c’est-à-dire le pénis proprement dit, est réduit à un cylindre musculéux, évidemment capable de turgescence, et qu’ on voit quelquefois un peu évaginé au-delà du méat. Il ne renferme pas de phanères chitineuses, et à cet égard aussi bien que par sa position complètement interne, il n’est d’aucune utilité dans la taxonomie*”. Y en una llamada a este párrafo añade “*Cela n’est vrai que pour les espèces du Nord de l’Afrique. Il y a des Rhizotrogus européens où la pièce médiane se manifeste. Chez le R. vernus par exemple, elle est devenue chitineuse à l’extrémité, où elle fait normalement saillie hors méat, ce qui par corrélation entraîne la division de chaque paramère en un lobe inférieur*

arrondi et un lobe supérieur caréné”. Da a entender con esto, que si estas membranas no tienen partes quitinizadas externas, y además son totalmente internas, no sirven para ser utilizadas en las clasificaciones. BARAUD (1977) indica en su prólogo que los *Rhizotrogus* y *Amphimallon* tienen sus genitales evaginables; sin embargo no tenemos conocimiento de que se hayan publicado trabajos de evaginación e hinchamiento de estos órganos en coleópteros. En la revisión del género *Iberodorcadion*, realizada por VIVES (1983) indica: “*Saco interno evaginable, largo y desprovisto de piezas*”. HERNÁNDEZ (2000) dibuja dicho saco pero vacío, no pudiendo llegar tampoco a apreciar sus diferencias. La más próxima referencia a estas membranas internas, ha sido el ya indicado trabajo de COCA-ABIA & MARTIN-PIERA (1998) sobre los *Rhizotrogus*.

Respecto a estas estructuras membranosas, encerradas frecuentemente en otras quitinizadas, cuyo conjunto llamamos normalmente pene, aedeago, etc., son como la huella dactilar de cada especie (salvo raras excepciones), de ahí el gran interés de su estudio. Las evaginaciones son posibles de hacer en otros géneros (no sólo de Coleoptera), cuyos tamaños permitan ser manipulados. Además, hace tiempo que existen productos con los que también se pueden realizar estos hinchamientos, como el silopreno (MAGRO, 1994).

El uso de inyecciones de agarosas en la genitalia de otros géneros de escarabeidos han sido positivos, consiguiéndolo buenos resultados con *Trichius* Fabricius, 1787, *Copris* Geoffroy, 1762 y *Anomala* Samouelle, 1819, aunque con diferentes dificultades. Una de las características a tener en cuenta es el tamaño del eedeago, que hacen necesario el uso de agujas de inyección acordes con el diámetro del orificio de entrada a ellos para producir las evaginaciones. Las agujas deben de poder ajustarse a él, para que pueda crearse la presión interior que producirá la evaginación. Reiteramos de nuevo que el bisel de sus puntas, debe ser cortado, lijado y redondeado con la lija mas fina, para conseguir buenos resultados.

Por supuesto en muchos casos las evaginaciones serán imposibles de realizar, ya sea por el tamaño u otras dificultades; pero de todos modos, es esperable que su aplicación sea potencialmente amplia.

Hasta ahora, los intentos de aplicación de inyecciones de agarosas en los ejemplares hembra antiguos, no han dado buenos resultados. Sus tejidos son mucho más débiles y las estructuras más delicadas y complejas, produciéndose siempre roturas de tejidos.

La extracción de la genitalia en ejemplares frescos, no necesita del tratamiento previo de reblandecimiento y pueden utilizarse directamente las pinzas. Creemos también que en estos casos será posible la inyección en las genitales femeninas, aunque con ciertas dificultades y previa separación del abdomen; y en los dos casos, machos y hembras, con el posterior tratamiento de hidróxido potásico, quizás más débil en las hembras.

El hinchamiento de las genitales con agarosas, nos permite ver formas muy definidas y constantes, que serán de gran ayuda en los estudios de filogenia, sobre todo en grupos en los que la taxonomía aun no se ha podido definir.

Agradecimiento

A Rafael Magro por su amabilidad al mostrarme el modo de realizar las evaginaciones de noctuidos, y a José Luis Yela, por sus buenos consejos, pues gracias a ellos me vi motivado a estudiar las posibles aplicaciones de las agarosas en la inyección de las genitales de los noctuidos. De ese estudio se ha derivado el presente trabajo. Así mismo, a Maria José de Frutos y a Rafael Armisen, por sus importantes ayudas en esta investigación.

Bibliografía

- BÁGUENA, L. 1967. *Scarabaeoidea de la fauna Íbero-balear y Pirenáica*. Inst. Español Ent., CSIC, Madrid. 576 pp.
- BARAUD, J. 1977. *Coléoptères Scarabaeoidea. Fauna de l'Europe occidentale, Belgique, France, Grande Bretagne, Italie, Peninsula Iberique*. Nouv. Rev. Ent. ed., IV Suppl., 7(1):352 pp.
- BARRIENTOS, J. A. (Coor.) 1988. *Bases para un curso práctico de Entomología*. Asociación española de Entomología, 754 pp.
- COCA-ABIA, M^a. M. & MARTÍN-PIERA, F. 1998. *Revisión taxonómica del género Rhizotrogus Berthold, 1827 (Col. Scarabaeoidea. Melolonthinae)*. Coleopterological Monographs. 2. Barcelona. 140 pp.
- HERNÁNDEZ, J. M. 2000. Estudio multivariante de la genitalia masculina y femenina en seis especies de *Iberodorcadion* Breuning, 1943 (Coleoptera, Cerambycidae, Lamiinae) de la Comunidad de Madrid (España) y propuesta de nuevas sinonimias para el grupo. *Boletín Asociación española de Entomología*, 24, (1-2): 97-129.
- MAGRO, R. 1994. La "técnica del silopreno" un nuevo procedimiento para el examen de la vesica penis y bursa copulatrix. *SHILAP, Revista de Lepidopterología*, 22 (87): 191-206.
- MAGRO, R & TORRE, F. DE LA 2002. Crítica razonada de los métodos para la preparación de genitalias internas. Uso de nuevas sustancias: las agarosas. *SHILAP. Revista de Lepidopterología*. En prensa.
- MARTÍN-PIERA, F. 1985. Los géneros de Melolonthini y las especies Ibero-Baleares de *Amphimallon* Berthold, 1827, y *Monotropus* Erichson, 1848 (Col. Scarabaeoidea). *Graellsia*, 41: 7-30.
- MARTÍN-PIERA, F. 1986. Los *Rhizotrogus* Berthold, 1827, Ibero-Baleares. I. Claves de identificación actualizadas (Col. Scarabaeoidea, Melolonthini). *Graellsia*, 42 :3-18.
- PAULIAN, R. & BARAUD, J. 1982. *Faune des Coléoptères de France, II. Lucanoidea et Scarabaeoidea*. Encyclopedi entomologique, 43. Lechevalier ed., Paris. 477 pp
- PEYERIMHOFF, P. DE 1945 (1949). Études sur la systématique des Coléoptères du Nord-Africain. - *Les Rhizotrogus*. *Ann. Soc. Ent. Fr.*, CXIV, pp.1-76.
- VIVES, E. 1983. *Revisión del Genero Iberodorcadion (Coleópteros, Cerambycidos)*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid. 171 pp.

Grupos de Trabajo S.E.A.

Si eres socio de la S.E.A., estás interesado en la temática de cada grupo y deseas participar en sus actividades y proyectos escribe a los coordinadores de los grupos (pp. 254–264) o directamente a la S.E.A.



<http://entomologia.rediris.es/gtli>



Grupo de Trabajo en artrópodos exóticos e invasores

