

---

## **Disección, aclarado mediante el uso de ácido láctico y almacenamiento de genitales de moscas (Diptera: Calyptratae)**

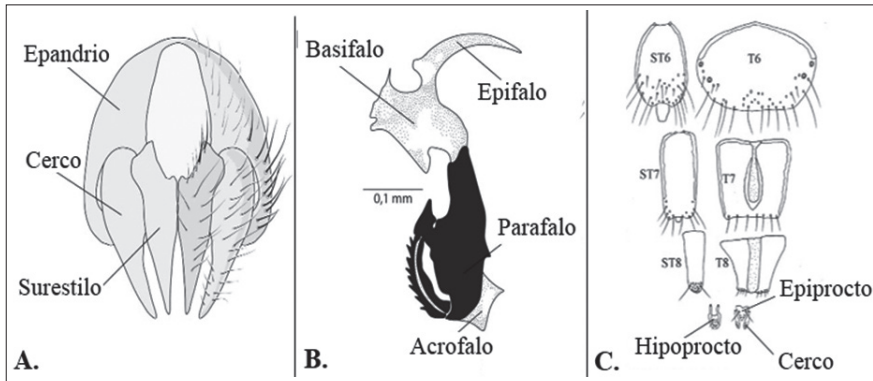
Adriana Pérez  
Eduardo Amat

### **A. Fundamento teórico**

En algunos grupos de insectos la morfología externa de los genitales, tanto de machos como hembras adultos, ha sido ampliamente utilizada como carácter válido para la determinación taxonómica de especies (Blahnik & Holzenthal, 2004). La alta diversidad de especies de moscas, así como su compleja morfología y taxonomía representan un constante reto para el avance de su conocimiento.

En los especímenes machos de la gran mayoría de moscas, la variación morfológica de las estructuras genitales como el epandrio, los cercos, los surestilos (Fig. 1a); el falo, ha sido útil como característica diagnóstica para la identificación de las especies. (Fig. 1b). A diferencia de los machos, los genitales de las hembras han sido poco explorados, y su estudio se ha limitado a la morfología de los últimos esternitos abdominales, cercos, epiprocto e hipoprocto (Fig. 1c).





**Figura 1.** a) Morfología y algunos detalles de los genitales masculinos en vista posterior. b) Detalles de la estructura del falo en vista lateral. c) Morfología y detalles de los genitales femeninos. Morfología y terminología según Cumming y Wood (2009).

Para la correcta interpretación y el estudio morfológico de las estructuras anteriormente mencionadas se ha utilizado la técnica del aclaramiento, este proceso permite que los tejidos muscular, conectivo y graso que se encuentran dentro de la estructura de la mosca se ablanden y se diafanicen, lo cual facilita su extracción y estudio (Cumming, 1992); esta metodología asegura el aclaramiento incluso de estructuras muy esclerotizadas.

Aclarar estructuras diagnósticas mediante este proceso, en particular de algunos grupos como mosquitos y moscas, es una práctica común entre taxónomos. Esta estrategia de estudio adquiere relevancia porque consume poco tiempo y es fácil. En la literatura se encuentra una gran variedad de reactivos aclaradores que se ajustan a las exigencias y gustos de los especialistas, los más utilizados son los siguientes:

**Lactofenol:** es una mezcla entre ácido láctico y fenol al 1 %, con un efecto aclarador. La desventaja de este agente es que posee efectos cancerígenos (Yélamos, 1990).

**Hidróxido de potasio (KOH):** se utiliza generalmente al 10 % o 12 %, disuelto en agua; aunque algunos especialistas prefieren usarlo al 5 %. Tiene un elevado efecto corrosivo, y a mediano y largo plazo destruye estructuras de interés de estudio como membranas, tejido, etc. (Yélamos, 1990)



**Ácido láctico ( $C_3H_6O_3$ ):** actúa como un agente macerador, elimina el tejido suave y aclara las estructuras esclerotizadas sin dañarlas, su efecto continúa hasta que todos los tejidos blandos se disuelven (Cumming, 1992). El ácido láctico es el reactivo más común y ampliamente usado por taxónomos dipterólogos, y es el agente que a continuación se trata en detalle.

## **B. Objetivo**

Disecionar, aclarar con ácido láctico y almacenar genitales de moscas adultas con fines de identificación

## **C. Requerimientos**

### **Materiales**

- Pinzas entomológicas suaves con extremos finos: hechas de acero inoxidable, de agarre suave, apropiadas para la manipulación de insectos (Fig. 2a).
- Microtijeras (tijeras oftalmológicas): hechas de acero inoxidable de extremos rectos y punta fina, adecuadas para la disección de genitales de machos y hembras, pueden servir las de uso oftalmológico (Fig. 2b).
- Agujas de acero con extremo curvado: se pueden elaborar con un mango de madera y minuten entomológico, útiles para trabajar con estructuras pequeñas y delicadas en insectos (Fig. 2c).
- Portaobjetos excavados: láminas de vidrio con concavidades, ideales para el montaje, y facilitan la observación de estructuras anatómicas de insectos (Fig. 2d).
- Tubo de ensayo o beaker: recipiente de vidrio, ideal para calentar sustancias (Fig. 2e).
- Microvial de plástico o vidrio: se puede encontrar en el mercado en varios tamaños, de plástico o de vidrio, son ideales para almacenar genitales de insectos montados (Fig. 2f).
- Alfileres entomológicos: agujas de acero inoxidable indispensables para el montaje de insectos adultos (Fig. 2g).

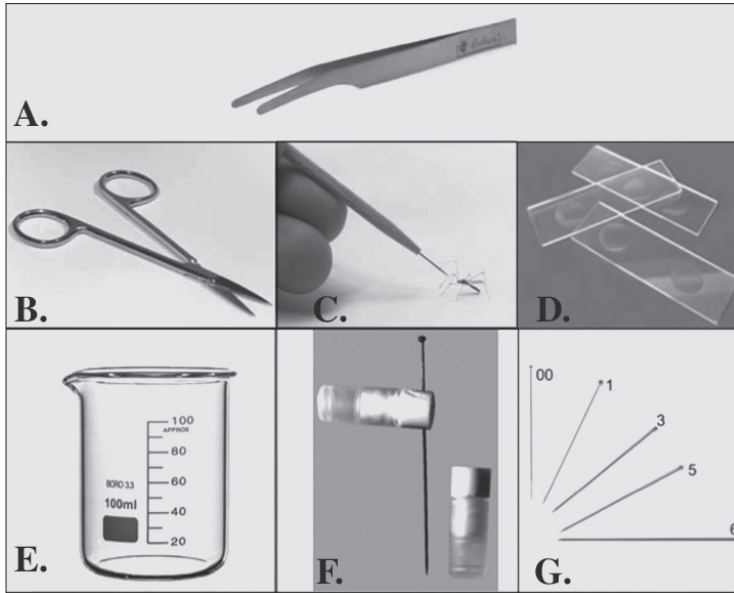
### **Reactivos**

- Ácido láctico al 85 %
- Glicerol o glicerina al 99 %
- Euparal, Entellan o bálsamo de Canadá
- Xilol ( $C_8H_{10}$ ) 99 %



## Equipos

- Microscopio estereoscópico
- Plancha de calentamiento o estufa



**Figura 2.** a) Pinzas entomológicas suaves con extremos finos. b) Bisturí o microtijeras (tijeras oftalmológicas). c) Agujas de acero con extremo curvado (se pueden elaborar con un mango de madera y minuten entomológico). d) Portaobjetos excavados. e) Tubo de ensayo o beaker. f) Microvial de plástico o vidrio. g) Alfileres entomológicos. Figuras tomadas de: <http://www.entomopraxis.com> y <http://www.enthos.com/>

## D. Procedimiento

### 1. Separación de especímenes por sexo

Se separan los especímenes para diseccionar según su especie y/o morfotipo y a continuación se separan por sexo. Para este fin se observan los caracteres de la terminalia<sup>1</sup> (genitales), o en caso de que exista

<sup>1</sup> Complejo de segmentos genitales, los cuales incluyen aquellos modificados para la cópula y/u ovoposición.



dimorfismo sexual<sup>2</sup>, el carácter indicado según la especie de mosca; ej. Condición holóptica<sup>3</sup> o dicóptica<sup>4</sup> (Blahnik and Holzenthal, 2004).

## 2. Extracción de los genitales

En ejemplares secos se recomienda hidratar la mosca, bien sea por medio de ebullición (se sumerge totalmente la mosca durante dos segundos) o agregando alcohol isopropílico al 70 %. Así se evita que el espécimen se deteriore en el proceso de extracción (Yélamos, 1990).

**Hembras.** Para el estudio del ovopositor y la espermateca de la hembra, con ayuda de pinzas coloque la mosca con la parte ventral hacia arriba sobre la platina del estereoscopio, dentro del campo visual, y realice un corte horizontal a la altura de los esternitos 3 y 4 (Fig. 3)



*Figura 3.* Corte transversal a la altura del tercero y cuarto segmentos abdominales, fotografía de la terminalia de una mosca hembra en vista latero-ventral. Foto: Adriana Pérez.

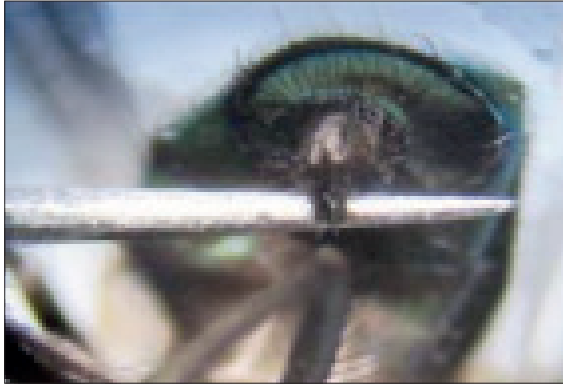
<sup>2</sup> Diferencias perceptibles en forma, color u otros caracteres entre individuos de la misma especie, pero de diferente sexo.

<sup>3</sup> Condición ocular en especímenes de moscas adultas en la que no existe separación entre sus ojos compuestos, el área adyacente entre ellos no se evidencia a manera de frente; más frecuente en machos.

<sup>4</sup> Condición ocular en especímenes de moscas adultas en la cual la separación entre sus ojos compuestos es evidente, generalmente se reconoce el área frontal y es más frecuente en hembras.



**Machos.** Para el estudio de los genitales, con la ayuda de pinzas disponga el espécimen bajo el campo visual del microscopio estereoscópico, con la parte ventral hacia arriba, y con la aguja de extremo curvado en la otra mano empuje delicadamente hacia afuera dejando así expuestos los cercos y los surestilos, se realiza el mismo corte que para las hembras (Fig. 4).



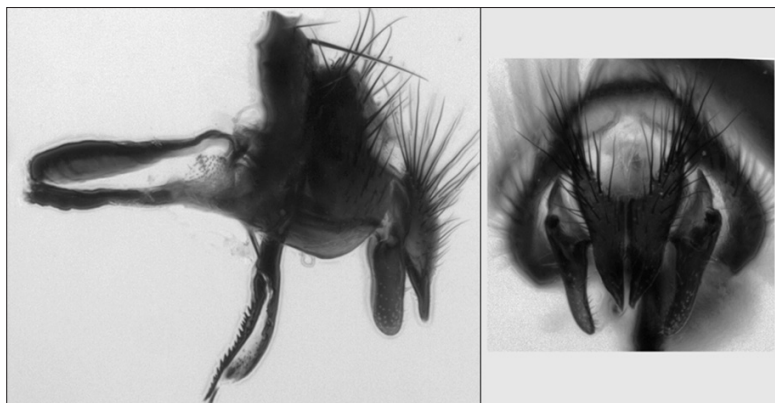
*Figura 4.* Exposición de los genitales masculinos en vista posterior.  
Foto: Adriana Pérez.

### 3. Aclarado de genitales

En un recipiente de vidrio (tubo de ensayo, beaker, etc.) se sumergen los genitales en ácido láctico al 85 % hasta cubrir totalmente la estructura, se calientan a una temperatura de 90 a 100 °C (plancha de calentamiento o estufa eléctrica) durante 10-15 minutos, teniendo en cuenta que el ácido láctico no debe alcanzar la ebullición y el recipiente de vidrio debe permanecer tapado, porque los gases emanados del ácido láctico son tóxicos.

Al transcurrir los 10 a 15 minutos, con una pinza se retiran los genitales cuidadosamente y se colocan en una lámina excavada con una o varias gotas de glicerol ( $C_3H_8O_3$ ), se extraen los tejidos macerados con ayuda de las pinzas entomológicas y la aguja de acero. Se procede a observar los caracteres morfológicos de interés en el microscopio estereoscópico (Fig. 5).





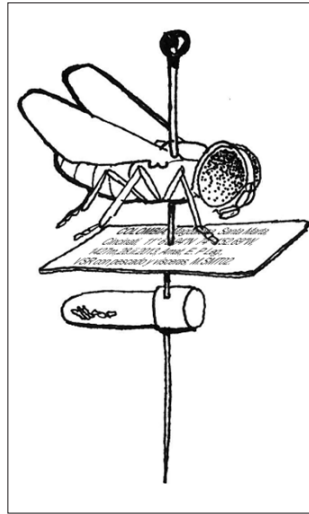
**Figura 5.** Detalle al estereoscopio de los genitales masculinos en observación ya aclarados. A) Vista posterior de los genitales de *Comptosyriops verena* (cercos, surestilos, epandrio). B) vista lateral *Comptosyriops verena* (epandrio, cercos, surestilos, edeago y falo). Foto: Eduardo Amat.

#### 4. Almacenamiento de las estructuras

Según los objetivos del investigador, las estructuras se podrán almacenar de manera temporal o permanente.

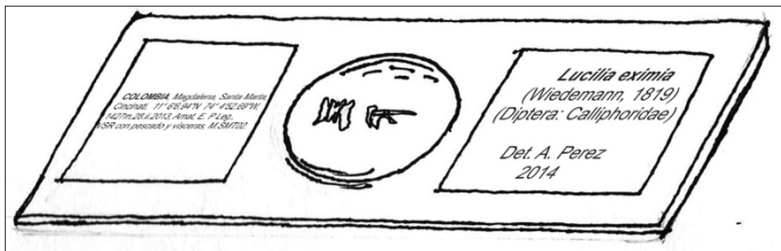
**Almacenamiento temporal.** Luego de la observación, el espécimen puede almacenarse en una cápsula o microvial de plástico especial con glicerina para evitar la desecación de la estructura. El microvial con los genitales incluidos se pone debajo del ejemplar al que corresponde (Márquez, 2005) (Fig. 6).





**Figura 6.** Almacenamiento temporal del espécimen y genitales en microvial. Dibujo: Eduardo Amat.

**Almacenaje permanente.** Se montan los genitales con Euparal, Entellan o bálsamo de Canadá en un portaobjetos y se cubren con el cubreobjetos. El exceso del reactivo se puede eliminar con xilol 99 %. Se deja secar, para posteriormente etiquetarlo con los datos correspondientes al espécimen extraído (Aguilar, Coutiño y Salinas, 1996) (Fig. 7).



**Figura 7.** Montaje permanente en lámina de los genitales del macho o la hembra de moscas con sus respectivos datos de colecta y determinación taxonómica. Dibujo: Eduardo Amat.





## E. Referencias bibliográficas

- Aguilar Morales, M.B., Coutiño Bello, B. y Salinas Rosales, P. (1996). Manual general de técnicas histológicas y citoquímicas. México: Ediciones UNAM.
- Blahnik, R.J. & Holzenthal, R.W. (2004). Recolección y conservación de Trichoptera, con énfasis en el material montado. *Nectopsyche, Neotropical Trichoptera Newsletter*, 1, Supplement, 1-13.
- Cumming, J.M. (1992). El ácido láctico como un agente para la maceración de especímenes de Diptera. *Fly Times*, 8(7).
- Cumming, J.M. & Wood, D.M. (2009). Morphology and terminology. In: Brown, B.V. et al. (Eds.), *Manual of Central American Diptera* (pp. 9-50). Vol. 1. Ottawa: NRC Research Press.
- Márquez, L.J. (2005). Técnicas de colecta y preservación de insectos. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 37(1), 399.
- Yélamos, T. (1990). Preparación de genitalias de insectos. *Bol. SEA*, (8), 35-36.

