

INSECTA MUNDI

A Journal of World Insect Systematics

0446

Nueva técnica de microscopía electrónica de barrido
para el estudio de Coccoidea (Insecta: Hemiptera)

Andrea Saracho Bottero

INSUE - Instituto Superior de Entomología "Dr. Abraham Willink"
Universidad Nacional de Tucumán – CIUNT.
Miguel Lillo 205 (4000)
San Miguel de Tucumán, Argentina

Lucía E. Claps

INSUE - Instituto Superior de Entomología "Dr. Abraham Willink"
Universidad Nacional de Tucumán – CIUNT.
Miguel Lillo 205 (4000)
San Miguel de Tucumán, Argentina

Date of Issue: October 23, 2015

Andrea Saracho Bottero and Lucía E. Claps
Nueva técnica de microscopía electrónica de barrido para el estudio de Coccoidea
(Insecta: Hemiptera)
Insecta Mundi 0446: 1–5

ZooBank Registered: urn:lsid:zoobank.org:pub:89C919F7-C83B-45B6-863F-CDEA45D38C74

Published in 2015 by

Center for Systematic Entomology, Inc.
P. O. Box 141874
Gainesville, FL 32614-1874 USA
<http://centerforsystematicentomology.org/>

Insecta Mundi is a journal primarily devoted to insect systematics, but articles can be published on any non-marine arthropod. Topics considered for publication include systematics, taxonomy, nomenclature, checklists, faunal works, and natural history. **Insecta Mundi** will not consider works in the applied sciences (i.e. medical entomology, pest control research, etc.), and no longer publishes book reviews or editorials. **Insecta Mundi** publishes original research or discoveries in an inexpensive and timely manner, distributing them free via open access on the internet on the date of publication.

Insecta Mundi is referenced or abstracted by several sources including the Zoological Record, CAB Abstracts, etc. **Insecta Mundi** is published irregularly throughout the year, with completed manuscripts assigned an individual number. Manuscripts must be peer reviewed prior to submission, after which they are reviewed by the editorial board to ensure quality. One author of each submitted manuscript must be a current member of the Center for Systematic Entomology.

Chief Editor: Paul E. Skelley, e-mail: insectamundi@gmail.com
Assistant Editor: David Plotkin, e-mail: insectamundi@gmail.com
Head Layout Editor: Eugenio H. Nearn
Editorial Board: J. H. Frank, M. J. Paulsen, Michael C. Thomas
Review Editors: Listed on the **Insecta Mundi** webpage

Manuscript Preparation Guidelines and Submission Requirements available on the **Insecta Mundi** webpage at: <http://centerforsystematicentomology.org/insectamundi/>

Printed copies (ISSN 0749-6737) annually deposited in libraries:

CSIRO, Canberra, ACT, Australia
Museu de Zoologia, São Paulo, Brazil
Agriculture and Agrifood Canada, Ottawa, ON, Canada
The Natural History Museum, London, UK
Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warsaw, Poland
National Taiwan University, Taipei, Taiwan
California Academy of Sciences, San Francisco, CA, USA
Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Gainesville, FL, USA
Field Museum of Natural History, Chicago, IL, USA
National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC, USA
Zoological Institute of Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

Electronic copies (Online ISSN 1942-1354, CDROM ISSN 1942-1362) in PDF format:

Printed CD or DVD mailed to all members at end of year. Archived digitally by Portico.
Florida Virtual Campus: <http://purl.fcla.edu/fcla/insectamundi>
University of Nebraska-Lincoln, Digital Commons: <http://digitalcommons.unl.edu/insectamundi/>
Goethe-Universität, Frankfurt am Main: <http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn:nbn:de:hebis:30:3-135240>

Copyright held by the author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons, Attribution Non-Commercial License, which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>

Layout Editor for this article: Eugenio H. Nearn

Nueva técnica de microscopía electrónica de barrido para el estudio de Coccoidea (Insecta: Hemiptera)

Andrea Saracho Bottero

INSUE - Instituto Superior de Entomología "Dr. Abraham Willink"

Universidad Nacional de Tucumán – CIUNT.

Miguel Lillo 205 (4000)

San Miguel de Tucumán, Argentina

andrea_saracho1308@hotmail.com

Lucía E. Claps

INSUE - Instituto Superior de Entomología "Dr. Abraham Willink"

Universidad Nacional de Tucumán – CIUNT.

Miguel Lillo 205 (4000)

San Miguel de Tucumán, Argentina

luciaclaps@gmail.com

Resumen. Se presenta un protocolo para preparar material de Coccoidea (Insecta: Hemiptera) para realizar observaciones con microscopía electrónica de barrido. Esta técnica consiste en muestras conservadas en alcohol 96°, limpiadas con xilol y acetona y llevadas directamente a la etapa de hidratación y una posterior deshidratación, en alcohol, omitiendo la fijación en formaldehído glutaraldehído y la posfijación en tetróxido de osmio. Se destaca la importancia de la limpieza del material y la correcta realización de punto crítico, en la etapa de desecación.

Palabras clave. MEB, Dactylopiidae, Pseudococcidae

Abstract. A new protocol to prepare material of Coccoidea (Insecta: Hemiptera) for observation with scanning electron microscopy is presented. This technique consists of cleaning samples (stored in 96% alcohol) with acetone and xylene, taking them directly to the hydration step, and subsequently dehydrating them in alcohol. Fixation in glutaraldehyde and post-fixation in osmium tetroxide are omitted. The cleaning of the samples and the correct critical point dryer are very important.

Keywords. Dactylopiidae, Pseudococcidae, SEM

Introducción

Coccoidea (Insecta: Hemiptera) incluye aproximadamente 8000 especies fitófagas, distribuidas en 47 familias entre actuales y fósiles (Ben Dov et al. 2015); entre ellas se encuentran las Dactylopiidae y Pseudococcidae. La primera es una familia monogénica, con sólo 10 especies, nativa del Nuevo Mundo, principalmente de los desiertos de EEUU, México y América del Sur (Claps 2010), conocidas como "cochinillas del carmín" y viven exclusivamente sobre cactáceas, mientras que los pseudocócidos tiene distribución mundial, cuenta con 2000 especies y 263 géneros y son llamadas "cochinillas harinosas" (Granara de Willink 2014).

Todas las Coccoidea tienen el cuerpo protegido con distintos tipos de estructuras como escudo, seda fibrosa y/o pulverulenta, o cera con diferente grado de consistencia (Claps 1998). La taxonomía se basa en caracteres que aportan las hembras adultas, debido a que son las que tienen más caracteres estables a nivel específico y a que los ejemplares son fáciles de encontrar en la planta hospedera porque tienen movimientos lentos o bien son sedentarias, en cambio los machos, además de vivir muy poco tiempo, sólo dos o tres días, tienen caracteres que los diferencian a nivel de grandes grupos, principalmente de familia (Claps y Wolff 2003).

Los caracteres morfológicos estudiados mediante microscopía óptica (MO), resultan muchas veces insuficientes para una correcta y completa caracterización de las especies, debido a que son organismos muy pequeños, de dos a siete mm, y porque presentan estructuras muy delicadas, tales como distintos tipos de conductos, setas, poros, espinas, etc., los cuales son muchas veces difíciles de observar a MO, al igual que es dificultoso reconocer si dichas estructuras se encuentran en las superficies ventral o dorsal (Saracho Bottero 2013).

La microscopía electrónica de barrido (MEB) se utiliza para obtener imágenes de gran resolución de los caracteres superficiales de los objetos, permite visualizar las imágenes haciendo interaccionar un haz primario de electrones sobre un área del objeto en estudio, en este caso, el insecto.

Las técnicas para las preparaciones a MEB empleadas para muchos insectos, entre ellos las Coccoidea, en su mayoría incluyen un primer paso de fijación del material en glutaraldehído y una posfijación con tetróxido de osmio, deshidratación en serie de alcoholes y secado mediante punto crítico (Vahedi y Gholami Mahfar 2010; Zhang et al. 2012).

Dada la necesidad de hacer observaciones de cocoideos con MEB para aclarar la identificación de algunas de sus especies, se vio la necesidad previamente de elaborar un protocolo que permita poner a punto las técnicas de MEB para Coccoidea, empleando como base especies de Dactylopiidae y Pseudococcidae, siendo éste el objetivo del presente trabajo.

Materiales y Métodos

El material con el que se trabajó corresponde a hembras adultas de *Dactylopius* spp. (Dactylopiidae) e *Hypogeococcus* spp. (Pseudococcidae) conservado en alcohol 70°, 96°, y material fresco recolectado por las autoras y colegas de la Fundación para el Estudio de Especies Invasivas (FuEDEI), Buenos Aires, Argentina, en diferentes localidades de la Argentina, entre los años 2011 y 2014. Asimismo se trabajó con material de la Colección Instituto Fundación Miguel Lillo (IFML), Tucumán Argentina, conservado durante 5 a 10 años en alcohol 70° y 96°.

Se utilizó Microscopio *Zeiss Supra 55 VP* que se encuentra en el Centro Integral de Microscopía Electrónica (CIME) dependiente del CONICET y la Universidad Nacional de Tucumán (Tucumán, Argentina). Las fotografías digitales de cada especie se tomaron con el mismo microscopio y fueron realizadas en forma conjunta con personal técnico del CIME.

Se empleó en primer lugar la técnica convencional utilizada para insectos por el CIME Tucumán, la cual incluye una fijación del material con formaldehído glutaraldehído (1:1); posfijación con tetróxido de osmio; deshidratación con una batería de alcoholes desde 30° hasta alcohol absoluto y luego acetona; secado con punto crítico; montaje y metalizado. Según este protocolo es necesario contar con material vivo para poder realizar las preparaciones.

Se realizaron tres ensayos diferentes:

Ensayo I: técnica convencional sin modificaciones consistente en: material fresco, fijación en formaldehído glutaraldehído, posfijación con tetróxido de osmio, deshidratación con alcoholes y acetona y secado con punto crítico.

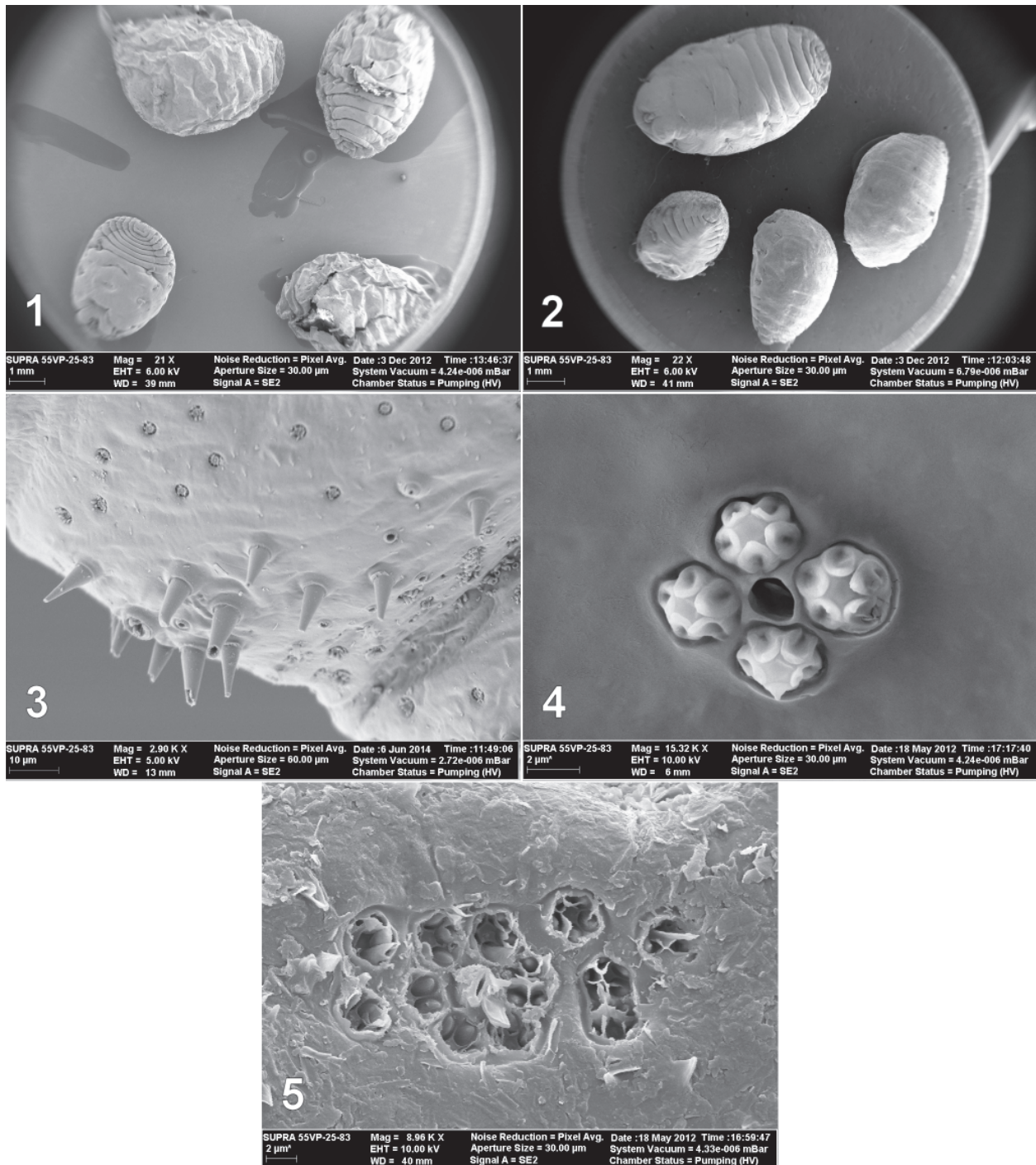
Ensayo II: muestras fijadas en campo con alcohol 96° y luego conservadas en solución de formaldehído glutaraldehído (1:1) y posteriormente posfijadas con tetróxido de osmio, deshidratación en alcoholes y acetona y secado con punto crítico.

Ensayo III: muestras fijadas en campo con alcohol 96°, limpiadas con xilol y acetona y llevadas directamente a la etapa de hidratación y una posterior deshidratación, omitiendo la fijación en formaldehído glutaraldehído y la posfijación en tetróxido de osmio.

En los ensayos I y II el resultado no fue el óptimo (Fig. 1). Al realizar observaciones del material, bajo microscopio estereoscópico, de cada una de las etapas, se observó que la etapa de posfijación con tetróxido de osmio no es recomendable ni necesaria para este grupo de insectos, ya que en la mayoría de los casos se produce un daño y contracción de la cutícula, hasta romper la pared del cuerpo.

Por su parte en el Ensayo III, donde se omitió la posfijación en tetróxido de osmio, los resultados fueron óptimos en su totalidad (Fig. 2); los cuerpos de las hembras quedan turgentes lo que permite una correcta observación a MEB.

Es importante destacar que el material a observar debe estar completamente limpio (Fig. 3 y 4), para ello el xilol y acetona son los mejores medios para eliminar la materia grasa que posee la seda que envuelve a estos insectos y no afecta al cuerpo ni cutícula del mismo, pudiendo realizar las etapas siguientes sin inconveniente. Cuando la muestra tiene impurezas en su superficie debido a una mala limpieza no es posible observar correctamente las estructuras (Fig. 5). Asimismo es primordial que el punto crítico se realice correctamente a fin de mantener la turgencia de los ejemplares a observar.



Figuras 1–5. Microfotografías a MEB de hembras adultas y detalle estructuras de Dactylopiidae y Pseudococcidae. 1) Hembras adultas de Dactylopiidae y Pseudococcidae posfijadas con tetróxido de osmio. 2) Hembras adultas de Dactylopiidae y Pseudococcidae sin posfijación en tetróxido de osmio. 3) Cerario de *Hypogeococcus* sp. (Pseudococcidae), muestra limpiada con acetona y xilol. 4) Grupo de poros quinqueloculares de *Dactylopius* sp. (Dactylopiidae), muestra limpiada con acetona y xilol. 5) Grupo de poros quinqueloculares de *Dactylopius* sp. (Dactylopiidae) con impurezas en toda la superficie.

Al analizar los resultados se vio que no es necesario contar con material vivo, ya que los mejores resultados se obtuvieron con material fijado en campo con alcohol 96°, los cuales tenían de uno a cinco años de fijación; dicho material fue llevado directamente a la etapa de limpieza con xilol y acetona y deshidratación, comenzando directamente con acetona, y luego se siguieron las etapas correspondientes.

Técnica para Microscopía Electrónica de Barrido

1) Fijación, las muestras son fijadas en campo con alcohol 96°.

2) Separación y selección del material, los ejemplares son liberados de su cubierta cerosa utilizando xilol, mediante pinzas y pinceles, bajo microscopio estereoscópico (ME), luego se efectúa una nueva limpieza en acetona pura a ME, pudiendo ser conservada la muestra en acetona en tubos en cierre hermético por aproximadamente 10 días como máximo, para luego hacer la hidratación y deshidratación correspondiente.

3) Hidratación-Deshidratación, mediante baños sucesivos, cada uno de 5 a 10 minutos de acuerdo al tamaño del insecto, en acetona pura, alcohol 100°, 90°, 80°, 70°, 50°, 30°, agua destilada, alcohol 30°, 50°, 70°, 80°, 90°, 100° y luego en acetona pura durante 10 minutos y finalmente un último cambio de acetona pura en la cual se la deja hasta que se le realiza el punto crítico. Cuando el material es fresco, o con una buena separación y conservación del mismo, para la hidratación se emplean baños de alcohol 100°, 80° y 70° y para la deshidratación alcohol a partir de 70°.

4) Desecación, proceso por el cual la muestra queda totalmente sin humedad y se debe realizar mediante punto crítico, éste se realiza en un dispositivo donde el CO₂ líquido desplaza a la acetona completamente de la muestra, para luego despresurizarla sublimando el CO₂ a gas.

5) Montaje, las muestras se colocan sobre un porta objeto metálico, para lo cual se utiliza cinta adhesiva conductora doble faz.

6) Metalización, consiste en cubrir la muestra con un elemento conductor, para permitir que el haz de electrones se refleje y se obtenga la imagen.

7) Introducción de la muestra metalizada en el MEB, para poder realizar las observaciones.

Agradecimientos

Al personal del Centro Integral de Microscopía Electrónica (CIME) de la Universidad Nacional de Tucumán (Tucumán, Argentina) por el apoyo técnico brindado. A las Dras. Vera Wolff (FEPAGRO, Brasil) y Patricia González (INSUE UNT, Argentina), por la revisión del manuscrito.

Bibliografía Citada

- Ben Dov, Y., D. R. Miller, y G. A. H. Gibson. 2015.** ScaleNet. (Available at ~ <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm> . último acceso 12 de marzo de 2015).
- Claps, L. E. 1998.** Coccoidea p.140–143. *In:* J. J. Morrone y S. Coscarón (dirs.) Biodiversidad de Artrópodos Argentinos. Una perspectiva biotaxonómica. Ediciones Sur, La Plata, Argentina. 568 p.
- Claps, L. E. 2010.** Morfología, Sistemática y Distribución de Dactylopiidae (Hemiptera: Coccoidea) p.17–29. *In:* L. Portillo y A. L. Viguera (eds.) Conocimiento y aprovechamiento de la grana cochinilla. Universidad de Guadalajara México. Montecillo, México. 228 p.

- Claps, L. E., y V. R. S. Wolff. 2003.** Cochinillas Diaspididae (Hemiptera: Coccoidea) frecuentes en plantas de importancia económica de la Argentina y Brasil. Publicación Especial de la Sociedad Entomológica Argentina, San Miguel de Tucumán 3: 1–59.
- Granara de Willink, M. C. 2014.** Pseudococcidae p. 249–258. *In*: S. Roig-Juñent, L. E. Claps y J. J. (Dirs.) Biodiversidad de Artrópodos Argentinos, vol. 3. INSUE UNT ediciones; Tucumán, Argentina. 544 p.
- Saracho Bottero, M. A. 2013.** Nuevos caracteres taxonómicos aportados por la microscopía electrónica para la familia Dactylopiidae. Serie Monográfica y Didáctica Facultad de Ciencias Naturales e IML Universidad Nacional de Tucumán 53: 139.
- Vahedi, H. A., y F. Gholami Mahfar. 2010.** Scanning electron microscope observations on the multilocular disc-pores and dermal projections of adult female *Porphyrophora tritrici* and *P. cynodontis*. *Entomologia Hellenica* 19: 76–81.
- Zhang, Y., Y. Xie, J. Xue, X. Fu, y W. Liu. 2012.** The structure and wax glands of *Phenacoccus fraxinus* (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae). *Zoological Research* 33 (E1–2): E13–E17.

Received April 14, 2015; Accepted May 17, 2015.

Review Editor Angélico Asenjo.

