

ESTUDIO CRÍTICO SOBRE TÉCNICAS DE MONTAJE DE CÓCCIDOS (INSECTA-HOMOPTERA-COCCOIDEA) *

Los estudios ecológicos y biogeográficos, bien que uno trabaje con plantas o con animales necesitan, además de los factores geográficos y ecológicos, de trabajos sistemáticos que permitan establecer sus bases. La determinación correcta de una especie conducirá a conocer mejor las diferentes relaciones con las especies vecinas, el biotopo que ella habita, su evolución en un cierto medio, su papel dentro del equilibrio biológico, el establecimiento de su origen, su utilización en otras ramas de la ciencia, particularmente la Genética, etcétera.

Por todas estas razones, se debe prestar una gran atención a la identificación precisa de las especies.

A pesar de la habilidad de los taxónomos de reconocer las especies del grupo del cual son especialistas, la preparación cuidadosa del material, sobre todo en el caso de ciertos artrópodos, juega un papel esencial, pues ello permitirá su estudio con la mejor precisión posible. Puede llegar a suceder que, varias personas, trabajando sobre el mismo material, lo clasifiquen en varias especies, por la utilización de diferentes técnicas de montaje.

Para ciertos grupos de artrópodos (Insecta y Arachnida-Acarina, principalmente), se utilizan ciertas técnicas de montaje para estudiarlos y conservarlos dentro de colecciones diferentes a las desarrolladas tradicionalmente. Para ellos, no se utilizan los alfileres y cajas entomológicas cerradas herméticamente, sino las preparaciones microscópicas en laminillas de vidrio.

Entre los grupos de insectos, en los cuales se tiene necesidad de hacer tal montaje, se pueden citar los siguientes: Protura, Collembola, Diplura, Thysanura, Thysanoptera, Psocoptera, Homoptera (Sternorrhyncha), Embioptera, Mallophaga, Anoplura, Strepsiptera y Siphonaptera. Con cierta frecuencia, deben hacerse montajes de ciertas partes de los insectos, por ejemplo, el aparato bucal o la genitalia, como ocurre entre los coleópteros y lepidópteros, o bien para los estadios jóvenes de numerosos grupos.

De todos los órdenes de insectos que se han citado, se pueden hacer montajes temporales o permanentes. El primer caso se aplica solamente en trabajos de rutina; pero, si el material es importante, se puede hacer un montaje permanente o definitivo, y tal es el caso de los cóccidos (llamados comúnmente cochinillas, escamas o piojos harinosos).

En general, los cóccidos colectados en la naturaleza, son colocados directamente en tubitos de vidrio con alcohol 70°, pero es importante tomar algunas notas antes de ponerlos en el alcohol, ya que la cera que los cubre puede disolverse (se debe anotar su abundancia, color, consistencia y forma). En muchos casos, cuando la cera es muy dura (algunas veces casi cristalina, como en los laccíferidos) se les puede conservar dentro de sobres y en lugares secos, para evitar la presencia de hongos saprófitos, que los pueden destruir. Balachowsky (1942) y Kosztarab (1963) prefieren los sobres de celofán asegurados con clips, para luego protegerlos y guardarlos en sobres de colección de papel manila.

Schulze (1915) utiliza una mezcla de glicerina (200 ml), agua destilada (200 ml) y cristales de fenol (1 g) para conservar, no solamente los cóccidos, sino también las partes de las plantas hospederas sobre las cuales están adheridos. La mayoría de los colectores conservan a los cóccidos dentro de tubitos de vidrio con alcohol de 70°. Es a partir de tal material que se hace el montaje en preparaciones microscópicas.

Fuera de aquellos casos donde es necesario teñir el material para hacer estudios histológicos, no existe ningún otro grupo de insectos, exceptuando a los cóccidos,

* Este trabajo fue presentado por el autor como Segunda Tesis, para obtener el grado de Doctor de la Universidad de París, Francia, el 17 de octubre de 1969.

que requiera una coloración para su estudio. Se debe agregar además, que el montaje del insecto se hace *in toto* y no solamente en parte, ya que, para estudiar a los cóccidos, desde el punto de vista de la sistemática, deben hacerse resaltar ciertas estructuras que se utilizan para clasificarlos: las glándulas y túbulos productores de cera, por ejemplo, que tienen un gran valor taxonómico.

MANIPULACIÓN DEL MATERIAL

A diferencia de otros insectos, los cuales una vez clavados en alfileres y rectificada la posición de patas y antenas, no se tocan de nuevo, los cóccidos deben sufrir una serie de manipulaciones que pueden ocasionarles daños profundos que los estropean parcial o totalmente. Este deterioro puede impedir la apreciación de caracteres morfológicos para la identificación del material.

Entre los daños que el material de estudio puede sufrir se citan los siguientes:

a) Al momento de cortar las ramas o las hojas parasitadas por los cóccidos y meterlas dentro de sobres de celofán o de papel, se puede aplastar a los insectos si se ponen varias muestras sin ninguna precaución, dentro del saco de colecta. Por otra parte, ciertos cóccidos que tienen una vida libre, se pueden desplazar dentro de los sobres e irse a esconder entre los pliegues, de tal suerte que al momento de abrir los sobres uno los puede aplastar o romper. El aspecto de la secreción cerosa después de tal accidente no tendrá ningún valor, si no existe ningún dato sobre la disposición de la cera antes del accidente.

b) Las cochinillas pueden ser atacadas por hongos y moho inutilizándolas, cosa debida principalmente a la humedad propia de la planta hospedera. Sólo un material seco y guardado en un lugar igualmente seco, permitirá conservar las muestras en buenas condiciones de estudio.

c) Con cierta frecuencia, al separar los insectos vivos de sus plantas hospederas, con la ayuda de una aguja entomológica o un bisturí fino, uno puede dañar los bordes de los cóccidos (*Saissetia* y *Coccus* por ejemplo), ya que están perfectamente adheridos a su huésped. Es necesario levantar suavemente el tejido vegetal con todo y el insecto, para no dañar los tejidos suaves de las larvas y hembras jóvenes.

d) Un poco más tarde, durante el curso del montaje, es necesario hacer un tratamiento a base de potasa para aclarar el material, y como en la mayoría de los casos se hace en caliente, la acción enérgica de la potasa puede causar daños de importancia: los insectos se inflan y su talla aumenta algunas veces hasta explotar; si se trata solamente de un inflamiento, las medidas son, a pesar de todo, erróneas; con cierta frecuencia ocurre el desprendimiento de antenas y patas (principalmente los fémures, tibias y tarsos). Green (1914) hace el comentario siguiente: "un tratamiento prolongado hace que la cutícula quede muy frágil y se romperá durante las manipulaciones siguientes".

Los tratamientos vigorosos con KOH pueden ocasionar ciertas deformaciones de las glándulas y tubos cerígenos: pliegues, arrugas, rompimiento de las paredes de las glándulas tri-, penta- y multiloculares, etcétera.

e) Cuando se llega a la fase de deshidratación del material, éste está expuesto a nuevas manipulaciones y reacciones: por un lado el paso de 4 o 5 baños de alcoholes diferentes (60°, 70°, 80°, 90° y absoluto) utilizando agujas lanceoladas metálicas o tiras de papel; por otra parte la deshidratación puede ser tan violenta, que hace que el insecto gire sobre sí mismo a una velocidad increíble, produciendo, evidentemente, daños al material.

f) El montaje mismo, al pasar el material de un medio líquido a un medio espeso, como lo es el bálsamo de Canadá, produce algunos daños importantes, sobre todo en los apéndices, como las patas y las antenas, ya que al momento de colocarlos sobre el porta-objetos se quedan pegados a las agujas y terminan por romperse. Es por ello necesario licuar el bálsamo de Canadá para evitarlo.

g) En último lugar, al momento de colocar el cubre-objetos, el insecto puede algunas veces desplazarse hacia los bordes de la gota de bálsamo, quedándose plisado, o bien superpuesto a otros ejemplares, lo que ocasiona un problema para estudiar el material.

La técnica publicada por Berro (1931) que consiste en pegar los ejemplares sobre el porta-objetos utilizando la albúmina de huevo, evitaría muchos pasos, pero desafortunadamente la albúmina se colorea con la fucsina (el colorante más utilizado), y produce interferencias con el material por estudiar.

El exceso de colorante crea igualmente problemas, principalmente cuando el colorante está muy concentrado, impidiendo el examen preciso de los componentes de ciertos elementos. Por ejemplo, cuando se sobretiñen las glándulas quinque- o pluriloculares, parecen estar compuestas de un solo elemento, sin ninguna división.

A pesar de todos los inconvenientes que se han anotado, el montaje de los cóccidos es necesario si uno desea estudiarlos. Si se ha insistido sobre los diferentes problemas que se presentan en el curso del montaje, es por el hecho de que es mejor perder un poco de tiempo suplementario para obtener una buena preparación al respetar todas las fases, comprendiendo también su duración, que hacer un trabajo rápido en el cual las negligencias impedirán un estudio preciso del material.

La cutícula de los cóccidos es, en general, muy fina, y en los ejemplares tratados aparece como una película, muy delgada y transparente, que debe ser teñida para apreciar las glándulas, poros, sedas, etcétera. La textura es casi membranosa en su totalidad, aun cuando en ciertos géneros existen áreas fuertemente esclerosadas.

El estudio de los cóccidos está siempre basado en los órganos glandulares tegumentarios, que son el origen de abundantes secreciones cerosas, de laca o de seda que los caracterizan; estos órganos glandulares son de tipos muy variados, tanto en su estructura cuanto a su localización. Frecuentemente se trata de glándulas pluriloculares hipodérmicas en las cuales los poros secretores, de forma y número variables, están sostenidas por un disco cuticular característico. A él se asocian igualmente pelos glandulares que conviene distinguir de las sedas sensoriales o de las espinas. Estas ornamentaciones cuticulares (espinas, sedas o poros glandulares) son fáciles de observar en insectos aclarados, después del tratamiento con la potasa, y teñidos, generalmente, a base de fucsina (Ramos Elorduy, 1966).

Entre una treintena de autores que se han consultado, todos están de acuerdo sobre las diversas operaciones que son necesarias para el montaje de cóccidos: aclarado, tinción, deshidratación y montaje, pero no son acordes en la duración de las diversas fases, la concentración de los productos, y algunas veces, los productos mismos.

Es por tanto necesario hacer notar que casi todos los autores dan una sola técnica de montaje para los diferentes grupos de cóccidos, técnica que debe ser modificada en función del material por preparar: insectos que secretan cera pulverulenta, insectos en los cuales la cera forma parte del cuerpo, o bien insectos desprovistos de tal elemento.

Se pueden resumir los tratamientos para los tres tipos principales de cóccidos, de la manera siguiente:

I) El gran grupo de los diaspídidos, que están protegidos por un escudo. Debajo de él o enmedio de él (por ausencia o presencia de velo ventral) se encuentra la hembra desprovista de toda secreción cerosa, que la hace fácil de montar. Aquí, el tratamiento potásico debe ser algo rápido, puesto que casi no existe ningún elemento fuertemente esclerosado: éstos son los cóccidos con tegumentos suaves. La coloración del pigidio es de importancia primordial.

II) El segundo tipo es aquel formado por los cóccidos que secretan una capa protectora de cera, de aspecto pulverulento, afieltrado, lanoso, filamentosos o laminar, que protege a los adultos que poseen tegumentos suaves, como es el caso de los margaródidos, ortézidos, pseudocóccidos y eriocóccidos. El tratamiento con la potasa para eliminar esta cera debe ser prolongado ligeramente, así como el tiempo de tinción, ya que muchos elementos deben hacerse resaltar: glándulas tri-, quique- y pluriloculares, tubos cerígenos, sedas, etcétera.

III) Los grupos de lacciféridos, cóccidos, asterolecanídeos, kermésidos y concháspidos, en los cuales la cera forma parte del cuerpo del insecto, deben sufrir un tratamiento

mucho más enérgico, ya que no solamente es necesario aclarar la espesa cutícula, sino la cera que está almacenada en su espesor (Benassy, 1961). La textura y la ornamentación cuticular son, en numerosos casos, decisivas para la identificación de especies.

DIAFANIZACIÓN DEL MATERIAL

La utilización de KOH predomina entre los autores para aclarar a los insectos, pero su uso depende de los autores mismos y de la finalidad de la preparación, sea ésta temporal o permanente. Essig (1948) prefiere la sosa (NaOH) para el montaje de pulgones (Aphididae), puesto que este producto es menos fuerte que la potasa (KOH), la cual puede destruir ciertos pigmentos de los pulgones.

La concentración de la potasa más recomendada es aquella al 10%, en frío o en caliente; en algunos casos puede ser utilizada al 5% o al 8%. Es evidente que el tratamiento en frío debe durar varias horas (Borchsenius, 1950), y algunas veces varios días (Hoy, 1962), pero con la potasa caliente el tiempo se reduce a algunos minutos (5 a 30 minutos) (Balachowsky y Gosselin, 1950) y (Williams, 1969).

Se recomienda calentar a baño-María, sobre una platina metálica caliente, o con una llama muy pequeña, sin llegar a la ebullición. Es deseable hacer un calentamiento lento y prolongado de la potasa, para obtener un aclarado uniforme y no dañar el material, en vez de realizar un calentamiento enérgico y violento, pensando reducir el tiempo de montaje. Por esta "pérdida de tiempo" se obtendrá una preparación microscópica de una calidad inmejorable.

Evidentemente, el escoger uno u otro método depende del tiempo del que uno dispone para el montaje: en los trabajos de rutina, es el tiempo lo que cuenta, ya que la gran cantidad de muestras exige un estudio rápido, desgraciadamente superficial, pero quizás suficiente para que una persona experimentada pueda reconocer las especies más comunes. Para el verdadero investigador, y sobre todo en los trabajos de fondo, se requiere un montaje más preciso en todos sus aspectos: una misma concentración de los productos, colorantes preparados recientemente con las cantidades bien graduadas, efectuar todas las etapas del proceso de montaje con los tiempos señalados, sobre todo al momento de la tinción, la cual es al final, la clave del trabajo.

Algunas veces, después del tratamiento con la potasa, se forman cristales en el interior del cuerpo del insecto. Su eliminación es fácil, siguiendo las indicaciones de Kosarzewskaya (1968): "es necesario dejar los ejemplares unos minutos en alcohol de 95° para eliminar el carbol-xilol. La composición del carbol-xilol es de 3 partes de xilol y 1 parte de cristales de ácido carbólico (fenol)".

En general, se debe hacer una perforación en la parte anterior de la cara dorsal del cuerpo, o bien de lado, la cual permitirá vaciar al insecto. Para las especies fijadas en alcohol de 70° esto se hace antes de pasarlas a la potasa caliente, pero para los cóccidos secos, como lo son los diaspíridos y pseudodiaspíridos, esta operación se hace reblandeciéndolos antes en potasa fría. El cuerpo del insecto se vacía cuando la potasa está aún caliente.

leyendo a Hille Ris Lambers (1950) quien ha estudiado las técnicas de montaje de afidos, se encuentra que la eliminación de los embriones que están en el interior del cuerpo de la hembra no es necesaria para el estudio de los pulgones. Ello no es válido para los cóccidos, ya que cuando se tiñe el material, los embriones se colorean también, y estorban la observación, tanto más que, para los cóccidos, es necesario examinar las dos caras, dorsal y ventral.

Hanson (1954) cita una técnica para vaciar a los ejemplares sin dañarlos y sin pérdida de tiempo: "Después del tratamiento con la potasa, pasar los insectos 1 o 2 minutos a alcohol de 95°. Después de ello se vuelven a colocar los insectos en la potasa caliente: el alcohol hierve inmediatamente a causa de la diferencia del punto de ebullición, saliendo todo el contenido del cuerpo a través de una perforación del tegumento que se ha hecho previamente."

Se está de acuerdo con Green (1914) y Essig (1948) en lo que se refiere sobre al trato de las formas aladas de machos de cóccidos y de pulgones, ya que el tratamiento violento en la potasa, sobre todo si llega a hervir, puede desgarrar y plegar las alas, que pueden también engancharse en las patas, sufriendo así daños irreparables. Es mejor dejarlos en la potasa fría durante un tiempo bastante largo, o bien

en la estufa, a temperaturas de 32° a 35° durante 5 o 6 horas, lo cual mantendrá a la potasa tibia, pero sin llegar a hervir.

Después del tratamiento con la potasa las muestras deben ser lavadas, paso indispensable para eliminar las trazas de KOH que quedasen dentro del cuerpo del insecto o en los tegumentos. Balachowsky y Gosselin (1950) prefieren el alcohol 70° hirviendo al agua destilada (habitualmente aconsejada para esta operación), ya que el material se sumerge más fácilmente. Con el agua destilada los ejemplares tienen la tendencia a quedarse en la superficie y conservan frecuentemente trazas de la potasa después del lavado.

Es posible también utilizar la técnica seguida por el personal del Museo Británico (Historia Natural): Williams (1969) recomienda el uso de alcohol acidulado (80 partes de alcohol 50° por 20 partes de ácido acético glacial) durante una hora para el lavado después del tratamiento potásico.

Se ha dicho que el tratamiento con KOH es casi obligatorio para el aclarado de los cóccidos e igualmente para muchos otros grupos; sin embargo, McKenzie (1967) se vale de la técnica de Wilkey (1962) para el montaje de pseudocóccidos y cóccidos, que no utiliza la potasa, sino la fórmula modificada de Essig (1948) preparada para el montaje de áfidos ("Essig Aphid Fluid") (se ha agregado la palabra "modificada" ya que las cantidades no son las mismas y falta el alcohol etílico de la fórmula original de Essig). Wilkey (1962) habla de este método en los términos siguientes: "la utilización de soluciones aclaradoras a base de productos cáusticos es siempre algo aventurada, especialmente cuando se trata de individuos delicados; su localización en las soluciones durante las transferencias de baño en baño es difícil; y, en fin, los ejemplares después de colorearlos con los métodos convencionales, quedan poco o sobreteñidos. Una de las ventajas de este método es la reducción en el número de pasos, muy ventajosa cuando uno trabaja con ejemplares muy poco quitinizados".

En esta técnica se debe colocar la muestra en el líquido de Essig modificado y calentar sobre la platina (48° - 54°) durante 10 o 15 minutos; una incisión lateral practicada entre el par de patas anteriores y medianas, ayudará a aclarar a los individuos más rápidamente. Después de este tratamiento se puede hacer la tinción del material por la técnica descrita por Wilkey (1962) y comentada más adelante.

Habiendo terminado el primer tiempo en la preparación del material, está listo para seguir las etapas siguientes, pero algunos autores, Green (1917) por ejemplo sugiere el examinar el material bajo el microscopio antes de continuar; esta observación preliminar permitirá verdaderamente decidir si el material está en buenas condiciones para ser preparado.

¿Qué es lo que impediría continuar con el proceso de montaje? Primeramente, se puede tratar de un material muy dañado, debido a que llegó en ese estado del campo, o que el tratamiento con la potasa haya sido muy violento; en segundo lugar, se puede tratar de ejemplares muy viejos que han estado pegados a las paredes de los tubos de colecta, tan secos que las dos caras de los insectos, dorsal y ventral, son inseparables, lo cual impide su examen; un tercer caso puede ser la presencia de hongos saprófitos, cuyas hifas invaden el interior del cuerpo de las escamas y cochinillas. Pero, es evidente que si se trata de un material excepcionalmente raro o único, entonces se deben hacer todos los esfuerzos posibles para sacarle el mejor partido y tener una preparación definitiva.

TINCIÓN DEL MATERIAL

El teñido de los cóccidos es tan importante como el aclarado, ya que todos los caracteres utilizados en la sistemática del grupo aparecen cuando se agrega el colorante. La mayor parte de los autores han escogido la fucsina, pero hay numerosas variantes en su fórmula de utilización. Primeramente hay que mencionar la existencia de dos tipos de fucsina, la ácida y la básica (rojo-magenta), y también dos tipos de soluciones, la alcohólica y la acuosa. Aún más, la fucsina ácida puede ser disuelta, ya sea en un ácido orgánico ($\text{CH}_3\text{-COOH}$), o en un ácido inorgánico (HCl).

En seguida se presentan las diferentes variantes:

Fucsina ácida fuerte (Gage, 1919) :

Fucsina ácida	0.5 g
HCl al 10%	25 ml
Agua destilada	300 ml

Fucsina ácida débil (Borchsenius, 1950) :

Fucsina ácida	1 g
Alcohol de 96°	10 ml
Ácido acético glacial	5 ml
Agua destilada	100 ml

Fucsina básica (rojo magenta) (Balachowsky y Gosselin, 1950) :

Fucsina básica	1 g
Alcohol absoluto	125 ml

Con esta solución madre se prepara una segunda solución de la manera siguiente: Se decanta la solución madre en un frasco de 125 ml, casi hasta la mitad y se agrega alcohol absoluto o más solución madre concentrada, hasta tener sensiblemente el color de un "buen vino rojo" (Balachowsky y Gosselin, 1950).

Fucsina básica para diaspídidos (McKenzie, 1956) :

Este autor utiliza una solución de alcohol etílico al 50% y agrega unos cristales de fucsina básica. Agitar hasta que la solución tome un color rojo sangre oscuro.

Fucsina ácida para pseudocócidos (Wilkey, 1962 y McKenzie, 1967) :

Para las cochinillas o escamas pertenecientes al grupo de los pseudocócidos, estos autores recomiendan la preparación de dos soluciones colorantes, que pueden utilizarse indistintamente:

- | | |
|--|----------|
| 1) Líquido de Essig modificado | 15 ml |
| Fucsina ácida en solución acuosa al 2% | 20 gotas |
| 2) Líquido de Essig modificado | 15 ml |
| Fucsina ácida, solución acuosa al 2% | 20 gotas |
| Rosa de lignina, solución acuosa al 2% | 20 gotas |
| Eritrosina, solución acuosa al 2% | 20 gotas |

Brain (1915) y Da Costa Lima (1921) utilizan una solución a base de fucsina fenicada de Ziehl-Nielson, que tiene la fórmula siguiente:

Fucsina ácida	1 g
Fenol	5 g
Alcohol absoluto	10 ml
Agua destilada	100 ml

Berro (1931) presenta una técnica muy interesante para teñir los diaspídidos, ya que se trata de hacer una doble tinción. La primera es a base de fucsina básica (rojo magenta) en una solución alcohólica al 1%; para la segunda, él utiliza una solución de verde malaquita-violeta de dalia (0.5 g de cada colorante disuelto en 100 ml de agua destilada). La fucsina hace más evidentes las paletas y elementos esclerosados del pigidio, mientras que el verde de malaquita-violeta de dalia colorea los peines y las glándulas productoras de cera.

Otros colorantes han sido experimentados por otros autores, pero su uso ha sido poco empleado por los investigadores; entre estos colorantes se pueden citar, la hematoxilina de Delafield (Stafford, 1915), el ácido pirogálico (Carayon, 1951), el negro de clorazol (Carayon, 1969) y la anilina azul (Wilkey, 1962).

Essig (1948) tiñe los áfidos utilizando la fucsina básica (rojo magenta), a pesar que dice que la coloración que toman los embriones dentro del cuerpo de la hembra produce una masa opaca que impide examinar el material; aún más, él continúa diciendo que la coloración muy oscura oculta la pigmentación de ciertos elementos necesarios para identificar a los insectos. Hille Ris Lambers (1950) explica que no es necesario teñir a los áfidos, ya que no se encuentra ninguna diferencia entre el material coloreado y el no coloreado, añadiendo que con la tinción se pierde el contraste entre las áreas pigmentadas y las no pigmentadas de los terguitos, contrastes que son esenciales para la clasificación moderna de los áfidos.

Es interesante hacer notar una observación de McKenzie (1967), que dice: "Las especies varían en sus reacciones a la coloración, algunas varían a un rojo más oscuro que otras después de haber pasado el mismo tiempo en la solución colorante. Esto puede ser una ventaja en ciertos casos, especialmente cuando 2 especies están mezcladas sobre una misma planta huésped e inseparables a la hora de colectarlas. Así, las muestras pueden ser fácilmente separadas por especies, antes de su montaje."

TIEMPOS DE TINCIÓN

Al consultar los diversos autores se encuentra que, hay una enorme variación en lo que concierne al tiempo de teñido: todos los autores señalan una duración que varía de 5 a 30 minutos, siendo los tiempos más frecuentes aquellos comprendidos entre 5 y 10 minutos (Balachowsky y Gosselin, 1950; Borksenius, 1950; Berro, 1931; Hoy, 1962; Kosarzewska, 1968; y Kosztarab, 1963); pero algunas veces ciertos investigadores aconsejan dejar el material durante una hora (Williams, 1969), 2 a 3 horas (Borchsenius, 1950), 24 horas (Kosarzewska, 1968 y Williams, 1969), y aun 100 horas (Stafford, 1915).

Es evidente que estas diferencias son debidas al tipo de material estudiado, ya que las cochinillas y escamas de talla pequeña (algunas veces menos de un milímetro) y con una cutícula poco esclerosada, necesitan de una tinción ligera y corta; al contrario, el material perteneciente a grupos donde sus representantes son de gran talla (de 4 a 5 mm hasta casi 25 a 30 mm) necesitan un tiempo de coloración más largo, ya que ellos poseen elementos esclerosados más numerosos y más espesos, de ahí la necesidad de una tinción mucho más enérgica y profunda. Finalmente es la propia experiencia del investigador la que le da el tiempo exacto de coloración del material que él está por estudiar, pero sin desconocer la experiencia de otros investigadores. Nuestra propia experiencia nos da de 15 a 30 minutos para los díptidos, y de 12 a 24 horas para los otros grupos.

DESHIDRATACIÓN DEL MATERIAL

Se ha dicho que el teñido del material por estudiar debe hacerse antes de la deshidratación, y ello es debido a que la mayor parte de los autores utilizan colorantes en soluciones acuosas, y es por lo tanto la secuencia lógica de los pasos del montaje. Pero si se utiliza la solución alcohólica (Balachowsky y Gosselin, 1950), la deshidratación precede a la tinción. Ya sea que la deshidratación sea antes o después de la tinción, en general se realiza utilizando una serie de soluciones alcohólicas 50, 60, 70, 80, 90 y 100° (alcohol absoluto) para terminar en xilol puro, esencia de clavo o esencia de lavanda. Ciertos autores pasan directamente del alcohol 50° o 70° a la esencia de clavo (McKenzie, 1956), o bien ellos trabajan con fenol (Da Costa Lima, 1942) o el cloralfenol (Balachowsky y Gosselin, 1950), para pasar después a una solución fenol-xilol (75-25) en seguida a xilol-fenol (75-25), como es el caso de Da Costa Lima (1921), o alcohol y xilol puro, como lo hacen Balachowsky y Gosselin (1950).

Hay que considerar que una deshidratación violenta produce una contracción y una deformación de los tejidos y órganos poco esclerosados, pudiendo ocurrir algunos errores de observación al momento de estudiar el material así preparado. Un tratamiento largo, sobre todo cuando existen cientos de muestras por montar, es difícil de aconsejar, es por ello que deben de ensayarse otros métodos más rápidos, pero sin embargo, suficientemente eficaces.

Es necesario recordar que cualquiera que sea la solución colorante utilizada, alcohólica o acuosa, deberá realizarse la deshidratación en el momento justo, es decir que si se utiliza la solución colorante alcohólica, es necesario deshidratar antes; pero, si la solución colorante es acuosa, deberá por tanto realizarse el deshidratado después del teñido.

Muchos autores terminan la deshidratación colocando su material en xilol puro (Borchsenius, 1950; McKenzie, 1956; Da Costa Lima, 1942; y Berro, 1931); otros, en esencia de clavo (Kosztarab, 1963 y Williams, 1969); en fin, Balachowsky y Gosselin (1950) utilizan la esencia de lavanda, la cual es miscible en el bálsamo de Canadá, y además reblandece los ejemplares endurecidos por el xilol.

McKenzie (1967) utiliza algunas gotas de tetrahidrofurano para provocar la deshidratación, pero si el baño es muy prolongado, el material se encoge. Él hace el comentario siguiente: "a causa de la alta volatilidad del tetrahidrofurano, los pseudo-cóccidos, sobre todo los muy pequeños y los muy frágiles, tienden a aplastarse cuando se pasan directamente al xilol; en tales casos, la operación debe ser modificada como sigue: pasar las muestras a "cellosolve" y dejarlas en esa solución unos 5 minutos, pero de preferencia 20 minutos. Después de ese tiempo pasar los insectos al xilol, 1 a 2 minutos".

MONTAJE

El montaje de los cóccidos puede realizarse, bien en preparaciones temporales o bien en preparaciones definitivas.

El montaje del material en preparaciones temporales se puede hacer directamente utilizando el medio de Hoyer (Gómez Menor, 1927) que tiene la fórmula siguiente:

Goma arábica	30 g
Hidrato de cloral	200 g
Glicerina	20 ml
Agua destilada	50 ml

Reyne (1950) a hecho la revisión de una docena de variantes de este medio: casi todos los autores ponen poco más o menos las mismas cantidades, excepto los acarólogos Andemans y Vitzhum y Van Eindhoven citados por Reyne (1950) quienes agregan grandes cantidades de hidrato de cloral hasta seis veces más que en la fórmula original de Hoyer.

Otro medio de montaje temporal es la gelatina-glicerina descrita por Colas (1948).

Con cierta frecuencia estas preparaciones temporales se convierten en permanentes al aplicar una substancia selladora alrededor del cubre-objetos. Debe hacerse resaltar el hecho que en general, el material es montado sin haberse teñido.

El bálsamo de Canadá es el medio generalmente escogido por la mayoría de los autores para hacer el montaje definitivo de cóccidos. Todos están de acuerdo en utilizar lo menos posible de este producto, para facilitar el examen al microscopio, especialmente por la observación a inmersión. Es preferible agregar un poco de xilol al bálsamo, sobre todo si el bálsamo está muy espeso, para facilitar el paso de los insectos que están en el xilol, en la esencia de clavo o de lavanda, hacia el bálsamo.

Se deberá dejar reposar la preparación, una vez terminado el montaje, durante varios días. Balachowsky y Gosselin (1950) recomiendan el secado a la estufa a 40°C durante unos 15 días.

Se pueden examinar los ejemplares inmediatamente después de haber terminado su montaje, pero hay que tener en cuenta que el examen a inmersión será difícil. Hoy (1962) y Yang y Kosztarab (1967) utilizan el microscopio de contraste de fases, pero recomiendan el empleo de cubre-objetos muy delgados.

RECORDATORIO FINAL PARA EL MONTAJE DE CÓCCIDOS EN BASE A LA INFORMACIÓN ANTERIOR

Se puede hacer un montaje temporal o permanente; el primer caso se aplica solamente en los trabajos rutinarios, en los cuales puede hacerse, algunas veces,

una tinción. Si se piensa que este material es bastante importante, entonces, se continúa con los pasos siguientes, para terminar en un montaje definitivo.

Se ha hablado de una serie de daños que pueden ser causados en el curso del montaje al material por estudiar, entre ellos se citan:

a) El daño que se puede hacer a los cóccidos al momento de separarlos de la planta hospedera.

b) El tratamiento enérgico a base de potasa puede provocar la deformación de glándulas, poros y tubos cerígenos, del mismo modo, la cutícula queda muy frágil y se puede romper si el tratamiento es muy prolongado.

c) La manipulación del material en las diferentes etapas de la deshidratación puede dañar a las muestras, pues cuando se hace en una forma violenta, puede producir daños al material.

Muy pocos autores presentan variantes de sus técnicas al considerar los diferentes grupos de cóccidos; algunos solamente hacen notar la necesidad de hacer un tratamiento más enérgico si los cóccidos presentan áreas muy esclerosadas, y de prolongar el tiempo de coloración si el caso lo amerita.

En general, todos los autores utilizan la potasa al 10% para el aclarado del material, excepto McKenzie (1967) quien emplea el líquido de Essig, a base de ácido láctico, fenol y ácido acético (pero solamente para los pseudocóccidos y cóccidos). Para reducir el tiempo de preparación se puede calentar la potasa, pero sin que llegue a hervir. Siempre es recomendable de hacer un lavado con alcohol acidulado, después del tratamiento potásico, para eliminar las trazas de KOH que pudieran quedar.

La tinción se efectúa antes de la deshidratación si el colorante está preparado en solución acuosa, pero se hará después de la deshidratación si está preparado en alcohol. Existen muchos colorantes, pero es la fucsina (ácida o básica) la más difundida. El tiempo de tinción varía con el tipo de material de que se trate: será más corto con los insectos pequeños y poco esclerosados, y tendrá una duración más larga con los insectos de gran talla y mucho más esclerosados.

La utilización de diferentes soluciones alcohólicas es el método más común para hacer la deshidratación del material, pero el empleo del fenol y el tetrahidrofurano es igualmente conocido. Es necesario señalar que una deshidratación lenta es mejor que una violenta, a causa de la fragilidad de los ejemplares.

En fin, el empleo del bálsamo de Canadá continúa en primer lugar para el montaje definitivo de microinsectos, entre los que quedan comprendidos los cóccidos, ya que su uso está muy generalizado.

RAÚL MACGREGOR-LOAEZA
Instituto de Biología, UNAM.

RESUMEN

Se presenta el análisis crítico de una treintena de autores que han elaborado o sugerido técnicas para el montaje de cóccidos (Insecta-Homoptera-Coccoidea). Ello permitió establecer recomendaciones para la preparación cuidadosa del material de escamas y piojos harinosos; dicha preparación juega un papel esencial para la identificación de géneros y especies, que es fundamental para realizar estudios ecológicos y biogeográficos.

RÉSUMÉ

On présente l'analyse critique d'une trentaine d'auteurs qui ont élaboré ou bien ils ont suggéré différentes techniques pour le montage des Coccides (Insecta-Homoptera-Coccoidea). Il a permis d'établir des recommandations pour la préparation soignée du matériel des Cochenilles; telle préparation joue un rôle essentiel pour l'identification des genres et espèces, qui est fondamentale pour les études écologiques et biogéographiques.

LITERATURA CONSULTADA

- BALACHOWSKY, A. S., y M. T. GOSSELIN, 1950. Conservation et préparation microscopique des Cochenilles et des Pucerons. *L'Entomologiste*, 6:40-47.
- BENASSY, C., 1961. Les sécrétions tégumentaires chez les Coccides. *L'Année Biol.* 37:320-341.
- BERRO, J., 1931. Técnica de las preparaciones micrográficas para el estudio de Cócidos. *Boln. Patol. veg. y Ent. agr.*, 5 (1930):38-46.
- BORCHSENIUS, N. S., 1950. *Collection and study of hard and soft scales*. Akad. Nauk Zool. Inst., Sb. URSS, 4, 30 p.
- BRAIN, C. K., 1915. The Coccidae of South Africa, I. *Trans. R. Soc. S. Afr.*, 5:9-12.
- CARAYON, J., 1951. Procédé d'étude anatomique de certaines organes internes chez des insectes déséchés. *Feuille Nat.*, 6:89-93.
- , 1969. Emploi du noir chlorazol en anatomie microscopique des insectes. *Annls. Soc. ent. Fr.*, 5 (1): 179-193.
- COLAS, G., 1948. Guide de l'Entomologiste. Ed. Boubée et Cie., Paris: 276-278.
- DA COSTA LIMA, A., 1921. Technica para a preparação et montagem de pequenos insetos para exame microscopico. *Archos Esc. Sup. Agric. Med. vet.*, Nicteroy, 5:123-126.
- ESSIG, E. D., 1948. Mounting aphids and other small insects on microscopic slides. *Pan-Pacif. Ent.*, 24:9-22.
- GAGE, J. H., 1948. The staining of Coccids (Homoptera). *Ent. News*, 30:142-143.
- GÓMEZ-MENOR ORTEGA, J., 1927. Sobre la preparación micrográfica de Cochinillas (Cócidos). *Boln. Patol. veg. y Ent. agr.*, 2:27-29.
- GREEN, E. E., 1914. On the preparation of Coccidae for microscopic study. *Ann. appl. Biol.*, 1:98-106.
- HANSON, J. F., 1954. A simple technique for improving and accelerating KOH clearing of insects. *Bull. Brooklyn ent. Soc.*, 49 (1):21.
- HILLE RIS LAMBERS, D., 1950. On mounting aphids and other soft-skinned insects. *Ent. Ber., Amst.*, 298, 13:55-58.
- HOY, J. M., 1962. Eriococcidae (Hom. Coccidae) of New Zealand. *Bull. Dep. scient. ind. Res.*, 146:8-9.
- KOSARZEWSKAYA, E. F., 1968. Methods for making slides of Coccids (Hom-Coccoidea) in order to determine them. *Ent. Obozr.*, 47 (1):248-253.
- KOSZTARAB, M., 1963. The armored scale insects of Ohio (Hom. Coccoidea: Diaspididae). *Bull. Ohio biol. Surv.*, n.s., 2 (2):2-6.
- MCKENZIE, H. L., 1956. The armored scale insects of California. *Bull. Calif. Insect Surv.*, 6:4-5.
- , 1967. *Mealybugs of California*. Univ. Calif. Press, Berkeley y Los Angeles, Calif., E. U. A.
- RAMOS ELORDUY, J., 1966. Étude des glandes cirières tégumentaires chez *P. citri* (Risso) (Hom. Coccidae). Variation de la chétotaxaie, des organes sensoriels et des glandes cirières tegumentaires au cours du développement larvaire. *Annls. Inst. natn. agron.*, Paris, 4:267-314.
- REYNE, A., 1950. Faure's mixture as embedding material for microscopic preparations of small insects. *Ent. Ber., Amst.*, 13 (297):37-42.
- SCHULZE, P., 1915. (Preservative for coccids). *Dt. ent. Z.*, 1915:204-205.
- STAFFORD, E. W., 1915. Studies in Diaspidinae pygidia. *Ann. ent. Soc. Amer.*, 8:67-73.
- WILKEY, R. F., 1962. A simplified technique for clearing, staining and permanently mounting small arthropods. *Ann. ent. Soc. Amer.*, 55:606.
- WILLIAMS, D., 1969. *A method for the preparation of Coccidae for routine determination*. British Mus. (nat. Hist.). Hoja en mimeógrafo.
- YANG, S. P., y M. A. KOSZTARAB, 1967. A morphological and taxonomical study on the immature stages of *Antonina* and the related genera. *Bull. Va. polyt. Inst., Dept. Ent.*, 3:6-7.