

PROTOCOLO DE COLECCIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS PARA GRUPOS MEGADIVERSOS EN ESTUDIOS DE BIODIVERSIDAD: CASO HORMIGAS

Mónica Ramírez, Clara Inés Solís-Sandoval, Elizabeth Jiménez, Janine Herrera, Inge Armbrrecht

Universidad de Valle, Departamento de Biología, AA 25360 Cali; correo electrónico: moramire73@hotmail.com

RESUMEN

El trabajo de laboratorio es un paso determinante en el proceso de investigación. El éxito y el grado en que se puedan resolver las preguntas dependerán de la rigurosidad, precisión y exactitud de éste. En este documento se plantea un procedimiento sistemático y ordenado que busca disminuir los posibles errores asociados a la manipulación de grandes cantidades de muestras de insectos y otros artrópodos y tener acceso rápido a la información. Se parte desde el ingreso de muestras del campo, tomando como grupo foco a las hormigas (Hymenoptera: Formicidae), pasando por recomendaciones para su correcto almacenamiento, limpieza, clasificación, determinación y etiquetado. Esto permitirá que los resultados sean confiables y así se evitan análisis estadísticos confusos conducentes a conclusiones erróneas.

Palabras clave: trabajo de laboratorio, clasificación jerárquica, esquemas.

SUMMARY

Laboratory work is a key step in the research process. The success and the extent to which questions can be resolved will depend on the rigor, precision and its accuracy. This paper presents a systematic and orderly process that aims to reduce the errors associated with sample handling of large numbers of samples of insects and other arthropods and have quick access to information. It starts from the entrance of samples of the field, using ants as a target group (Hymenoptera: Formicidae), through recommendations for proper storage, cleaning, sorting, identification and labeling. This will allow the results to be reliable, and to avoid confusing statistical analyses which might lead to misleading erroneous conclusions.

Key words: laboratory work, hierarchical classification, schemes.

INTRODUCCIÓN

En estudios de diversidad biológica, en el trópico y neotrópico, los investigadores deben asumir el desafío que la gran diversidad de especies y la presencia de grupos hiperdiversos impone. Por un lado, dichos estudios demandan gran parte del tiempo, no solo para la determinación a género y especie de las muestras, sino también para el manejo y curaduría de los especímenes colectados. Además, el trabajo se multiplica cuando se realizan estudios a escala de paisaje que comprenden diversas coberturas vegetales y donde se utilizan

varias técnicas de muestreo. En este tipo de estudios, los grupos de investigación en Hormigas (GIH) y en Agroecosistemas (GEAHNA) de la Universidad del Valle, han acumulado una serie de conocimientos durante más de dos décadas de experiencia de campo y de laboratorio, que es importante socializar para prevenir errores y ahorrar tiempo en futuras investigaciones de biodiversidad, ecología de comunidades y ecosistemas. Esta nota pretende, por tanto, exponer cinco pasos básicos para que el trabajo de laboratorio sea más fácil y práctico.

1. Limpieza de las muestras: en el laboratorio deben ser refrigeradas todas las muestras inmediatamente llegan del campo, con el fin de que se conserven en buen estado el tiempo necesario hasta su limpieza (Ramírez-Mesa 2006). Dependiendo del volumen de muestras, el trabajo de limpieza del material puede tardar semanas o meses, por esto recomendamos que se inicie con muestras procedentes de las trampas de caída, cebos y otros tipos de trampas que impliquen la exposición prolongada a condiciones de intemperie. Este tipo de muestras tienen un mayor riesgo de contaminación y requieren que la limpieza sea más exhaustiva.

La limpieza inicia con el vertimiento de la muestra en una bandeja para extraer los artrópodos de mayor tamaño y que se reconocen a simple vista (coleópteros, arañas, pseudoescorpiones y hormigas grandes), en caso de que la muestra se encuentre muy sucia se puede cernir para retirar las partículas grandes como tierra, piedras y hojarasca, las cuales deben ser revisadas detenidamente al estereoscopio para no descartar material biológico de interés. Luego, es deseable hacer una revisión por partes. Con ayuda del estereoscopio se revisa toda la caja de Petri siguiendo un orden sistemático de arriba a abajo y de izquierda a derecha. Eventualmente, puede ser necesario fraccionar la muestra en diferentes cajas de Petri, con el fin de tener un mejor campo visual (más limpio) a medida que se aclara la muestra, “lavando” con agua cuantas veces sea necesario, de manera que sea posible extraer los especímenes más pequeños, con especial cuidado y minucia para evitar su pérdida. También es recomendable alternar los contrastes de la base del estereoscopio (fondo blanco y negro), ya que algunos especímenes son muy claros, poco diferenciables con fondo blanco y viceversa.

2. Clasificación del material biológico: en este punto los artrópodos se separan por grupos (i.e. arácnidos, coleópteros, hormigas, etc.), lo cual va a depender de las preguntas o interés del estudio. Cada grupo se pone en viales individuales etiquetados debidamente con los datos de localidad, hábitat, método de muestreo y fecha. Para preservar el material se puede usar alcohol al 70% (Villareal et al. 2004). Sin embargo, se recomienda usar alcohol al 96%, pues los especímenes se conservan mejor, por un mayor tiempo y, además, pueden ser usados, si se requiere, para análisis moleculares. A mayor “pureza” del alcohol menor será el deterioro del ADN (Kronauer et al. 2006, Berghoff et al. 2008).

3. Separación taxonómica: una vez clasificados se toma uno de los grupos de una localidad determinada y se decanta gradualmente por los diferentes niveles taxonómicos. En el caso particular de las hormigas, los individuos se pueden determinar directamente a género con una clave básica y general como la que se encuentra en el libro de Hormigas del Neotrópico, editado por Fernández (2003). Posteriormente, cuando ya está todo el conjunto identificado a nivel de género, se pasa a la clasificación de morfoespecie o especie con la ayuda de diferentes claves de especialistas, teniendo en cuenta caracteres morfológicos como tipo de suturas, proyecciones, forma y distribución de los pelos, forma de la mandíbula, esculturación, entre otros (Lattke 2000; Fisher 2010). A partir de este momento cada espécimen identificado de cada muestra (nótese que una muestra podría tener varias obreras y soldados de la misma especie), queda separado en un único vial sin revolverse con otras especies de la misma muestra. De esta manera cada vial constituye un registro que será, finalmente, ingresado a una base de datos. Cada registro queda con los datos definitivos de localidad y determinación. Es importante tener en cuenta que en este punto el vial ya ha pasado por varios cambios de etiquetas y, por tanto, se debe tener especial cuidado que al sacar la etiqueta antigua no arrastre al ejemplar adherido sin ser visto, especialmente con aquellos insectos muy pequeños.

La separación, primero a género y luego a especie, facilita la revisión sistemática de cada uno de los grupos a identificar, porque se adquiere destreza y memoria visual sobre los caracteres del grupo que se están revisando. Así mismo permite utilizar de manera seguida las mismas claves y agilizar el trabajo de identificación. En esta etapa, cuando los individuos quedan clasificados al nivel de especie o morfoespecie, es indispensable cambiar la forma de almacenarlos, ya no por lote o estación, sino por especie. En este caso cada paquete debe contener viales de una sola especie de las diferentes localidades involucradas en el estudio y todos los paquetes de especies se almacenan dentro del género (O. Ascuntar, com. pers.). Este método jerárquico de separación, permite devolverse y corregir cualquier error de manera puntual en la unidad muestral o localidad. Si la institución o el grupo de investigación recibe la visita de un taxónomo especialista que desee revisar las muestras, el método que proponemos permite ubicar rápidamente la bolsa que contiene todos los viales en su interior debidamente separados en bolsas herméticas

más pequeñas, cada una de ellas con las especies del género en cuestión. Las hormigas de cada evento de captura van dentro de tubos Eppendorf debidamente rotulados (localidad, altura, fecha,

hábitat, coordenadas, colector) en su interior (Figura 1).

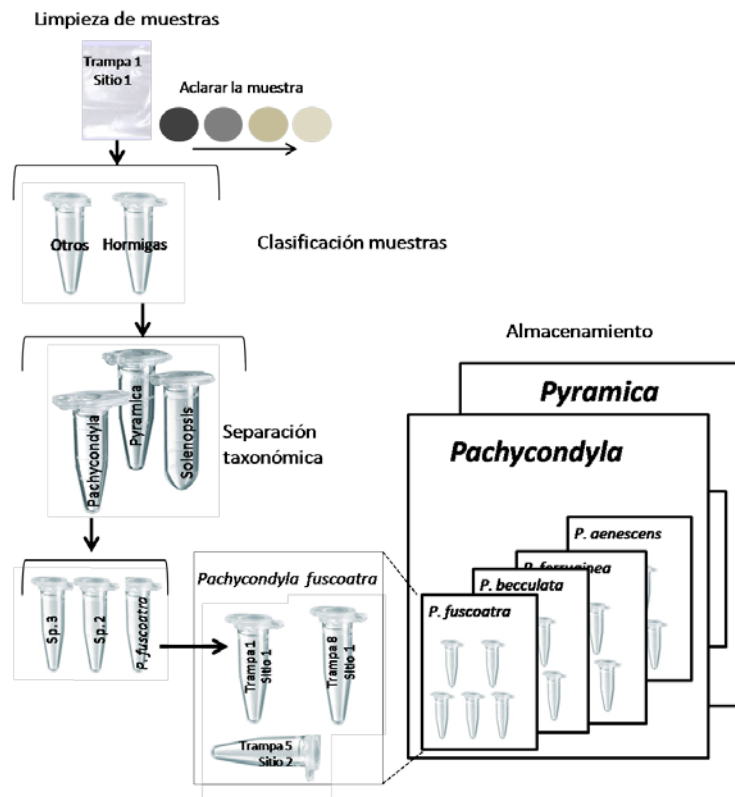


Figura 1. Esquema de los pasos básicos de limpieza, clasificación y almacenaje del material

4. Colecciones

Colección de referencia: al mismo tiempo que se procede con la identificación de los especímenes, se establece una colección de referencia. Inicialmente, ésta se conserva en alcohol para hacer las comparaciones durante el período de identificación. Cuando se determina una morfoespecie nueva es recomendable incluir solo el ejemplar de esa unidad muestral y “no mezclar” con individuos de otras unidades muestrales o de otras trampas. Esto es importante porque si, más adelante, se detectan errores de identificación es posible dar marcha atrás y saber de dónde proviene el error.

Colección réplica: a medida que aparecen “duplicados” de cada morfoespecie o especie, se establece una colección réplica, especialmente importante en casos cuando encontramos muestras más completas (es decir, que contengan alados,

reinas, soldados u obreras mayores). Esta colección réplica permitirá hacer comparaciones con muestras parciales en las que se pueden confundir las diferentes castas con otras morfoespecies.

De forma simultánea, se puede ir conformando una colección en seco para garantizar rápido acceso a ciertos caracteres de las especies, de difícil observación dado al lustre o brillo que tienen por la humedad del alcohol (Lattke 2003). El proceso de montaje retrasa el ritmo con el que se lleva la identificación, en consecuencia, el grupo de investigación debe evaluar la capacidad de asumir esta labor según el volumen de muestras y la rapidez con que aparecen nuevas morfoespecies. Sin embargo, cuando se requieren con prontitud los resultados o cuando se muestrean sitios muy diversos, en los que es difícil el montaje rápido de gran cantidad de individuos, existe la opción al momento de la determinación, de dejar secar los

ejemplares sobre arena blanca (en pequeñas cajas Petri). Ésta se puede adquirir en viveros y acuarios. Esto permite manipular y ver los ejemplares más fácilmente desde todos los ángulos. En el proceso de etiquetado, ampliamente descrito en otros protocolos, recomendamos remitirse a Lattke (2000, 2003).

5. Ayudas para la identificación: en muchas ocasiones de la faena diaria de identificación, podemos enfrentarnos a dudas de cómo catalogar un determinado espécimen, en especial cuando son grupos hiperdiversos (i.e. *Pheidole*) (Wilson 2003) y/o que presentan diferencias muy sutiles entre especies. Es muy útil crear herramientas, como los esquemas, que hagan más amigable y precisa la identificación. Para esto se puede apoyar en plantillas que se obtienen de libros o claves, que el investigador los modifica de acuerdo a las características morfológicas más relevantes que desea plasmar y resaltar (Figura 2). Dichos caracteres van a depender del género en particular que se está revisando, por lo tanto, es muy útil apoyarse en los caracteres que los especialistas ya han seleccionado en sus claves. Por otro lado, se pueden acompañar de notas personales que llamen la atención al observador acerca de por qué se diferencian de otras especies muy similares, o en qué se parece a otra(s) especie(s) de tipo taxonómico y ecológico. Estas notas son útiles para cada estudio particular y se aplica al ensamblaje de hormigas específico de la región de estudio. Además, los esquemas facilitan y agilizan el trabajo de identificación cuando se tiene de un mismo género, muchas morfoespecies. Un buen esquema puede ahorrar muchísimo tiempo de abrir y cerrar frascos, disminuyendo la probabilidad de cometer errores, como intercambiar la muestra con el morfotipo al devolver las muestras a los frascos. Por ejemplo en un estudio se pueden tener colecciones con dos decenas de especies *Solenopsis* muy difíciles de diferenciar, el investigador no experto en taxonomía debe reducir al mínimo el error al separar morfoespecies. Por otro lado, es muy importante contar con la asesoría y valoración de taxónomos especializados.

6. Registro y sistematización de datos: cuando todo el material está identificado y etiquetado, es recomendable sellar los viales con cinta autosellante la cual evita la pérdida del alcohol y desecación del material. Paso seguido se ingresan los registros en una base de datos. Se recomienda que ésta se construya con la información extraída di-

rectamente de cada espécimen que ha sido separado en cada vial.

Solenopsis sp. 16

- Tamaño similar a la sp. 2
- Patas y antenas más claras
- Pelos cortos y densos en cabeza y abdomen

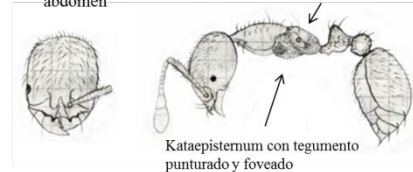


Figura 2. Ejemplo de un cuaderno de notas de laboratorio.

De este modo se gana tiempo al no llenar formatos de papel y se minimizan los errores asociados al traspaso de información. Además, es importante que el ingreso de los datos se haga entre dos personas que, constantemente, comparen la información ingresada con la de la etiqueta del espécimen. Cuando la base de datos esté terminada, es recomendable hacer una revisión al azar, de aproximadamente el 20%, de los registros para detectar posibles errores.

Finalmente, no desestime la importancia del trabajo minucioso en el laboratorio, pues la rigurosidad, precisión y exactitud de éste determinan el éxito de la investigación y el grado en que se van a resolver las preguntas. Aún con un buen diseño experimental, los errores, ya sea de separación, identificación o introducción de datos pueden llevar a análisis estadísticos confusos, resultados desconcertantes o a conclusiones erróneas.

AGRADECIMIENTOS

Al biólogo Oscar Ascúntar por su colaboración en la curaduría del material y la inspiración para la organización jerárquica de los morfos. A James Montoya por sugerencias al manuscrito. A la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle por apoyo logístico y financiero. Este trabajo fue desarrollado en el marco del proyecto “Restauración de la conectividad del paisaje: diversidad, movimiento y colonización de las hormigas de suelo” financiado por Colciencias, Programa del Medio Ambiente y del Hábitat, contrato 443. 2009: código 1106-489-25496.

LITERATURA CITADA

- Berghoff, S. M., D. J. C. Kronauer, K. J. Edwards & N. R. Franks. 2008. Dispersal and population structure of a new world predator, the army ant *Eciton burchellii*. *Journal of Evolutionary Biology*, 21: 1125-1132.
- Fernández, F. 2003. Introducción a las hormigas de la región neotropical. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá-Colombia.
- Fisher, B. L. 2010. How to identify ants. Pp. 12-13, en: *Ant ecology* (L. Lach, C. L. Parr & K. L. Abbott, eds.) Oxford University Press.
- Kronauer, D. J. C., S. M. Berghoff, S. Powell, A. J. Denny, K. J. Edwards, N. R. Franks & J. J. Boomsma. 2006. A reassessment of the mating system characteristics of the army ant *Eciton burchellii*. *Die Naturwissenschaften*, 93: 402-406.
- Lattke, J. E. 2000. Specimen processing. Building and curating an ant collection. Pp. 155-171, en: *Ants. Standard methods for measuring and monitoring biodiversity* (D. Agosti, J. D. Majer, L. E. Alonso & T. R. Schultz, eds.) Smithsonian Institution USA.
- Lattke, J. E. 2003. Conservación de una colección de hormigas. Pp. 211-220, en: *Introducción a las hormigas de la región Neotropical* (F. Fernández, ed.). Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia.
- Ramírez-Mesa, D. P. 2006. Protocolos para la preservación y manejo de colecciones biológicas. *Boletín Científico Centro de Museos, Museo de Historia Natural*, 10: 117-148.
- Villarreal, H., M. Álvarez, S. Córdoba, F. Escobar, G. Fagua, F. Gast, H. Mendoza, M. Ospina & A. M. Umaña. 2004. Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. Programas de inventarios de Biodiversidad. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia.
- Wilson, E. O. 2003. *Pheidole* in the new world a dominant, hyperdiverse ant genus. Cambridge, Massachusetts.

Recibido mayo 30, 2012, publicado julio 2012