

Técnicas básicas para el estudio de los moluscos

Julián Monge-Nájera

Biología Tropical, Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica; jmonge@uned.ac.cr

Abstract: This chapter overviews the basic techniques for statistical analysis, molecular study, photography and illustration in malacological research. A guide of how to select the appropriate statistical tests, with malacological examples, as well as digital photography, are included together with selected references.

Key words: Malacological research, techniques, digital photography.

Las técnicas de recolección de campo y estudio en laboratorio son descritas en este mismo volumen por Barrientos (2003). Aquí se presenta la lista de las técnicas básicas de análisis estadístico, estudio molecular, fotografía e ilustración de moluscos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La estadística es básica para la malacología moderna, debido a que sus estándares de calidad son mayores que los del siglo XIX, cuando se publicaba a veces con base en un puñado de especímenes. Aquí se presenta un resumen de las pruebas estadísticas con mayor probabilidad de aplicación en malacología.

Desafortunadamente, es muy común que los investigadores apliquen a sus datos análisis estadísticos sin saber si éstos son adecuados. Por ejemplo, se ha descubierto que el 54 % de los artículos publicados por el prestigioso *New England Journal of Medicine*, usan erróneamente la tradicional prueba T de Student (Godfrey 1985).

Con los datos podemos querer obtener dos tipos de resultados estadísticos: un resumen y una prueba de hipótesis. Una buena introducción por su sencillez es Daniel (1982).

Las estadísticas de resumen son esclarecedoras y prácticas. Por ejemplo, en lugar de dar al lector la lista de 5 000 mediciones de peso de un bivalvo, la cual ocuparía varias páginas que nadie querría leer, puedo mencionar que el peso medio (“promedio”) es de 20.65 g (gramos), y que la mínima es 13.47 y la máxima de 33.26 g.

Las pruebas de hipótesis son las más cercanas al objetivo de la ciencia (conocer objetivamente la naturaleza) y caen en seis grandes tipos: 1) búsqueda de tendencias en una variable o muestra, 2) probabilidad de que dos variables o muestras relacionadas provengan de una población (pero en este tipo de casos siempre es posible que provengan de dos poblaciones idénticas), 3) la misma probabilidad del caso anterior, para más de dos variables o muestras relacionadas, 4) probabilidad de que provengan de la misma población dos variables o muestras independientes, 5) lo mismo para

más de dos variables o muestras independientes y 6) la interrelación de dos o más variables. Consideraremos cada una de ellas, con ejemplos.

Una variable o una muestra

Cuando hay una sola variable o una muestra, normalmente se quiere evaluar la distribución de los individuos dentro de la muestra. Por ejemplo, para un estudio genético de la distribución de mutaciones en cefalópodos, podemos preguntar si la proporción de individuos se distribuye al azar dentro de las categorías “ectocópilos normales”, “ectocópilos ausentes” y “ectocópilos modificados”.

En estos casos son aplicables las pruebas Binomial, Chi-cuadrado, Kolmogorov-Smirnov, Rachas y Distribución de Poisson evaluada por G, Chi Cuadrado o Kolmogorov-Smirnov, según las características específicas de los datos. Para elegir la prueba dentro de esta categoría, al igual que para las siguientes, consulte los detalles de cada prueba en el libro de Zar (1974) si sus datos requieren pruebas paramétricas y el de Siegel (1956) si se trata de pruebas no paramétricas. Para los análisis multivariantes, consulte a Manly (1986).

Dos variables o dos muestras relacionadas

Cuando tenemos la oportunidad de que cada sujeto sea su propio control, podemos mejorar la confiabilidad del experimento.

Por ejemplo, si probamos el efecto de un repelente en dos gastrópodos, dándoselo solo a uno mientras el otro se enfrenta a un placebo, puede ser que el que recibió el repelente se alejó por otra razón, por ejemplo porque sea más resistente a los estímulos químicos. Pero si aplicamos unas veces el placebo y otras el repelente a un mismo individuo, y solo vemos el efecto repelente cuando se usa el repelente verdadero, sabremos que los resultados no se deben a diferencias desconocidas entre los individuos experimentales.

Para estos casos, según la escala, las pruebas correspondientes son McNemar, del Signo, Wilcoxon, Walsh, Aleatorización y t-Student*.

Mas de dos variables o mas de dos muestras relacionadas

Es un caso parecido al anterior, en que cada individuo es su propio testigo o “control”, con la diferencia de que hay más de un tratamiento.

Modificando los ejemplos anteriores, se trataría de un individuo que, además del placebo, recibe dos o más repelentes en diferentes oportunidades; las mismas plantas antes de rociarlas, después de rociarlas con repelente A, después de rociarlas con el repelente B, etc.

Para estos casos, según la escala, las pruebas correspondientes son Cochran, Friedman y ANDEVA.

Dos variables o dos muestras independientes

Aunque es deseable, no siempre es posible o práctico que el sujeto de uno o más tratamientos, sea su propio control. En este caso, trata de corregirse el efecto usando muestras muy grandes (por ejemplo, desde centenares hasta decenas de miles, según el caso), con la esperanza de que solamente difieran -de manera definida- en cuanto al tratamiento que estamos estudiando.

Ejemplos de dos variables o muestras independientes, son: una comparación de comportamiento entre calamares macho y hembra; una evaluación del efecto de cierto tratamiento en dos grupos de bivalvos, y un estudio de la distribución genética de dos poblaciones aisladas de pulmonados.

Para estos casos, según la escala, las pruebas correspondientes son Fisher, Chi Cuadrado, Mediana, Mann-Whitney, Kolmogorov-Smirnov, Wald-Wolfowitz, Moses, Aleatorización y t-Student.

Mas de dos variables o mas de dos muestras independientes

Cuando cada sujeto no es su propio control y hay más de un tratamiento, tenemos un caso de más de dos variables o muestras independientes.

Buenos ejemplos de este caso son los mencionados anteriormente, pero con varios tratamientos: una comparación de comportamiento entre calamares jóvenes, de edad mediana y viejos; una evaluación del efecto de cierto tratamiento en cinco grupos de bivalvos clasificados por tamaño, un estudio de la distribución genética de más de dos poblaciones aisladas de pulmonados.

Para estos casos, según la escala, las pruebas correspondientes son Chi Cuadrado, Mediana, Kruskal-Wallis y ANDEVA por prueba de F*.

Medidas de asociación: interrelación de dos o mas variables

Se quiere evaluar la relación existente entre varias variables. Si no hay relación significativa, podemos afirmar que ninguna de ellas es causa de la otra. Por ejemplo, el hecho de que el grado de presencia de una especie de babosa en una planta, no se relacione con la presencia de cierta enfermedad en ella, nos permite rechazar la hipótesis de que la presencia de la babosa produce los síntomas (con una probabilidad, por ejemplo, del 5 %).

Si por el contrario, la hipótesis nula se rechaza, concluimos que hay correlación entre babosa y enfermedad (son "coincidentes" o "concomitantes"), pero de ninguna manera ello bastará para afirmar que la babosa produce la enfermedad; ésta podría ocurrir en las plantas más jóvenes, preferidas por esas babosas y por algún gusano subterráneo que sí transmite la enfermedad, pero que pasó inadvertido para nosotros. Además de una sencilla correlación entre dos variables, las computadoras nos permiten medir las interrelaciones de gran cantidad de variables ("estadísticas multivariantes").

Las pruebas de significancia que se mencionan abajo indican si hay relación entre las variables. En caso positivo (hay correlación significativa) se pueden usar pruebas para identificar específicamente cuales casos son diferentes: Tukey, Newman-Keuls, Duncan, LSD y Scheffé.

De estas, suele ser más conveniente el uso de la Tukey, que además de ser robusta (resiste pequeñas violaciones a los requisitos) tiene una versión no paramétrica de aplicación general.

Las pruebas más comunes en estos casos son Contingencia por Chi cuadrado, Spearman, Kendall (Tau), Kendall, Pearson*, Biserrial, Regresión simple*, Regresión Múltiple y los Modelos log-lineales.

A partir de esta sección se trata de datos de más de dos variables, ninguna de las cuales se considera dependiente de las demás ("análisis multivariable"). Las desventajas de estas técnicas incluyen: a) necesidad de poblaciones normales y variables homogéneas, b) suponen que en todos los casos se pudo medir todas las variables (no hay casos faltantes o "missing values", aunque si son pocos se pueden sustituir por valores promedio), c) no descubren relaciones que no sean lineales (irónicamente, el examen visual de los datos sí puede descubrirlas).

Las pruebas básicas son Análisis factorial, Análisis de Componentes Principales, Análisis de Apilamiento o Grupos ("cluster"), Análisis de Función Discriminante, Correlación Canónica y Escala Multidimensional.

TÉCNICAS MOLECULARES

Las técnicas moleculares permiten analizar frecuencias alélicas para discernir procesos ecológicos en poblaciones de moluscos, incluyendo colonización, extinción e hibridización. Al nivel de individuos, permiten corroborar actos de dispersión y éxito reproductivo, por ejemplo. A nivel taxonómico, son útiles en distinguir variedades, especies, subespecies y otros niveles cuando ello no es factible por técnicas morfológicas. Este tipo de análisis se realiza en tres niveles: los cromosomas, las proteínas y el ADN.

En los cromosomas, se analizan su número, forma, tamaño y bandas mediante la elaboración de cariotipos. Las proteínas se identifican indirectamente mediante una técnica llamada electroforesis. El ADN se puede analizar en varios niveles: polimorfismos ADN nuclear,

ADN mitocondrial, secuencias repetidas en serie (*tandem repeats*) y secuenciación de ADN.

Estas técnicas pueden aprenderse por parte de la persona dedicada a la malacología, pero más frecuentemente las lleva a cabo una persona especializada en técnicas moleculares. En general, se tiene que ser crítico con la validez de estas técnicas, pues es fácil sobreestimarlas.

FOTOGRAFÍA

La fotografía de moluscos vivos resulta de especial valor si se asocia cada serie fotográfica con especímenes en una colección, de manera que siempre se pueda revisar el espécimen fotografiado para obtener o corregir la identificación de la especie conforme avanza el conocimiento taxonómico. En ocasiones, una especie que requiere días de trabajo de laboratorio para identificar un ejemplar preservado en alcohol, puede ser identificada casi de inmediato si se tiene el espécimen vivo, por su coloración y comportamiento.

Existe una amplia gama de técnicas para su uso científico (recomiendo particularmente leer a Hedgecoe 1977, adaptando mentalmente lo que dice a las características de la moderna fotografía digital), recordando que la mejor fotografía científica no solamente es técnicamente impecable, sino también ingeniosa, educativa y artísticamente buena (Durelli 1982).

Exposición

La exposición (o cantidad de luz que alcanza a la película) se gradúa de dos maneras: modificando la intensidad de la luz o bien el tiempo que ésta incide sobre la película o sensor.

En las cámaras tradicionales, la intensidad de la luz se gradúa mediante un diafragma, marcado "f" en la graduación de la cámara. Una apertura de f 5.6 permite la entrada al doble de luz que una de f 8 (y la cuarta parte que una de f 4). En las digitales, se debe monitorear la intensidad lumínica en el visor antes y después de tomar la fotografía.

Enfoque

El concepto de enfoque se refiere simplemente al hecho de que la imagen quede nítida o borrosa. En fotografía científica suele ser deseable la nitidez y se requiere un enfoque cuidadoso, que desafortunadamente no siempre es posible hacer al trabajar con animales muy móviles. El problema del enfoque varía con el tipo de lente y es particularmente difícil con moluscos pequeños.

Iluminación

Las reglas básicas de iluminación son sencillas: si hay zonas muy claras y muy oscuras, se favorece el efecto de relieve; si la iluminación es semejante en todo el sujeto, éste se "aplana".

Tanto para micro como para macrofotografía, pueden resolverse muchos problemas de iluminación con el uso de técnicas normales en otras ramas de la fotografía.

Estas técnicas incluyen pantallas (por ejemplo, trozos de tela blanca entre la fuente de luz y el objeto, para suavizar las sombras), reflectores (láminas de cartón forradas en papel metálico, para reflejar la luz hacia las partes menos iluminadas) y reflectores (espejos cóncavos o lámparas que producen un haz de luz concentrada o "spotlight").

Experimente con todos ellos. Hay que recordar que el calor de las lámparas puede dañar a los moluscos vivos e incluso a las partes blandas de los especímenes preservados, particularmente si son pequeños. Existen lámparas de fibra óptica, pero los laboratorios con presupuesto limitado pueden usar como filtro eficaz contra el calor un recipiente con agua pura entre el espécimen y la lámpara (la luz debe atravesar al menos ocho centímetros de agua). Con especímenes muy pequeños, el destellador o "flash" suele ser obligatorio y no tiene problemas de calentamiento del ejemplar.

Fondo

El fondo contra el cual se fotografía depende del sujeto: si deseamos resaltar características del sujeto, el fondo debe ser sencillo,

para que no interfiera. Si por el contrario queremos mostrar, por ejemplo, dónde vive un molusco, el fondo debe resaltar.

En fotografía en color suele ser preferible un fondo liso blanco o negro; si se usa fondo en color, no debe falsear o competir con los colores del sujeto.

Cuando trabajamos en blanco y negro, podemos usar fondos blanco, negro, gris o natural.

El fondo blanco suele ser el mejor, particularmente para sujetos oscuros. En laboratorio se puede usar como fondo blanco papel, tela, el lado mate de un "papel de aluminio" y hasta un vidrio fuertemente iluminado por detrás. Los mismos materiales sirven en el campo, pero también suele usarse un cielo claro.

En fotografías impresas (libros, revistas, etc.) el fondo blanco suele aparecer ligeramente gris. Si no desea eso, consulte al impresor sobre cómo preparar una "máscara".

Cuando los moluscos son claros se usa fondo negro, preferiblemente un paño de terciopelo grueso. El fondo gris es inconveniente en fotografías que aparecerán publicadas, pues suele reproducir mal.

Cuando es imprescindible usar fondos naturales (vegetación, arena, etc.) hay que asegurarse de "separarlos" del sujeto. Esa separación se logra desenfocando el fondo, iluminándolo menos (por ejemplo, usando flash para el sujeto) u oscureciéndolo con filtros, si es de diferente color que el sujeto.

Filtros

Los filtros son el recurso menos conocido y utilizado por los fotógrafos científicos. Su función puede ser a) filtrar un color, b) polarizar y 3) reducir la intensidad de la luz.

El filtro polarizador permite reducir los efectos de los destellos y reflejos. Se usa para disminuir reflejos al fotografiar moluscos acuáticos.

A diferencia de los filtros anteriores, que se colocan frente al lente, los filtros reductores de intensidad se ponen frente a la lámpara (rara vez son necesarios).

Es útil saber que los filtros ultravioleta corrientes no dejan pasar la luz ultravioleta, pero existe un tipo especial, usado por ejemplo para estudiar cómo ven los artrópodos, que únicamente deja pasar la luz ultravioleta.

La mayoría de los moluscos requieren un lente macrofotográfico. Requiere un minitrípode o aun mejor, colocar la cámara sobre una bolsa de arroz o arena, lo cual permite graduar su inclinación y eliminar las vibraciones. Un flash automático suele ser muy útil, y con lentes de $f/32$ se logra una excelente profundidad de campo.

En laboratorio, el lente macrofotográfico permite fotografiar desde 1x hasta 40x, haciendo innecesario el microscopio de disección. Cuando se trabaja con moluscos transparentes o con patrones de tonalidad leves pero importantes, conviene sumergirlos en agua. Los lentes de mayor distancia focal dan menor distorsión de imagen y es recomendable usar exposiciones cortas, pues la vibración causa desenfoque.

Microfotografía

La fotografía con microscopio es básicamente fotografía macro llevada al extremo y presenta sus mismos problemas también en grado extremo. Me refiero al microscopio de luz, pues el electrónico viene especialmente diseñado para resolver muchos de estos problemas.

El enfoque es particularmente delicado y solamente la experimentación puede descubrir las condiciones óptimas de microfotografía para su caso particular, según el equipo del que usted disponga. La ventaja con las cámaras digitales es que se puede repetir la fotografía casi de inmediato si algo sale mal.

La visibilidad de las estructuras es un problema que se resuelve con las mismas técnicas usadas para observar preparaciones microscópicas. Aquí es especialmente recomendable aprovecharse de los filtros (un filtro azul suele ser básico para corregir el color de la lámpara del microscopio).

El uso de luz polarizada también es útil con sujetos transparentes, aunque una nueva técnica desarrollada por Francisco Hernández

(Universidad de Costa Rica) resuelve fundamentalmente el problema de la transparencia en sujetos muertos si se les recubre primero con el “cobertor iónico” usado en microscopía electrónica y entonces se les observa con microscopio de luz.

Casos especiales

Las principales técnicas especiales son la estereofotografía, y la fotografía infrarroja y la ultravioleta.

Estereofotografía

La estereofotografía produce dos fotografías ligeramente diferentes, que vistas simultáneamente dan la impresión de profundidad. Es muy útil para ver el volumen de las conchas. Para preparaciones con microscopio de luz y electrónico, se logra así: tomamos una primera fotografía, giramos un poco el sujeto hacia la izquierda, y tomamos una segunda fotografía. Mientras más se gire el sujeto -dentro de lo razonable- mayor será el efecto de relieve.

Fotografía infrarroja

La fotografía infrarroja, que requiere un tipo de película especial, permite por ejemplo ver a través de la neblina y fotografiar de noche sin usar flash (a lo sumo, usa un flash infrarrojo que es invisible para nosotros). El enfoque se realiza con la marca roja del lente, pero el resto de sus normas son similares a las de la fotografía corriente.

Su uso inicial fue principalmente descubrir documentos falsificados, leer cartas en sobres cerrados, etc., pero en biología tiene una amplia gama de aplicaciones, interesando a la malacología el distinguir patrones estructurales en fósiles y mostrar detalles en microfotografía (Anónimo 1961).

Fotografía ultravioleta

La fotografía ultravioleta tiene usos similares a los de la infrarroja, pero no requiere una película especial. Basta la película corriente en blanco y negro o color, junto con luces de arco como las usadas en los cines y

filtros ultravioleta. Son necesarias exposiciones largas (por ejemplo, ocho segundos) y protección para los ojos.

ILUSTRACIÓN

A pesar del desarrollo de la fotografía digital, todavía suele resultar necesario dibujar especímenes y sus partes, sea por técnicas tradicionales o mediante técnicas de dibujo por computadora.

Para darse una idea de la generalidad del molusco, obsérvelo con los ojos semicerrados. En lo posible tóquelo y familiarícese con la forma y la textura. Colóquelo en posición con plasticina o toallas de papel húmedas y arrugadas. Use un fondo blanco para trabajar con objetos sencillos y uno oscuro si tienen muchos detalles.

La perspectiva corresponde a la manera en que la distancia afecta la apariencia de los sujetos y es explicada por la geometría euclidiana.

La perspectiva tiene dos reglas simples:

1. Las líneas paralelas que se alejan parecen converger en un punto distante.
2. Los objetos más lejanos se ven más pequeños y menos definidos.

Una buena ilustración científica es a la vez realista (precisa) y artísticamente agradable. A diferencia de la fotografía (que documenta un hecho científico), la ilustración interpreta al sujeto (Herdeg 1973, Wood 1979, Walker 1980).

El ilustrador omite los detalles superfluos, enfatiza lo importante sin distorsionar, reconstruye a partir de fragmentos, idealiza (produciendo un ejemplar “típico” a partir de la variedad de ejemplares reales), “corrige” partes dañadas o faltantes en el ejemplar y puede situarlo en un ambiente realista, recreando la vida.

Existen compases especiales (“proportional dividers”) que automáticamente amplifican o disminuyen las medidas a la escala del dibujo. También puede usarse un vidrio opaco situado como pantalla entre el observador y el dibujo y, para material visto al microscopio, una *camara lucida* o un objetivo con malla.

Hay proyectores para dibujo ("lazy lucy") y se pueden proyectar diapositivas o calcar fotografías. La escala del dibujo también puede cambiarse mediante reducciones o ampliaciones de fotocopidora (en grados extremos, causan distorsión: pruebe primero con papel cuadriculado para medirla). Todos estos métodos sirven para hacer la generalidad del dibujo, pero los detalles deben hacerse manualmente.

Si no se trabaja directamente sobre la superficie final de dibujo, puede calcarse con papel pergamino, o usar los sistemas de puntos perforados, fotocopiado, papel carbón o papeles especiales de transferencia ("tracing paper").

La esfera es excelente para estudiar los efectos de luz y sombra, que tienen cuatro valores: brillo, sombra intermedia, sombra densa y reflejo. Recuerde que por convención, la luz debe venir desde arriba a la izquierda. La sombra reflejada es una deformación del contorno del objeto y ayuda a establecer su morfología.

Muchos especímenes malacológicos tienen partes que son translúcidas o de apariencia acuosa que es difícil de dibujar. Practique con una esfera de aceite de hígado: preste gran atención al papel del segundo brillo en dar la apariencia líquida.

Hay un sombreado incluso en los dibujos lineales, que se basa en el grosor de las líneas: las zonas oscuras se indican con líneas más gruesas.

Los tipos básicos de sombreado son los siguientes: líneas de contorno de grosor fijo o variable, punteado (real o con "coquille-board"), pincel (acuarela o tinta), grafito en polvo, lápiz de grafito o ceroso y pistola ("air brush"). Un buen recurso para corregir o dar toques de brillo, es el uso de pigmento blanco (pintura, tinta especial) o raspado mediante bisturí o borrador (normal o eléctrico). Hay equivalentes digitales de todas estas técnicas.

Los rotulados se agregan con la computadora. Es preferible que cada rótulo quede tan cerca de la estructura correspondiente, que no sea necesario agregarle líneas indicadoras; en tal caso cada rótulo queda a una distancia fija de la estructura. Si hay líneas indicadoras,

conviene alinear todos los rótulos al margen izquierdo. Lea los rótulos en voz alta para identificar los mejores lugares para separar oraciones.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco los comentarios de Bernal Morera.

REFERENCIAS A ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

- Barrientos, Z. 2003. Aspectos básicos sobre la clasificación, recolección, toma de datos y conservación de los moluscos. *Rev. Biol. Trop.* 51 (Suppl. 3): 13-30.
- Daniel, W.W. 1982. *Bioestadística*. Limusa, México, D.F. 485 p.
- Godfrey, K. 1985. Comparing the means of several groups. *New England Journal of Medicine* 313 (23): 1450-1456.
- Manly, B.F.J. 1986. *Multivariate Statistical Methods: A Primer*. Chapman y Hall, Londres. 159 p.
- Siegel, S. 1956. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. McGraw-Hill, Nueva York. 311 p.
- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, Nueva Jersey. 718 p.

REFERENCIAS A TÉCNICAS MOLECULARES

- Davis, L.G. 1994. *Basic Methods in Molecular Biology*. Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut. 722 p.
- Kaufman, P., W. Wu & D. Kim. 1995. *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*. CRC, Boca Ratón, Florida. 500 p.

REFERENCIAS A FOTOGRAFÍAS

- Anónimo. 1961. *Infrared and ultraviolet photography*. Eastman Kodak, Nueva York. 48 p.

- Blaker, A.A. 1977. Handbook for scientific photography. W.H. Freeman, San Francisco. 319 p.
- Durelli, A.J. 1982. La fotografía científica como expresión artística. Universidad Nacional Autónoma, México. s.p.
- Feininger, A. 1969. Arte y técnica en fotografía. Hispano-Europea, Barcelona.
- Hedgecoe, J. 1977. Manual de Técnica Fotográfica. Blume, Madrid. 352 p.
- Spencer, D.A. 1974. Fotografía aplicada. Omega, Barcelona. 605 p.
- Thomson, D.J. & S. Bradbury. 1987. An Introduction to Photomicrography. Oxford University, Nueva York. 73 p.

REFERENCIAS A ILUSTRACIONES

- Walker, L. 1980. Nature drawing. Prentice Hall, Nueva Jersey.
- Herdeg, W. (ed.). 1973. The artist in the service of science. Graphis, Zurich, Suiza.
- Wood, P. 1979. Scientific Illustration. Van Nostrand Reinhold, Nueva York. 148 p.