

## NOTA TÉCNICA

# ACONDICIONAMIENTO DE LA COCHINILLA HARINOSA (HEMIPTERA: PSEUDOCOCCIDAE) POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO<sup>1</sup>

*Melissa Palma-Jiménez<sup>2</sup>, Mónica Blanco-Meneses<sup>3</sup>*

## RESUMEN

**Acondicionamiento de la cochinilla harinosa (Hemiptera: Pseudococcidae) por Microscopía Electrónica de Barrido.** El objetivo del presente trabajo fue determinar la metodología de acondicionamiento adecuada para la limpieza de los especímenes de cochinilla harinosa y su correcta observación. La investigación se llevó a cabo en el laboratorio del Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMIC) de la Universidad de Costa Rica durante el año 2012. Se implementaron cuatro tipos de metodología, con los cuales se evidenció una mejora gradual para la observación de las ultraestructuras a través del microscopio electrónico de barrido. Cada proceso fue descrito detalladamente, el que mostró mejores resultados fue en el que se incorporó xilol al 10% (en algunos casos resultó viable utilizando etanol al 95-100%), ya que se logró eliminar la cera del cuerpo del insecto, evitar el colapso del mismo y observar ultraestructuras específicas del individuo. Esta metodología permitirá reducir el tiempo y los costos en futuras investigaciones taxonómicas de la cochinilla harinosa.

**Palabras claves:** microscopio electrónico de barrido, acondicionamiento de especímenes, ultraestructuras.

## ABSTRACT

**Conditioning of mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) by Scanning Electron Microscopy.** The aim of this work was to determine the methodology for an adequate conditioning for the cleaning of mealybugs specimens and its correct observation. This work was done in the laboratory of the Research Center in Microscopic Structures (CIEMIC) of the University of Costa Rica, in 2012. Four types of methodologies were implemented, which evidenced a gradual improvement of the observation of the ultrastructures through the Scanning Electron Microscopy. Every process was described in detail. The best results were showed with 10% xylene (in some cases it was feasible using 95-100% ethanol). It allowed to remove the wax from the body of the insect, avoiding its collapse, and observing the specific ultrastructures of the individual. This approach will reduce the time and cost of future taxonomic research of mealybugs.

**Keywords:** scanning electron microscope, specimen conditioning, ultrastructures.

<sup>1</sup> Recibido: 23 setiembre, 2014. Aceptado: 3 de febrero, 2015. Parte de la tesis de Maestría de la primera autora, Universidad de Costa Rica, Escuela de Agronomía, Laboratorio de Técnicas Moleculares de Fitopatología del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CI-PROC).

<sup>2</sup> Universidad de Costa Rica, Escuela de Agronomía, Programa de Maestría. Apartado postal 21001. [melissapal@gmail.com](mailto:melissapal@gmail.com)

<sup>3</sup> Universidad de Costa Rica, Escuela de Agronomía, Coordinadora del Laboratorio de Técnica Moleculares de Fitopatología del CIPROC. San José, Costa Rica. Apartado postal 2060. [monica.blancomeneses@ucr.ac.cr](mailto:monica.blancomeneses@ucr.ac.cr)



## INTRODUCCIÓN

Algunos autores reportan que la clasificación de las especies de la cochinilla harinosa hembra (Hemiptera: Pseudococcidae) resulta un trabajo difícil principalmente por tratarse de un insecto de tamaño pequeño (aproximadamente 2,5 x 1,5 cm) y que posee una gran cantidad de estructuras morfológicas muy similares entre las especies (Malausa et al., 2011). Hardy et al. (2008), explican que históricamente las especies de similar morfología procedentes de diferentes regiones geográficas se han colocado en el mismo género, debido en gran parte a la falta de características propias para crear nuevos géneros puesto que muchas tienden a converger en apariencia.

El uso de técnicas tradicionales como el microscopio de luz, ha permitido el estudio de estructuras translúcidas para la clasificación de las cochinillas harinosas principalmente para la identificación de poros alrededor del cuerpo, para clasificar las secciones de las patas posteriores (coxa, trocánter, fémur y tibia) y del contorno de los ojos, para identificar la presencia o ausencia de la barra anal y los ductos del collar oral (Ramos y Serna, 2004; Miller et al., 2007; Hardy et al., 2008). Actualmente una de las técnicas más utilizadas para la clasificación de la cochinilla harinosa corresponde al uso de la técnica en laminilla de vidrio (Granara de Willink, 2004).

En particular, las cochinillas *Pseudococcus longispinus* y *Pseudococcus nr. microadonidum*, *Planococcus minor* y *Planococcus citri*, así como *Pseudococcus maritimus* referida como *Pseudococcus nr. maritimus* pertenecen a taxones estrechamente relacionados que son difíciles de distinguir morfológicamente mediante el uso de la técnica en lámina y que han provocado una reexaminación de los caracteres. Estas especies fueron colectadas de diversos cultivos agrícolas y plantas ornamentales procedentes de Francia y Brazil (Malausa et al., 2011).

Una alternativa para la correcta clasificación de estos insectos es el uso del microscopio electrónico de barrido (MEB), lo que ha permitido estudiar la morfología de algunas estructuras que conforman el cuerpo de la cochinilla (Kumar et al., 1997) y especialmente comprender el patrón de secreción de cera (Lucchi y Mazzoni, 2004; Ying-Ping et al., 2004; Zhang et al., 2012).

Se ha demostrado mediante el uso del MEB, que la cera secretada por la cochinilla harinosa

*Dicyphococcus bigibbus* Borchsenius es húmeda en las primeras glándulas desarrolladas tanto en ninfa como en adultas y que posteriormente se coagula formando la cera seca y cristalina sobre la superficie del cuerpo. La cera estudiada es dura y se compone de una combinación de capas verticales y horizontales que protege a los individuos de factores ambientales (Ying-Ping et al., 2004).

Los trabajos realizados en insectos de cuerpo suave que secretan cera, señalan que la forma de limpieza depende del estado de desarrollo, equipo utilizado y los reactivos utilizados para ello. Algunos autores han utilizado solo etanol al 70%-100% para los primeros estados de desarrollo (Lucchi y Mazzoni, 2004; Ammar et al., 2013), otros mencionan que para remover la cera se puede utilizar tetrahidrofurano y cloroformo, así también se mencionan trabajos donde emplearon la solución fijadora de Karnovsky y el equipo de secado de punto crítico (Zhang et al., 2012). Se ha empleado el xilol para remover la cera de *Ceroplastes pseudoceriferus* (Homoptera: Coccidae) (Tamaki et al., 1969) y para disolver la cera de *Tettigonia viridissima* (Orthoptera) (Jiao et al., 2000).

Debido a las capas de cera y al cuerpo suave que caracteriza a la cochinilla harinosa, muchos de los insectos procesados son desechados porque su cuerpo resulta difícil de limpiar o tiende a colapsarse, imposibilitando la correcta observación de las estructuras morfológicas para la identificación y clasificación, e induciendo a la pérdida de material.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la metodología de acondicionamiento adecuada para la limpieza de los especímenes de cochinilla harinosa y su correcta observación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitios de colecta del material

Se colectaron cochinillas femeninas en estadio adulto pertenecientes al orden Hemiptera, familia Pseudococcidae del cultivo de banano de doce fincas ubicadas a lo largo de la zona Atlántica en Costa Rica (Agrotubérculos, Aproveco, Bristol, CATIE, Corsega, Kopemaz, Laboratorio de Biocontrol, Manu, Rebusca, Siquirreña, Zent, Zorsales). La colecta se realizó durante visitas a las fincas entre los años 2010 y 2012 y la ubicación de los sitios se identificó según las

coordenadas geográficas. Para la colecta se utilizó un tubo eppendorf de 1,5 ml con etanol al 95% (Cuadro 1).

### Lugar de estudio

El estudio se realizó en el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMIC) de la Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, durante el año 2012.

Para cada método de acondicionamiento se emplearon veinte insectos de los cuales se recuperó la mitad. Esto debido a pérdidas durante el trabajo realizado en cada metodología, principalmente posterior al uso de las soluciones de prefijación y postfijación, así como el empleo del sonicador. Se utilizó el MEB, modelos HITACHI S-2360 y S-570 con un voltaje de aceleración a 15kv. Para determinar las ultraestructuras características de las cochinillas en estudio, se colocaron en posición lateral, esternal y tergal, y para determinar el método de acondicionamiento de limpieza adecuado de los especímenes, se trabajó con cuatro metodologías, en las cuales se evidenció una mejora gradual a través de la observación de las ultraestructuras por medio del MEB. Se inició con el uso de las soluciones de prefijación y postfijación, las cuales se utilizan comúnmente en los trabajos de MEB, y se definió como Método de acondicionamiento 1. Debido a que con este protocolo hubo colapso del tejido del insecto se

eliminaron las sustancias de prefijación y postfijación, y se utilizó el sonicador como equipo alternativo para la limpieza del insecto, y se definió como Método de acondicionamiento 2. Como su rendimiento tampoco fue óptimo, se eliminó el uso del sonicador y se utilizó solamente etanol, se definió como Método de acondicionamiento 3. En esta metodología se eliminó el colapso del tejido del insecto, sin embargo, los especímenes todavía quedaban cubiertos de cera, por esta razón se utilizó el xilol al 10% diluido en etanol al 95%; con esta metodología se limpió la cera y se definió como Método de acondicionamiento 4. A continuación se describe en detalle cada metodología.

### Método de acondicionamiento 1: uso de las soluciones de prefijación y postfijación para el acondicionamiento de la cochinilla harinosa

Se realizó la prefijación de todos los especímenes por un periodo de cuatro minutos en la solución de Karnovsky (glutaraldehído 2,5%, paraformaldehído 2%, amortiguador fosfato 0,1M y H<sub>2</sub>O destilada) a pH 7,4, la cual se almacenó previamente en refrigeración una semana. Seguidamente se realizaron tres lavados de quince minutos con el amortiguador fosfato 0,1M. Se continuó con una posfijación con la solución de tetraóxido de osmio al 1% por un periodo de una hora o a 4% por media hora, y se realizaron tres

**Cuadro 1.** Cochinillas harinosas del cultivo de banano colectadas en distintas regiones geográficas de la zona Atlántica de Costa Rica. 2010-2012.

**Table 1.** Mealybugs from banana crop collected in different geographical regions from the Atlantic zone of Costa Rica. 2010-2012.

Localidad	Año de colecta	Coordenadas geográficas	
		Latitud	Longitud
Finca Agrotubérculos, Cahuita, Limón	2011	9° 40'00.00"N	82° 47'59,99"O
Finca Aproveco, Batán, Limón	2012	10° 05'04"N	83° 20' 28"O
Finca Bristol, Limón	2012	10° 01'44"N	83° 18'14"O
Finca CATIE, Turrialba	2010	9° 53'23.06"N	83° 39'11,59"O
Corsega, San Carlos de Pacuarito, Limón	2012	10° 10'25"N	83° 46' 76"O
Finca Kopemaz, Matina, Limón	2012	10° 02'54"N	83° 27' 78"O
Finca Lab Biocontrol, Turrialba	2010	9° 53'23.06"N	83° 39'11,59"O
Finca Manu, Guápiles, Limón	2011	9° 51'23.85"N	82° 58'36,45"O
Finca Zent, Matina, Limón	2012	10° 02'54"N	83° 27'78"O
Finca Zorsales, Carrandi, Limón	2012	10° 03'49"N	83° 16' 43"O

lavados con H<sub>2</sub>O destilada de quince minutos cada uno. El material se deshidrató en una batería de etanol con concentración ascendente (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y 100%), diez minutos en cada uno. Seguidamente los especímenes se colocaron en Terbutanol por cuatro tiempos de diez minutos cada uno. Para el último tiempo la muestra se colocó en el refrigerador a una temperatura de 0 °C, que fue cuando congeló; esto con el fin de generar el ambiente propicio durante el proceso de secado del insecto. Posteriormente las muestras se secaron por sublimación durante veinte minutos en el equipo modelo Freeze dryer VFD-20. Se realizó el montaje en bases de aluminio para especímenes y se cubrió con el metal platino-paladio por siete minutos utilizando el equipo modelo Giko IB-3, por último, se observaron y fotografiaron las ultraestructuras pertinentes bajo el microscopio electrónico de barrido.

#### **Método de acondicionamiento 2: limpieza de las cochinillas harinosas empleando el sonicador**

Las cochinillas harinosas se sumergieron a una concentración ascendente de etanol: 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y 100% por periodos de quince minutos en cada uno. Seguidamente se empleó un sonicador durante cinco minutos. Posteriormente los especímenes se colocaron en Terbutanol por cuatro periodos de diez minutos cada uno. La muestra se colocó en el refrigerador a una temperatura de 0 °C, que fue cuando congeló; esto con el fin de generar el ambiente propicio durante el proceso de secado del insecto. Seguido, las muestras se secaron por sublimación por veinticinco minutos en el equipo modelo Freeze dryer VFD-20. Se realizó el montaje de los especímenes en bases de aluminio y se cubrieron con el metal platino-paladio por siete minutos utilizando el equipo modelo Giko IB-3 y finalmente se observaron y fotografiaron las ultraestructuras pertinentes bajo el microscopio electrónico de barrido.

#### **Método de acondicionamiento 3: limpieza de las cochinillas harinosas con etanol al 95% y 100%**

Se trabajó directamente con el proceso de deshidratación utilizando etanol a 95% (concentración en la que se encontraban los especímenes) y

posteriormente 100% por diez minutos cada uno. Para el último tiempo, la muestra se colocó en el refrigerador a una temperatura de 0 °C, que fue cuando congeló; esto con el fin de generar el ambiente propicio durante el proceso de secado del insecto. Seguidamente los especímenes se colocaron en Terbutanol por cuatro tiempos de diez minutos cada uno, tras lo cual se congeló la muestra. Posteriormente estas se secaron por sublimación por veinte minutos en el equipo modelo Freeze dryer VFD-20, seguido del montaje en bases de aluminio, y finalmente se cubrieron con el metal platino-paladio por siete minutos utilizando el equipo modelo Giko IB-3; posteriormente se observaron y fotografiaron las ultraestructuras pertinentes bajo el microscopio electrónico de barrido.

#### **Método de acondicionamiento 4: limpieza de las cochinillas harinosas con xilol al 10%**

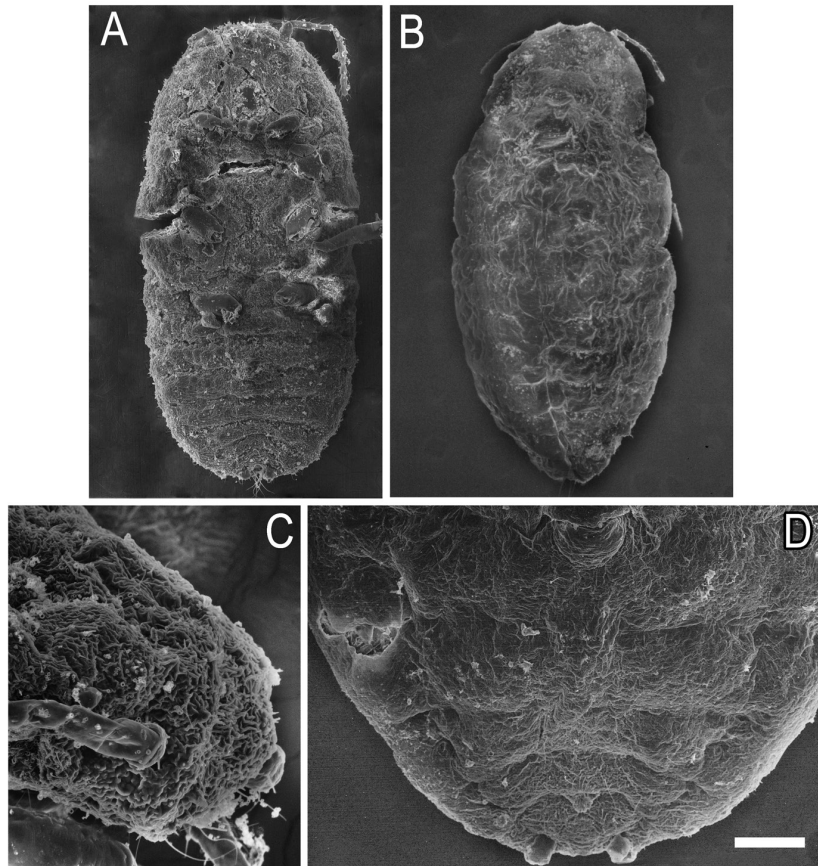
Las cochinillas harinosas se sumergieron en xilol al 10% por treinta segundos, el cual se diluyó con etanol al 95%. Se continuó con una deshidratación en etanol a una concentración ascendente: 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% y 100% por diez minutos en cada uno. Seguidamente los especímenes se colocaron en Terbutanol por cuatro periodos de diez minutos cada uno. Para el último periodo la muestra se colocó en el refrigerador a una temperatura de 0 °C, que fue cuando congeló; esto con el fin de generar el ambiente propicio durante el proceso de secado del insecto. Posteriormente las muestras se secaron por sublimación por veinte minutos en el equipo modelo Freeze dryer VFD-20. Se realizó el montaje de los especímenes en bases de aluminio y se cubrieron con el metal platino-paladio por siete minutos utilizando el equipo modelo Giko IB-3, y finalmente se observaron y fotografiaron las ultraestructuras pertinentes bajo el microscopio electrónico de barrido.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los principales problemas que se presentaron para el acondicionamiento de los individuos fue la eliminación de la cera que cubre el cuerpo, y el colapso de este por presentar tejido suave, aspectos muy importantes que impedían observar las ultraestructuras presentes.

Los insectos sometidos al Método de acondicionamiento 1 mostraron tejidos completamente colapsados, sin ninguna posibilidad de analizar la ultraestructura de la cochinilla, ya que fue claro observar el daño de forma generalizada en el cuerpo del insecto. Hubo desgarre en el esterno como en el tergo, así como deformación del tejido de la epidermis en la cabeza y abdomen esternal (Figura 1.A-1.D), por

lo que el tratamiento de prefijación con la solución de Karnovsky y posfijación con la solución de tetraóxido de osmio al 1% resultaron ser excesivos. Nieto (2010), explica que estos fijadores (Karnovsky y tetraóxido de osmio), tienen la capacidad de impregnar los tejidos biológicos internos y aumentar la conductividad de las muestras para la posterior observación superficial. A su vez, el mismo autor explica que Karnovsky es una



**Figura 1.** Método de acondicionamiento 1 de la cochinilla harinosa con base en soluciones de prefijación y posfijación. Ultraestructuras: **A.** Región esternal del cuerpo con tejido colapsado y desgarre de la antena, estructura bucal y patas. **B.** Región tergal del cuerpo con tejido colapsado. **C.** Cabeza de la cochinilla harinosa con tejido colapsado. **D.** Región del pigidio con ruptura y colapso del tejido. Muestras colectadas del cultivo de banano de la región Atlántica de Costa Rica. 2010-2012. Escala: 142  $\mu\text{m}$  (A); 250  $\mu\text{m}$  (B); 75  $\mu\text{m}$  (C); 52,63  $\mu\text{m}$  (D).

**Figure 1.** Conditioning method 1 for mealybugs based on prefixation and postfixation solutions. Ultrastructures: **A.** Sternal region of the body with collapsed tissue and tear of the antenna, mouth structure and legs. **B.** Tergal region of the body with collapsed tissue. **C.** Head of mealybug with collapsed tissue. **D.** Region of pygidium with ruptured and collapsed tissue. Samples collected from banana crop from the Atlantic region, Costa Rica. 2010-2012. Scale: 142  $\mu\text{m}$  (A); 250  $\mu\text{m}$  (B); 75  $\mu\text{m}$  (C); 52.63  $\mu\text{m}$  (D).



solución hipertónica para la mayoría de las células biológicas, razón que lo hace un buen fijador, pero en el material de estudio pudo ser excesivamente hipertónica para fijar los tejidos provocando que la ultraestructura colapsara por completo (Burón et al., 2010), por lo que este acondicionado no resultó ser adecuado. En este caso las células del cuerpo del insecto requerían osmolaridades bajas y para las cochinillas harinosas la deshidratación fue relativamente alta, es por ello que Özen y Ceylan (2013), explican que si la solución de fijación es hipertónica, las células y orgánulos pierden agua y se contraen, hasta el punto de provocar plasmólisis, tal como ocurrió en las cochinillas de la presente metodología. Estos autores recomiendan que la presión osmótica de una solución de fijación debe ser igual o muy cercana al tejido que va a ser fijado.

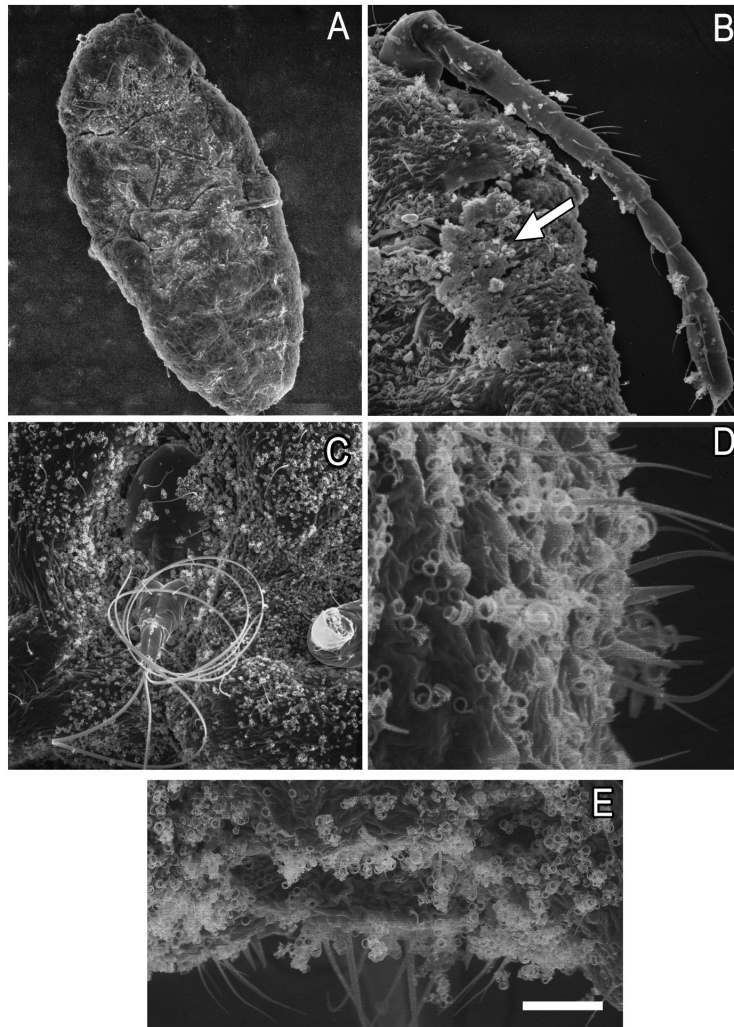
Los especímenes tratados con el Método de acondicionamiento 2 en el cual se empleó el sonicador como herramienta complementaria, logró eliminar las capas de cera en algunos especímenes tratados, con el inconveniente de que el tejido colapsó, observándose claramente en la ultraestructura de la región bucal, cerario, poros multiloculares y abdomen (Figura 2.A-2.D). En algunos individuos, además del colapso de tejidos no se observaron mejoras en la limpieza de la cera, como lo fue en la ultraestructura de los poros multiloculares (Figura 2.E), similar al Método de acondicionamiento 1 (Figura 1.A-1.D). Esta cera fue secretada por los poros en forma de cintas cilíndricas compactas (Figura 2.E; Figura 3.D y 3.E) y para su limpieza el sonicador actuó agitando las partículas del etanol a 95% en las cuales la cochinilla se encontraba sumergida, sin embargo hizo que el tejido colapsara provocando la ruptura de las membranas celulares y con ello dañando la ultraestructura delicada de este insecto de tejido suave (Vargas et al., 2007).

Siguiendo el Método de acondicionamiento 3 basado en el uso de etanol de 95% y 100% se evitó el colapso del tejido, sin embargo, se presentó el inconveniente de que no se eliminaba la cera del cuerpo de forma apropiada, por lo que fue imposible analizar las ultraestructuras del cuerpo (Figura 3.A-3.E), poros secretores de la cera, como cerarios y multiloculares en la región cercana al pigidio (Figura 3.D y 3.E). El etanol es un fijador que tiene alta capacidad de penetración y lo hace de forma lenta (Murillo et al., 2013), además de mantener la tonicidad y osmolaridad de las células y evitar que estas colapsaran (Nieto,

2010), evitando el daño provocado por los procesos anteriores. A pesar de que con este acondicionado se notaron mejoras, se observaron cúmulos de cera en el cuerpo de los insectos. La cera secretada por los poros multiloculares alrededor de la vulva de las cochinillas fue difícil de limpiar, ya que se presentó de forma abundante en el abdomen esternal. Esta cera presenta un rol en la adhesión de los huevos al cuerpo del insecto en la etapa adulta, por lo tanto, tiende a estar presente como mecanismo de protección (Kumar et al. 1997) (Método de acondicionamiento 3, Figura 3.E).

En el Método de acondicionamiento 4 los insectos se limpiaron con la batería de alcoholes, para reemplazar el medio acuoso del tejido del insecto (Xie et al., 2014) y además con el xilol al 10% como disolvente orgánico, se logró remover las trazas de cera de la superficie del cuerpo sin provocar colapso en el tejido epidermal, permitiendo el análisis de las ultraestructuras que fueron difíciles de observar en los métodos de acondicionamiento anteriores, como por ejemplo, la ultraestructura de la región tergal, poros secretores de cera como los de tipo multilocular, del ducto con anillo oral y del cerario, por lo que resultó ser el mejor proceso de los cuatro realizados (Método de acondicionamiento 4, Figura 4.A-4.D). Este es poco utilizado en MEB, por lo general se utiliza en insectos en microscopía de luz (Xie et al., 2014).

En trabajos de MEB como el de Tamaki et al. (1969), se discute que la cera de *C. pseudoceriferus* (Homoptera: Coccidae) está compuesta principalmente de ésteres de cadenas de ácidos grasos y alcoholes, los cuales fueron lavados exhaustivamente con xilol como compuesto químico. En el estudio de Jiao et al. (2000), disolvieron una sustancia cerosa compuesta por lípidos de secreción adhesiva de la superficie de las almohadillas del insecto *Tettigonia viridissima* (Ortoptera) con xilol. En el caso de las cochinillas harinosas, Boucot y Poinar (2011) explican que la cera de la cochinilla está compuesta por alcoholes, ácidos grasos y parafina, la cual se secreta en forma de filamentos. De la misma forma, Ammar et al. (2013) menciona la presencia de ésteres de cera que contienen ácidos grasos saturados y alcoholes. Por medio de la comprensión de los constituyentes orgánicos de la cera de los insectos anteriores, así como los presentes en la cochinilla harinosa, fue posible utilizar el xilol como compuestos químico diluyente de la cera del cuerpo de la cochinilla harinosa y simultáneamente evitar el colapso del tejido.



**Figura 2.** Método de acondicionamiento 2 de la cochinilla harinosa empleando el sonicador. Ultraestructuras: **A.** Ultraestructural del aparato bucal con desprendimiento del segmento del labio. **B.** Ultraestructura de cerario con el tejido circundante colapsado. **C.** Ultraestructura de poros multiloculares con el tejido circundante colapsado. **D.** Región del pigidio con el tejido limpio, pero colapsado. **E.** Ultraestructura de poros multiloculares cubiertos de cera. Muestras colectadas en el cultivo de banano de la región Atlántica de Costa Rica. 2010-2012.

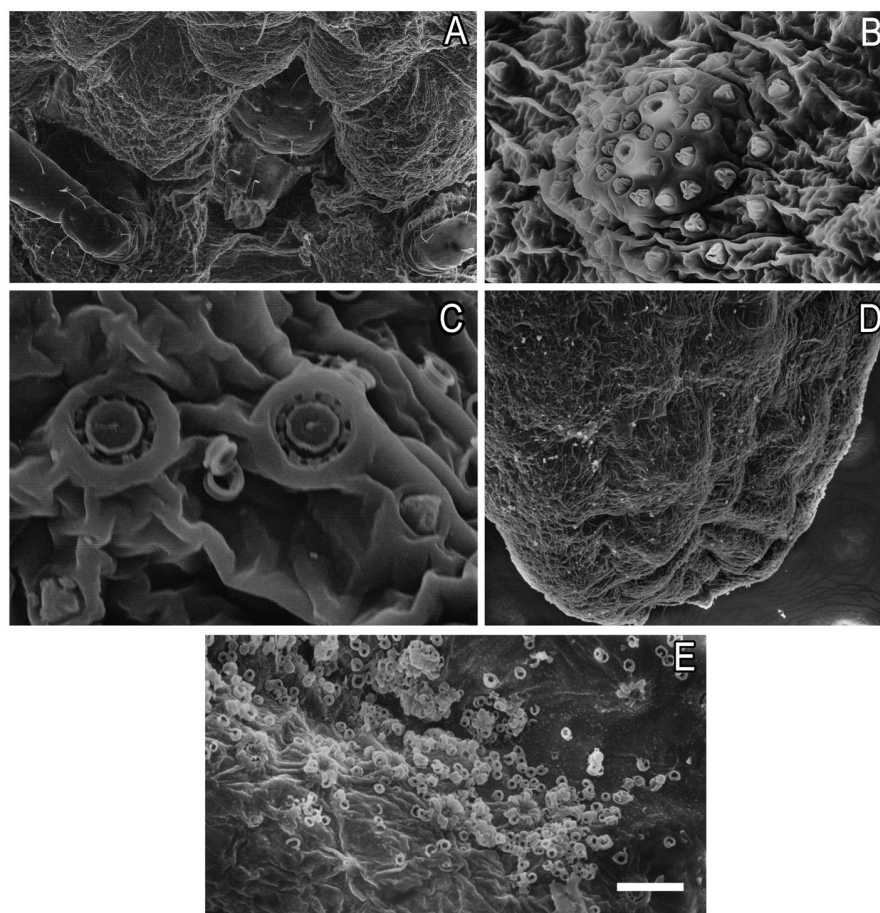
Escala: 27,4  $\mu\text{m}$  (A); 3,45  $\mu\text{m}$  (B); 1,69  $\mu\text{m}$  (C); 60  $\mu\text{m}$  (D); 25  $\mu\text{m}$  (E).

**Figure 2.** Conditioning method 2 mealybugs utilizing the sonicator. Ultrastructures: **A.** Ultrastructure of mouth parts with tear on the lip segment. **B.** Ultrastructure of cerarius with the surrounding collapsed tissue. **C.** Ultrastructure of multilocular pores with the surrounding collapsed tissue. **D.** Region of pygidium with clean tissue but collapsed. **E.** Ultrastructure of multilocular pores covered with wax. Samples collected from banana crop from the Atlantic region, Costa Rica. 2010-2012.

Scale: 27.4  $\mu\text{m}$  (A); 3.45  $\mu\text{m}$  (B); 1.69  $\mu\text{m}$  (C); 60  $\mu\text{m}$  (D); 25  $\mu\text{m}$  (E).

Después de analizar los resultados para la manipulación de la cochinilla harinosa con la técnica de MEB se concluyó que el tratamiento más recomendable fue en el que se utilizó xilol (Método

de acondicionamiento 4) y en algunos casos en que se utilizó etanol (Método de acondicionamiento 3), mientras que los tratamientos menos recomendables fueron el Método de acondicionamiento 1 (Karnovsky



**Figura 3.** Método de acondicionamiento 3 de la cochinilla harinosa empleando etanol al 95% y 100%. Ultraestructuras: **A.** Región esternal del cuerpo cubierto de cera. **B.** Región de la cabeza con un gran bloque compacto de cera. **C.** Ultraestructura de las partes bucales con presencia de cera. **D.** Ultraestructura del cerario que corresponde a uno de los poros secretores de cera con gran cantidad de la misma a su alrededor. **E.** Región del pigidio con cera dispersa a su alrededor. Muestras colectadas del cultivo de banano de la región Atlántica de Costa Rica. 2010-2012.

Escala: 360  $\mu\text{m}$  (A); 30  $\mu\text{m}$  (B); 34  $\mu\text{m}$  (C); 4,4  $\mu\text{m}$  (D); 11  $\mu\text{m}$  (E).

**Figure 3.** Conditioning method 3 for mealybugs utilizing 95% and 100% ethanol. Ultrastructures: **A.** Sternal region of the body covered with wax. **B.** Region of head covered with a large compact block of wax. **C.** Ultrastructure of mouth parts with wax around. **D.** Ultrastructure of cerarius covered with traces of wax around. **E.** Region of pygidium with traces of wax. Samples collected from banana crop from the Atlantic region, Costa Rica. 2010-2012.

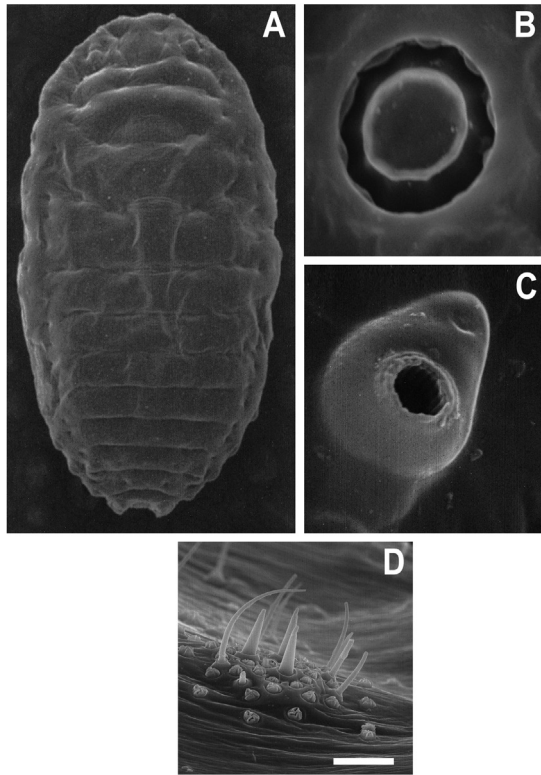
Scale: 360  $\mu\text{m}$  (A); 30  $\mu\text{m}$  (B); 34  $\mu\text{m}$  (C); 4,4  $\mu\text{m}$  (D); 11  $\mu\text{m}$  (E).

y tetraóxido de osmio), así como el Método de acondicionamiento 2 (sonicador). De esta forma, la correcta elección de la técnica permite reducir el tiempo de acondicionamiento, así como costos en el uso de reactivos.

## AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el financiamiento para el desarrollo del Proyecto código 810-B2-232, al





**Figura 4.** Método de acondicionamiento 4 de la cochinilla harinosa empleando xilol al 10%, como disolvente orgánico que removió las trazas de cera sin provocar colapso de la superficie del cuerpo. Ultraestructuras: **A.** Región tergal del cuerpo del insecto completamente limpia. **B.** Ultraestructura del poro multilocular sin presencia de cera y tejido compacto. **C.** Ultraestructura del ducto con anillo oral, otro poro sin presencia de cera y con tejido compacto. **D.** Ultraestructura del cerario, un tercer poro completamente limpio y con tejido compacto. Muestras colectadas del cultivo de banano de la región Atlántica de Costa Rica. 2010-2012. Escala: 150  $\mu\text{m}$  (A); 1,25  $\mu\text{m}$  (B); 0,49  $\mu\text{m}$  (C), 3,08  $\mu\text{m}$  (D).

**Figure 4.** Conditioning method 4 for mealybugs utilizing 10% xylene, as an organic solvent that removed traces of wax without causing collapse of the body surface. Ultrastructures: **A.** Tergal region of the body of the insect completely clean. **B.** Ultrastructure of multilocular pore without wax and compact tissue. **C.** Ultrastructure of the oral ring tubular duct, another pore without wax and compact tissue. **D.** Ultrastructure of cerarius, a third pore completely clean and with compact tissue. Samples collected from banana crop from the Atlantic region, Costa Rica. 2010-2012. Scale: 150  $\mu\text{m}$  (A); 1,25  $\mu\text{m}$  (B); 0,49  $\mu\text{m}$  (C), 3,08  $\mu\text{m}$  (D).

CIEMIC por la disponibilidad de las instalaciones y a la MSc. Ethel Sánchez de este centro de investigación por la revisión y valiosos comentarios para este trabajo.

## LITERATURA CITADA

- Ammar, E.D., R. Alessandro, R.G. Shatters, and D.G. Hall. 2013. Behavioral, ultrastructural and chemical studies on the honeydew and waxy secretions by nymphs and adults of the Asian Citrus Psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). PLoS ONE 8:e64938.
- Boucot, A.J., y G.O. Poinar. 2011. Compendio comportamiento fossil. 1 Ed. (En inglés) Taylor & Frnacis group, FL, USA.
- Burón, R.I., J.A.R. González, M.P. Malagón, y J.M.M. Villalba. 2010. Técnicas básicas en microscopía electrónica: metodología de la experimentación en biología celular. Informe Técnico. Córdoba, ESP.
- Granara de Willink, M.C. 2004. Una especie nueva de *Discococcus* (Hemiptera: Pseudococcidae) para la Región Neotropical. Rev. Soc. Entomol. Argent. 63:79-86.
- Hardy, N.B., P.J. Gullan, y C.J. Hodgson. 2008. Una clasificación a nivel de subfamilia de la cochinilla harinosa (Hemiptera: Pseudococcidae) basada en datos moleculares y morfológicos integrados. (En inglés) System. Entomol. 33:51-71.
- Jiao, Y., S. Gorb, y M. Scherge. 2000. Medida de adhesión en la unión de las patas de *Tettigonia viridissima* (Orthoptera, insecta). (En inglés) J. Exp. Biol. 203:1887-1895.
- Kumar, V., S.K. Tewari, y R.K. Datta. 1997. Poros dérmicos y secreción de cera en la cochinilla harinosa *Maconellicoccus hirsutus* (Hemiptera, Pseudococcidae), una plaga de la mora (En inglés). Ital. J. Zool. 64:307-311.
- Lucchi, A., y E. Mazzoni. 2004. Producción de cera en adultos de Planthoppers (Homoptera: Fulgoroidea) con particular referencia en *Metcalfa pruinosa* (Flatidae). (En inglés) Ann. Entomol. Soc. Am. 97:1294-1298.
- Malausa, T., A. Fenis, S. Warot, J.F. Germain, N. Ris, E. Prado, M. Botton, F. Vanlerberghe-Masutti, R. Sforza, C. Cruaud, A. Couloux, y P. Kreiter. 2011. Marcadores de AND para desentrañar taxones complejos crípticos en cochinillas harinosas (Hemiptera: Pseudococcidae). (En inglés) J. Appl. Entomol. 135:142-155.
- Miller, D.R., A. Rung, G.L. Venable, and R.J. Gill. 2007. ScaleNet. Scale insects: identification tools, images,

- and diagnostic information for species of quarantine significance. Systematic Entomology Laboratory USDA-ARS. <http://www.sel.barc.usda.gov/scalekeys/ScaleInsectsHome/ScaleInsectsHome.htm> (consultado 9 jul. 2014)
- Murillo, P., H. Aguilar, y E. Sánchez. 2013. Uso de diferentes técnicas de MEB en el estudio de *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae) en Costa Rica. (En inglés) Cuadernos de Invest. UNED 5:201-208.
- Nieto, L.M.G., editor. 2010. Fundamentos en la preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido. Junio 2010. ECOSUR. Tapachula, Chiapas, MEX.
- Özen, A., y A. Ceylan. 2013. Principios generales de protocolo de preparación de microscopía electrónica. (En inglés) Niche 1:5-8.
- Ramos, P.A., y C.F. Serna. 2004. Coccoidea de Colombia, con énfasis en las cochinillas harinosas (Hemiptera: Pseudococcidae). Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 57:2383-2412.
- Tamaki, Y. T. Yushima, y S. Kawai. 1969. Secreción de cera en insectos de escala, *Ceroplastes pseudoceriferus* GREEN (Homoptera: Coccidae). (En inglés) Appl. Ent. Zool 4:126-34.
- Vargas, A., Z. Duque, y M. De Romero. 2007. Parámetros de sonicación para el desprendimiento y estudio de las biopelículas generadas por biocorrosión. Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia 30:216-224.
- Xie, Y., F. Tian, W. Liu, Y. Zhang, J. Xue, Y. Zhao, y J. Wu. 2014. The wax glands and wax secretion of *Matsucoccus matsumurae* at different development stages. Arthropod Struct. Dev. 43:193-204.
- Ying-Ping, X., X. Jiao-Liang, y Z. Le-Yi. 2004. Ultra-morfología y composición química de la cera secretada por el insecto de escala *Dicyphococcus bigibbus* (Homoptera: Coccidae). (En inglés) Act. Entomol. Sinica 47:320-328.
- Zhang, Y., Y. Xie, J. Xue, X. Fu, y W. Liu. 2012. La estructura de integumento y glándulas de cera de *Phenacoccus fraxinus* (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae). (En inglés) Zool. Res. 33:13-17.