

naspis salicis del Centro y Sur. *Eulecanium coryli* del Centro y Sierra Nevada. El *Pseudococcus citri* se encuentra en la zona costera mediterránea.

Las *Ripersia*, *Newsteadia*, *Arctorthetia* y *Paleococcus* se encuentran en la Sierra del Guadarrama.

Los *Asterolecanium* y *Kermococcus* en el Centro y el antiguo reino de León, y el último también en Andalucía.

En resumen: encontramos como propios y exclusivos de la región mediterránea: *Ceroplastes rusci*, *Lepidosaphes gloverii*, *Lepidosaphes citricola*, *Lepidosaphes ficifoliae*, *Lepidosaphes conchiformis*, *Parlatoreoa pergandei*, *Hemiberlesea*, *Parlatoreoa zizyphi*, *Pseudococcus vitis*, *Diaspidiotus lataniae*, acompañados por *Aspidiotus hederae*, *Diaspis visci*, *Pseudococcus citri*, *Lepidosaphes ulmi*, *Chrysomphalus dictyospermi*, *Leucaspis pusilla*, *Eulecanium corni*, *Parlatoreoa oleae* y otros.

Como propios y exclusivos de la Sierra del Guadarrama: el *Leucaspis lörwii*, *Aspidiotus abietis*, *Paleococcus fuscipennis*, *Ripersia*, *Newsteadia* y *Arctorthetia*.

Como propia de Baleares está la *Parlatoreoa pergandei v. camelliae*.

Todo esto en cuanto se refiere a España, pues, al mencionar los citados como propios y exclusivos, nos referimos solamente a su distribución dentro de la Península Ibérica.

Recolección, preparación y conservación de los Coccídios.

Recolección.

La manera de recolectarlos es buscando bien en las hojas, ramas, tronco y frutos donde viven estos insectos, pero teniendo en cuenta que con más facilidad se suelen encontrar en las ramas escondidas en la espesura, por lo que es necesario meterse entre estas ramas y examinarlas con detenimiento, pues no siempre se encuentran en gran abundancia para verse al primer golpe de vista. Además, algunos adquieren el color de la corteza y pasan desapercibidos. Otros, se parecen a gotas de agua colocadas sobre las hojas y ramas. En otros casos es necesario quitar la corteza del árbol, por vivir el animal debajo al convertirse en adulto, o también levantarla. También es necesario arrancar cuidadosamente raíces, pues algunos viven en ellas, o levantar piedras donde se sospeche la existencia de hormigueros, por haber algunos Coccídios asociados a hormigas. Para ello se observa si hay algún hormiguero en la base de la planta.

Una vez recogidos, se procede a colocarlos dentro de tubos de vidrio tapados con algodón y acompañados de las hormigas o animales asociados

a ellos, separando en tubo aparte los depredadores. Se consignará el nombre de la planta en que viven, y si no es conocida, se puede recolectar una parte característica de ella para su clasificación; luego se envuelven los tubos con algodones para evitar su rotura.

Cuando el trozo de planta no permite por su tamaño el meterlo dentro de un tubo, se procede a envolverlo en un papel, con cuidado, para evitar su mezcla con otro y evitar el error posterior que pudiera traer esta confusión.

La recogida en tubos de vidrio es preferible, pues, al mismo tiempo, evita la pérdida de los parásitos que pudieran salir antes de hacer su estudio en el Laboratorio.

Métodos de preparación.

La preparación de los Coccídios puede hacerse para su estudio microscópico y clasificación o para fines didácticos o para su conservación.

1.^º PREPARACIÓN MACROSCÓPICA.— Ésta se hace pegando el animal a un pequeño cartoncito o cartulina, como se hace con el resto de los insectos, valiéndose de goma arábiga fenicada o de la goma azucarada que se emplea para pegar los demás insectos. Sólo se puede hacer con los esqueletos y sus despojos y con animales de cuerpo duro, pues los Pseudococcinos de cuerpo blando, al desecarse, se retraen y quedan en malas condiciones.

2.^º PREPARACIÓN MICROGRÁFICA.— La preparación micrográfica de los Coccídios es una operación indispensable para su estudio, pues su clasificación se basa en detalles estructurales de sus diferentes órganos y reviste una gran importancia, pues de su buena preparación depende la facilidad para interpretar los detalles morfológicos o de estructura, pudiendo llegar con éxito a la clasificación del adulto.

El tamaño de los Coccídios es variable, pero, a pesar de haber algunos de una buena magnitud, no obstante su clasificación, requiere apreciar detalles que precisan para poderlos percibir el empleo del microscopio, y esto sólo se puede hacer mediante su preparación micrográfica (1).

Para proceder a ello, y una vez recolectados, se procede a separarlos de la parte del vegetal donde se hallan fijos, operación que, según el tamaño del animal, se hace a mano o valiéndose de un alfiler o aguja emmangada y colocándose sobre una mesa provista de un papel blanco, para evitar, si se desprende con violencia, la pérdida del animal.

(1) Véase GÓMEZ MENOR (J.): *Sobre la preparación micrográfica de cochinillas (Coccídios)*. "Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola". Vol. II, páginas 27-29. Madrid, 1927.

Para desprenderlo se mete por su base y cuidando no pincharle la aguja o alfiler, y se levanta poco a poco, para evitar que salte bruscamente. Puede suceder que el animal salga unido a sus cubiertas o se separe de ellas. Cuando sale unido se procede a separarle con cuidado, para evitar su rotura, y las cubiertas se dejan aparte para ser montadas sobre cartulina. Al extraer el animal, éste puede encontrarse acompañado de su puesta o de larvas, y en este caso se recogen y se procede a su conservación hasta que se preparen.

Una vez libre de la cubierta y larvas, se procede a observar si se trata de una hembra adulta o de una cubierta ninfa que lleva en su interior una hembra adulta, como ocurre con las hembras criptóginas, y en este caso se procede a romper la cubierta ninfa partiendo del sitio correspondiente a la base del rostro o pico. Esta operación se hace fijando el animal en un porta-objetos, mediante una pequeña gota de líquido de Hoyer, en uno de los bordes de la gota y dejándola endurecerse un momento; luego, debajo del microscopio binocular y valiéndose de dos alfileres enmangados de los llamados «minúsculas» — que se emplean para el montado con médula de sauco de micro-insectos — se rompe desde la base del rostro la cubierta ninfa y se extrae la hembra adulta. Estos ejemplares de hembras criptóginas, generalmente son muy transparentes, y no necesitan aclarado ninguno para su montaje, pudiéndose montar directamente — en xilol-bálsamo de Canadá, en líquido de Faure o de Hoyer — o proceder a su fijación y coloración para montar en bálsamo de Canadá o Euparol Grüber.

Obtenida la hembra adulta objeto de preparación micrográfica, se puede proceder a aplicar una de las siguientes técnicas:

- 1.^º Montaje directo en xilol-bálsamo de Canadá.
- 2.^º Montaje en líquido de Faure o de Hoyer.
- 3.^º Montaje en xilol-bálsamo de Canadá del insecto coloreado.
- 4.^º Montaje del insecto coloreado en Euparol Grüber.

El primero y el tercer método están descritos con toda claridad y precisión por el Ingeniero Agrónomo D. Jesús BERRO en un trabajo (1), del que reproduczo los siguientes párrafos.

Se procede así: «Con gran cuidado se van colocando en un tubito de cristal, en el que se ha puesto un poco de xilol puro, los insectos. Transcurridas veinticuatro a cuarenta y ocho horas, según el tamaño del insecto, se vuelca el contenido del tubo en un vidrio de reloj. Se pone en el centro de un portaobjetos una gota del xilol-bálsamo, y en ella, con el auxilio del

(1) J. BERRO AGUILERA: *Técnica de las preparaciones micrográficas para el estudio de los Coccidos*. "Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola". Vol. V, páginas 38-46. Madrid, 1931.

microscopio binocular y agujas, se colocan los insectos bien ordenados y en la posición que se desee; basta ya dejar secar un poco y tapar con un cubreobjetos, en el cual se ha puesto una gotita de bálsamo, para que la preparación cierre, quedando los insectos en la posición fijada.»

El tercer método es el conocido de coloración del insecto y pase por la serie de alcoholes, xilol y montaje. «Esto, dicho de una manera tan sencilla, cuando se lleva a la práctica, presenta dos grandes dificultades si se trata de Diaspinos o de larvas: 1.^a, por lo difícil de manipular micro-insectos nadando en líquidos alcohólicos, y 2.^a, por la deformación natural al deshidratado y manipulaciones.»

«Estas dificultades se vencen fijando el insecto al portaobjetos y se procede para ello así: Una vez que hemos hervido los insectos en solución de potasa al 10 por 100 y lavado, separados unos cuantos ejemplares, que se pueden montar directamente en líquido de Hoyer, el resto de los ejemplares continúan en la solución, en baño de María, hasta la total decoloración y disolución de la cera interna. Llegados a este punto, se extraen los insectos y se colocan en un vidrio de reloj, lavándolos con agua destilada, a la que se le hayan añadido unas gotas de ácido acético.»

«La fijación al porta la realizamos por medio de la albúmina de Mayer, que se prepara del modo siguiente: Se toman dos huevos de gallina, a ser posible recién puestos; se rompen y se vierte su clara en una cápsula, donde se le añaden unos terroncitos de timol o alcanfor, y se procede a batirlas. Terminada esta operación, se vierte sobre un papel de filtro ordinario colocado sobre un embudo, debajo del cual se ha puesto la probeta graduada. Al día siguiente, se lee en la probeta la cantidad de albúmina filtrada, se le pone igual cantidad de glicerina, otro terroncito de timol o alcanfor y todo se vierte en un frasco. De esta forma se conserva varios años sin alterarse.»

«Para operar con ella, en el caso que nos ocupa, se toma una gotita del tamaño de la cabeza de un alfiler y se coloca en el centro de un porta. Se extiende con el dedo y sobre ella se pone otra gota de agua destilada. El porta, preparado de esta forma, se pone en la platina del microscopio binocular y con las agujas de que antes hablamos se toman los insectos y se colocan en la gota, dándoles la posición más adecuada al estudio.»

«Terminada la anterior colocación, con una tiritita de papel secante, se quita todo el exceso de líquido, procurando enjugar todos los espacios y continuando hasta que los insectos sólo queden en contacto con el agua albuminosa por la parte en que tocan al cristal. Llegado este momento se lleva el porta a una estufa (también puede hacerse en una platina metálica que se calienta con una lamparilla por el otro extremo), elevando la temperatura de ésta hasta 70 u 80° centígrados y manteniéndola por un

tiempo de dos minutos. De esta forma se coagula la albúmina, los insectos quedan adheridos al porta y podemos ya manipularlos con toda facilidad, evitando las deformaciones.»

«*Coloración.* — Para proceder a colorearlos hemos de tener en cuenta qué parte del insecto nos conviene destacar más, pues las paletas y partes quitinosas se colorean muy bien con el rojo de Magenta, mientras que los detalles de los peines se destacan mejor con el verde malaquita y violeta dalia. Según se emplee uno u otro colorante varía algo la técnica, pues el rojo Magenta no colorea de modo persistente la albúmina y sí los segundos colorantes; por lo que, en este caso, hay que proceder previamente a la tinción.»

«El caso corriente es emplear Magenta, y para colorear con él nos basta colocar de plano el porta — con los insectos fijados — y con una pipeta verter una gota del colorante, que se habrá preparado disolviendo en agua alcoholizada rojo Magenta al 1 por 100. Transcurridos de diez a quince minutos, el insecto habrá sido coloreado con exceso; entonces se lava con agua destilada y después se procede a la deshidratación, como más adelante diremos.»

«Si queremos más detalles interiores, así como una buena coloración de peines, operaremos del modo siguiente: Despues de lavados y neutralizada la potasa, los insectos se ponen en un vidrio de reloj con unas gotas del segundo colorante mencionado, que se prepara disolviendo en 100 cc. de agua destilada 0,5 g. de verde de malaquita y 0,5 g. de violeta de dalia. Se mantienen en él cinco a diez minutos, para colorearles con exceso. Se pasan al agua destilada y después de un lavado prolongado se fijan al porta con la albúmina de Mayer.»

«Empleando cualquiera de los dos métodos, nos encontramos con los insectos coloreados y fijos al porta, para proceder a la deshidratación y montaje, que es lo más difícil de realizar sin que se deformen cuando operamos con los insectos sueltos.»

«*Deshidratación y montaje.* — Para realizar esta operación ya sólo manipulamos con los portaobjetos, en los cuales hemos fijado los insectos. Se prepara una batería de seis tubos Borel, poniendo en los cinco primeros la serie de alcoholes de 60° al absoluto, y en el último xilol.»

«Se van sumergiendo los portas con los insectos coloreados manteniéndolos en cada tubo unos cinco minutos. Ya dijimos que las coloraciones que empleamos se habían hecho con exceso; pues siendo los colorantes que empleamos solubles en alcohol, este exceso queda rebajado en la deshidratación y ésta hay que llevarla de tal forma, que quede terminada al mismo tiempo que la coloración llega al punto preciso, cosa que se consigue fácilmente con algo de práctica y auxiliándose siempre con un microscopio, en el que vaya-

mos observando la debilitación del colorante hasta la intensidad deseada, momento que debe coincidir con su paso por el alcohol absoluto.»

«Llegado a este punto se introduce el porta en el tubo que contiene xilol, se mantiene en él unos quince minutos, se saca de este baño, se le pone una gota de bálsamo de Canadá disuelto en xilol y se coloca el cubre.»

El segundo procedimiento es el montaje en líquido Faure o de Hoyer. Se puede hacer directamente el montaje del insecto sin aclarado ninguno — como es bastante frecuente para las larvas, huevos y machos adultos de los Diaspinos — o proceder antes al aclarado del animal.

Este aclarado se hace hirviendo los insectos en potasa o sosa cáustica disuelta en agua destilada en proporción de 10 g. de ésta para 100 cc. de agua.

Para ello se coloca una pequeña cantidad de la solución, como dos dedos, en un tubo de ensayo o de algo menor tamaño y en la solución se sumergen los insectos vivos, muertos o secos. Bien seco el tubo por el exterior se procede a su caldeo hasta hacer que hierva la potasa, retirando el tubo cuando hierva demasiado y volviéndole a calentar al cesar de hervir. Esto se hace durante unos minutos y se va observando que en los que tienen cera en su cuerpo ésta se funde, después el animal cambia de color a rojo, violado o pardo y se hierve hasta que se observa translúcido el insecto lleno de líquido coloreado (1).

El hervido facilita en ocasiones el estiramiento del animal si se forman burbujas de vapor dentro de él. En los Coccídidos gruesos y de gran consistencia suele tardarse en su aclaramiento unos cinco minutos; los pequeños sólo precisan de uno a tres. En los que tienen substancias colorantes dentro de su cuerpo (*Kermococcus, Llaveia cacti*) debe de mudarse varias veces la potasa que queda teñida al hervir e impide la observación del aclarado del animal. Una vez hervidos se echan en un vidrio de reloj juntamente con la potasa caliente y en la platina del binocular se procede a separarlos de la cera, teniendo mucho cuidado, o a extraer la del interior de su cuerpo valiéndose de una rotura que se les produce con las agujas al nivel de la articulación de dos segmentos y sacando suavemente por ella la cera. Después se procede al lavado en una poceta con agua destilada y luego al montaje directo en el líquido de Hoyer sobre una gota colocada en un portaobjetos bien limpio y con la ayuda de las agujas enmangadas se coloca uno en posición dorsal y otro en posición ventral, y luego, con cuidado, y colocada una gota del mismo líquido en el cubre objetos, se procede a colocarlo encima para dejar terminada la preparación.

(1) Una técnica útil para destacar en las preparaciones de *Pseudococcus* los caracteres más importantes en la publicada por FERRIS (G. F.): *Methods for the study of Mealy-bugs* («Journal of Economic Entomology», Vol. X, núm. 3, páginas 321-325). *J. del C.*

La fórmula del líquido de Hoyer es:

Agua destilada	50 cc.
Goma arábiga en lágrimas	30 g.
Cloral hidratado	200 »
Glicerina.	20 »

Para prepararlo se deja la goma en agua durante unas horas o hasta la completa disolución, una vez disuelto se añade el hidrato del cloral y luego la glicerina y después se procede a filtrar, lo que se tiene que hacer a presión o en vacío, y se repite la filtración hasta su completo aclarado.

La técnica del cuarto método o montado de los insectos coloreados en Euparol Grüber es la siguiente: primero, aclarado por la solución de potasa tal como se hace para el montaje en xilol-bálsamo de Canadá; los insectos después de hervidos se lavan en alcohol acético (preparado con 20 partes de ácido acético para 80 de alcohol de 50 grados), y una vez lavados, se procede a su tinción en fuchsina disuelta en agua durante quince minutos; cuando se ha pasado un poco de la coloración deseada se aclara en agua, se pasan a alcohol de 95 grados y directamente se montan en un porta con Euparol, colocando a continuación con el cubreobjetos (1).

Conservación.

Para la conservación del material recolectado, una vez hecho su estudio, se procede de la forma siguiente: Los animales que viven fijos en las hojas o partes de planta se pueden conservar con la planta para formar una kermoteca, y para ello se envenena la planta en una solución alcohólica de blicloruro de mercurio (sublimado corrosivo) al 40 por 100 en alcohol de 60 grados, después se les deja secar en papel de herbario y luego, en el caso de que los Coccídios no sufran deformaciones por la presión se les coloca en una prensa y se fijan a papel como las plantas recolectadas en herbario, po-

(1) Hecho el montaje de las preparaciones adecuadamente, pueden obtenerse excelentes microfotografías de Coccídios. Sobre la técnica aconsejable puede consultarse, además del trabajo de BERRO, citado en la página 26, el de COOLEY (R. A.): *Photomicrography of the Diaspinidae* (*Journal of Economic Entomology*, vol. II, núm. 1, páginas 95-99, 1909).

En la ilustración de este libro hemos adicionado una serie de fotografías, macro y microscópicas, que tienen ciertas ventajas sobre el dibujo, sin perjuicio de incluir buen número de dibujos de conjunto y de detalle — casi todos originales del autor —, a los que sirven aquéllas de complemento. Estas fotografías han sido obtenidas: unas, en la Estación Central de Fitopatología Agrícola (Madrid, La Moncloa), y las demás en las Estaciones de Almería y Valencia.—J. del C.

niendo en la parte inferior el nombre del animal, la fecha de su captura, la localidad y los nombres del colector y de la planta sobre la que vive.

Los Cóccidos que son susceptibles de deformarse, se procede a prepararlos en cartón como el resto de los insectos y en la forma antes indicada, sobre todo los machos de gran tamaño; pero, como son animales de piel muy fina, es necesario después de preparados dejarlos desecar en atmósfera algo húmeda, pues una desecación rápida lleva consigo la completa deformación del animal y la pérdida completa de su aspecto normal. Los huevos se conservan en preparación micrográfica, montados en líquido de Hoyer, pero colocando uno o dos trocitos de cubreobjetos en la misma gota sobre el porta, para que al colocar el cubre no sufran aplastamiento y deformación. La conservación de escudos se puede hacer pegados en cartulinas.

Para conservar las hembras sin cubierta y los machos se les puede poner en un tubo con alcohol de 50 grados después de cocerlos en agua, y también se puede proceder a la conservación en alcohol de 70 grados.

Una fórmula que igualmente da buenos resultados para la conservación de insectos, que apenas pierden coloración, es la siguiente:

Agua destilada	100 cc.
Sal común	7.5 g.
Formol al 40 por 100	5 cc.

Para prepararla se disuelve la sal en el agua y luego se añade el formol.

El material empleado para la preparación, estudio y conservación de estos animales consta de portaobjetos, cubreobjetos, agujas, alfileres finos enmangados, cubetas, vidrios de reloj, cartones para preparación de insectos, goma arábiga fenicada, potasa al 10 por 100, bálsamo de Canadá disuelto en xilol, serie de alcoholes, Euparol, alcohol acético, colorantes, microscopio compuesto y binocular, papel para herbarios, prensa y cajas para colecciónar insectos.

Para la conservación de las preparaciones microscópicas se necesitan cajas o armarios de preparaciones.

