

Nuevo método para el estudio de cromosomas en Coleoptera a partir de hemocitos de estados larvarios

R. BARAGAÑO

Se presenta un método sencillo, rápido y asequible a cualquier laboratorio no especializado para obtener en Coleoptera cromosomas mitóticos bien caracterizados a partir de hemocitos de estados larvarios. Como muestra indicativa se ofrecen varias placas metafásicas y los cariotipos de hembras de *Chalcophora mariana* L. (Buprestidae) y de *Ergates faber* L. (Cerambycidae), ambas desconocidas cariológicamente, junto con metafases y el cariotipo del macho de *E. faber* L.

R. BARAGAÑO. *Cátedra de Zoología y Entomología. E.T.S. de Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid.*

Para el estudio cromosómico de los insectos pertenecientes al Orden Coleoptera, iniciado por CARNOY (1885), se han venido aplicando dos métodos citológicos principales:

— el método de inclusión y cortes o método de la parafina, el cual desde el comienzo y durante largo tiempo se empleó casi con exclusividad.

— y más recientemente, desde el trabajo de SMITH (1943), el método del aplastamiento («squash») cuyas ventajas en cuanto a sencillez, rapidez y eficacia han terminado imponiéndose de un modo prácticamente general en este tipo de investigaciones.

Otros métodos citológicos generales han tenido en este campo concreto una difusión mucho menos importante. Así ocurre, por ejemplo, con el método inicialmente propuesto por SCHNEIDER en 1880, conocido como método del carmín-acético o método directo de fijación-tinción (STEVENS, 1909; GUENIN, 1952, 1953; SUOMALAINEN, 1954; WAHRMAN,

1966) o con el método del frotis (BRAUER, 1928; SCOTT, 1936; DASGUPTA, 1963).

También muy escasa ha sido la aplicación del método de «secado al aire» (DUTRILLAUX y CHEVIN, 1969; DUTRILLAUX, 1970; LUE y col., 1972) de los modernos métodos de cultivo de tejidos (LUE y col. (1.c.) o las técnicas citogenéticas de identificación cromosómica denominadas autorradiográficas (WEBER, 1968), o de listado de bandas (ENNIS, 1974; REES y col., 1976).

En cuanto al material más universalmente utilizado desde el comienzo de estas investigaciones citológicas hasta nuestros días son las gónadas masculinas, extraídas del insecto adulto. En ellos tanto las divisiones meióticas, en primer lugar y principalmente, como las mitosis goniales, sirven para determinar el número de cromosomas característico de cada especie, pudiéndose llegar en no pocos casos por su comportamiento y morfología a la identificación de los cromosomas sexuales. Con mucha mayor dificultad, sin embargo, se alcanza a definir e

identificar el resto del complemento cromosómico.

Material menos empleado son los ovarios extraídos de hembras adultas, debido a las peculiaridades que presentan en este estado tanto la fase de proliferación como de maduración de las células germinales.

Menos frecuente es aún la utilización de estados inmaduros (larvas y pupas) para estudiar en ellas las gónadas, ya que solamente en períodos inmediatos al estado adulto alcanzan éstas un conveniente desarrollo en determinadas especies.

En fin, las mitosis somáticas se obtienen casi siempre de embriones en desarrollo (WIEMAN, 1910; HOY, 1914, 1918; BRAUER, 1928; SEILER, 1947; MIKULSKA, 1960; TAKENOUCHI, 1970; YADAV, 1973; PETRYSZAK, 1975), siendo más limitada la utilización de otros tejidos u órganos, pertenecientes a estados inmaduros o adultos, tales como músculos, tracto digestivo, células foliculares ováricas, etc. (SSTEVENS, 1905, 1906, 1909).

Los múltiples trabajos aparecidos en los casi cien años de dedicación a este tipo de estudios nos ofrecen hoy el conocimiento de las constituciones cromosómicas de un número de coleópteros que sobrepasa ampliamente el millar. No obstante, los resultados obtenidos se reducen en la mayoría de los casos a meros datos numéricos, pudiendo calificarse, a la vista de todo el conjunto, con todo rigor de excepcional la simple individualización y homologación de todos los pares cromosómicos de una determinada especie.

En el conjunto de los trabajos se echan también de menos unos más amplios estudios comparativos o filogenéticos apoyados en estudios cromosómicos que ayuden a establecer aún mejor las relaciones que existen entre los distintos grupos de este importante Orden de Insectos. Quizá una de las razones principales, si no la principal, que explique estos hechos, es la

falta de un material idóneo y de un método adecuado para obtener preparaciones microscópicas de calidad.

Por todo ello, en el presente trabajo se propone una técnica citológica, empleada ya rutinariamente en nuestro laboratorio.

- nueva, en cuanto al material a utilizar,
- sencilla y rápida en los procedimientos de procesado,
- asequible a cualquier tipo de laboratorio no especializado,
- y eficaz, en el sentido de que permite obtener preparaciones en las que puede realizarse una mejor caracterización e individualización de los cromosomas.

MATERIAL

El material empleado en nuestros estudios fueron coleópteros en distintas fases de su desarrollo larvario.

La elección de larvas en lugar de insectos en estado adulto ha estado condicionada principalmente por el nuevo tipo de células, que han constituido el objeto directo de estudio, es decir, los hemocitos.

La forma y estructura que presentan estas células de la hemolinfa de los insectos son muy variadas, incluso dentro de un mismo organismo, y múltiples son también las funciones que desempeñan. De ahí que reine un verdadero confusiónismo a la hora de intentar establecer una terminología general y una clasificación concreta, según sean los criterios adoptados por los diversos autores (véanse las revisiones de WIGGLESWORTH, 1959; JONES; 1962 y HOFFMANN y GRASSE, 1976).

Por otro lado, el conocimiento de que la diferencia postembrionara de los hemocitos se realiza en diversos órganos hematopoyéticos por mecanismos comparables a los que presenta por mecanismos comparables a los que presentan los vertebrados (L'HELIAS, 1953; ARVY, 1953a, 1953b; CROSSLEY, 1964; WIGGLES-

WORTH, 1970; JONES, 1970; HOFFMANN, 1970; AKAI y SATO, 1971; ZACHARY y HOFFMANN, 1973), y de que incluso en aquellas especies en las que existen órganos hematopoyéticos muy evolucionados, algunos hemocitos, en especial los plasmotocitos, son capaces de dividirse en circulación (TYRKUS, 1971; ARNOLD, 1972; HOFFMANN, 1976), constituyeron el punto de partida para el presente estudio.

Si algunos hemocitos se dividían activamente en el seno de la hemolinfa, teóricamente, al menos, podrían suministrar un material citológico sumamente idóneo, comparable en muchos aspectos a los leucocitos obtenidos de la sangre periférica, que son la base de las investigaciones y de muchos de los éxitos en citogenética humana.

Además, el estudio del hemograma de los insectos, es decir, el examen del número total de hemocitos por mm³ y de la relación numérica entre los diferentes tipos, muestra fluctuaciones importantes, pero perfectamente regulares en el transcurso de las diferentes fases del desarrollo postembrionario. Prácticamente, en todos los insectos en los que se ha estudiado su hemograma, el número total de hemocitos aumenta en el curso de las intermudas, alcanza el máximo antes de la muda y disminuye durante el mismo proceso de la muda (OCHSE, 1944; ARNOLD, 1952; PATTONY FLINT, 1959; WHEELER, 1963).

En consecuencia, como fuente primaria de material se escogieron insectos en estado larvario, en los que, en primer lugar, la cantidad de hemolinfa es bastante más abundante que la que contienen en estado de imago, y donde también el hemograma experimenta una más variada y regular fluctuación, coincidiendo con los periodos más activos de crecimiento.

Las larvas presentan, además, otras dos notables ventajas para este tipo de estudios respecto a los insectos adultos, como son:

1. Una mayor facilidad de recolección en el campo, sobre todo cuando se trata de insectos lignícolas, los cuales suelen permanecer durante varios meses e incluso varios años en fase larvaria, quedando concentrados en un hábitat muy específico y bien delimitado.

2. Una más amplia disponibilidad en el laboratorio.

Gracias a los métodos de cría artificial, bien en dietas naturales o con distintas dietas artificiales (NOTARIO, 1977), se amplía notablemente el tiempo disponible para su estudio en el laboratorio, pudiendo, al mismo tiempo, ser controlados y seleccionados con precisión los estadios más apropiados de su desarrollo.

Por último, la utilización de hemocitos como material inmediato de estudio presenta notables ventajas frente a los materiales somáticos en uso. En efecto, los hemocitos son células ya aisladas en el seno de la hemolinfa del insecto, muy abundantes y de tal naturaleza que permiten un controlado y fácil manejo.

MÉTODOS

Dadas las características de los hemocitos, la técnica utilizada para poner de manifiesto sus cromosomas, inhibiendo directamente la consecución normal de las divisiones mitóticas dentro del propio organismo, participa de las ventajas que ofrecen en otros campos las denominadas técnicas de cultivo.

Una descripción, creemos que lo suficientemente detallada, comprendería los siguientes apartados:

Selección del material

Las larvas que han de ser sometidas a tratamiento se escogen preferentemente entre las que llevan ya algún tiempo en el laboratorio y dan muestras de una buena adaptación ambiental. Dentro de éstas son preferibles las que se hallan en los últimos estados, en los que la cantidad de

hemolinfa es más abundante, y en los períodos que siguen a la ecdisis.

Inyección de Colcemida

Como inhibidor mitótico se utilizó colcemida liofilizada (Gibco), que se presenta en viales con un contenido de 10 mcg/ml de PBS, para reconstituir con 10 ml de agua destilada.

La inyección de larvas de gran tamaño o de piel dura se realiza con agujas 25G. En larvas pequeñas o de piel delicada, para evitar los desgarros y la consiguiente pérdida de hemolinfa en el momento de retirar la aguja, se puede utilizar un capilar de vidrio acoplado a un fino tubo de plástico y éste a su vez a una jeringa (fig. 1).

En cualquier caso la inyección ha de ser hipodérmica, procurando no lesionar el tubo digestivo.

El lugar más adecuado parece ser el ápice del mesonoto, introduciendo la aguja o capilar por la sutura entre pronoto y mesonoto y paralelamente a la superficie del cuerpo (fig. 2).

La cantidad de solución de colcemida que ha de ser inyectada oscila entre 0,1 y 1 cm³, según el tamaño de la larva. En general, se considera una cantidad adecuada la que produce una turgencia relativa del cuerpo de la larva, especialmente del abdomen.

Extracción de la hemolinfa

Transcurridas de tres a cinco horas, a partir de la inyección de colcemida, se procede a la extracción de la hemolinfa.

Esta operación se efectúa sobre tubos cónicos de centrifugadora de aproximadamente 5 cm³ de capacidad, en los que previamente se han depositado una o dos gotas de suero fisiológico.

A las larvas se les practica una incisión superficial en la región lateral del protórax, apretando luego el cuerpo delicadamente con los dedos, a fin de extraer la mayor cantidad posible de hemolinfa (fig. 3).

Ha de evitarse durante esta operación que la hemolinfa que fluye por la herida se mezcle con los jugos digestivos que al mismo tiempo son expulsados por la boca del insecto. Basta para ello recoger este material digestivo con la punta de un papel de filtro.

A la hemolinfa recogida en cada tubo cónico (de 1 a 1,5 cm³) se le añade inmediatamente una cantidad igual o algo mayor de suero fisiológico, agitando al mismo tiempo el tubo para homogeneizar la mezcla. Esta dilución de la hemolinfa constituye un paso importante y necesario para conseguir una disminución de la viscosidad natural de este líquido fisiológico. Los hemocitos, por otro lado, no sufren alteraciones perceptibles por ser el suero isotónico, quedando, sin embargo, en un medio adecuado para ser concentrados por centrifugación.

Aislamiento de los hemocitos

La concentración de los hemocitos en la base cónica del tubo se consigue mediante centrifugación durante 10 minutos a 2.500 r.p.m. (1)

La eliminación del sobrenadante de un modo rápido se consigue volcando con decisión el tubo cónico e invirtiéndolo a continuación al cabo de dos o tres segundos (fig. 4). Los hemocitos, que habrán quedado adheridos a las paredes cónicas del tubo, se concentrarán en el fondo mediante una ligera agitación o bien con unos pequeños golpes dados sobre la mesa.

Tratamiento hipotónico

Para conseguir un hinchamiento de las células sanguíneas y en consecuencia una mayor dispersión de los cromosomas, se utilizaron dos medios hipotónicos:

C1K (56 mg en 100 cm³ de agua destilada)

Cl₂Mg (980 mg en 100 cm³ de agua destilada), siendo el C1K el que rindió mejores resultados.

(1) En centrifugadora JANETZK I-tipo K24

El tratamiento hipotónico se realiza vertiendo aproximadamente 1,5 cm³ de solución dentro del tubo, agitando éste suavemente y dejándolo a continuación en reposo durante 10 minutos.

Transcurrido este tiempo se pasa a centrifugar el contenido durante otros 10 minutos a 3.000 r.p.m. (fig. 5).

Concentradas de esta forma las células, la extracción del sobrenadante se realiza básicamente como en el paso anterior. Sin embargo, esta operación ha de hacerse aquí con un especial cuidado, pues de su realización depende el buen resultado de la fijación posterior.

En buena medida ayuda a una mejor eliminación del sobrenadante dejar reposar la boca del tubo, una vez volcado, sobre un papel de filtro durante unos segundos, introduciendo finalmente en su interior un rodillo de papel de filtro hasta que su extremo llegue a las proximidades de la región cónica donde se encuentran concentradas las células.

Fijación

La fijación de los hemocitos se consigue con una mezcla de 3 partes de metanol puro y 1 parte de ácido acético glacial, que ha de ser preparada inmediatamente antes de su utilización y que se conservará siempre en un recipiente cerrado.

En una pipeta Pasteur se toma aproximadamente 1,5 cm³ de esta solución fijadora y se depositan al principio un par de gotas dentro del tubo, agitándolo durante unos instantes para impedir que los hemocitos se aglutinen. A continuación se vierte el resto del fijador; se agita el tubo de nuevo, se cierra herméticamente con Parafilm M y se deja actuar el fijador durante 10 minutos (fig. 6).

Seguidamente se centrifuga el contenido durante otros 10 minutos a 3.000 r.p.m., se extrae el sobrenadante y se agita suavemente el tubo para conseguir una resuspensión de las células, que de esta forma quedan ya dispuestas para realizar con ellas la extensión microscópica.

Extensión

En un portaobjetos, bien limpio y seco, se depositan en primer lugar un par de gotas de la misma mezcla que ha servido para la fijación, moviendo el portaobjetos para que se extiendan por toda la superficie formando una fina película.

A continuación se toma la suspensión celular en una pipeta Pasteur, y, manteniendo el portaobjetos inclinado, se depositan tres o cuatro gotas sobre otros tantos puntos de su borde superior, procurando que lentamente se deslicen en líneas paralelas a los bordes laterales del portaobjetos. Luego se invierte la inclinación y se mueve éste para que las células se redistribuyan ampliamente por toda la superficie (fig. 7).

El secado de la preparación se hace colocando el portaobjetos horizontalmente sobre la llama de un mechero de alcohol e imprimiéndole un constante movimiento de vaivén, hasta que aparezca seca la casi totalidad de la superficie (fig. 8).

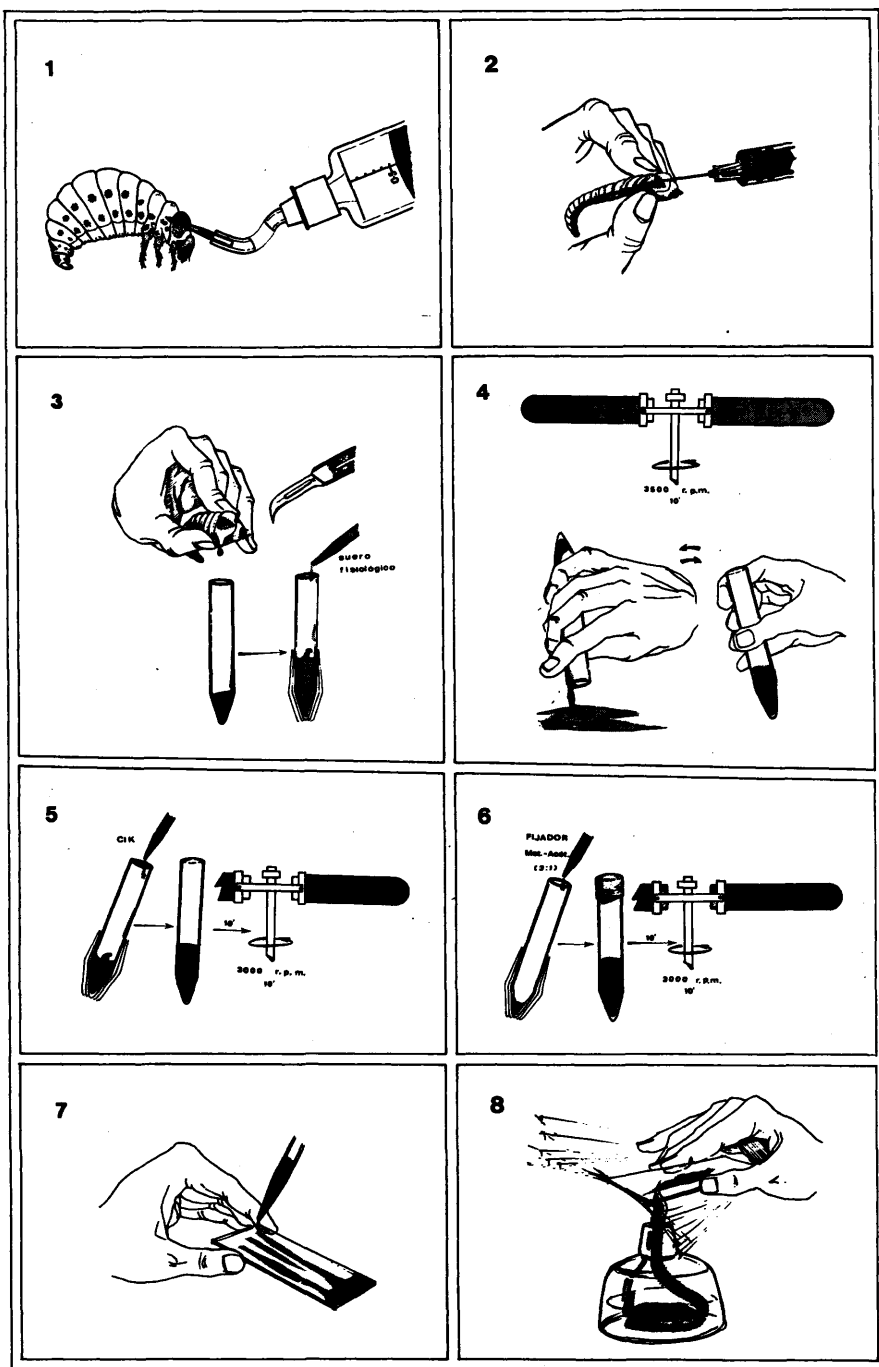
El control inmediato con el microscopio de contraste de fase permite conocer si la extensión conseguida es la adecuada y si existen y en qué forma se encuentran las metafases.

Por último, las preparaciones se colocan sobre una superficie plana y se dejan secar, definitivamente, al aire, procurando aislarlas del polvo del ambiente.

Al cabo de seis a ocho horas ya están listas para ser teñidas, aunque pueden ser archivadas y posponer la tinción durante varios meses sin que se advierta ningún deterioro.

Tinción

Una buena y rápida tinción de los cromosomas se consigue introduciendo las preparaciones durante 12 minutos en una solución de colorante Giemsa (Merck) al 10% diluido en buffer de Sorensen (pH 6,8). Esta solución tamporada de Giemsa debe prepararse en el momento en que vaya a ser realizada la tinción, y una vez terminada ésta, debe ser desechada.



Figs. 1-2. Inyección de las larvas con colcemida; 3. Extracción de la hemolinfa; 4. Aislamiento de los hemocitos; 5. Tratamiento hipotónico; 6. Fijación; 7-8. Extensión y secado de las preparaciones.

El tampon de Sorensen consta de partes iguales de:

— solución de fosfato monopotásico M/15 diluido a 1.000 cm³ de agua destilada.

— solución de fosfato bisódico M/15 diluido a 1.000 cm³ de agua destilada.

Lavado

Las preparaciones se lavan con agua corriente y se dejan secar al aire, disponiendo los portaobjetos verticalmente sobre un papel de filtro para que el agua desaparezca con rapidez y la decoloración del preparado no sea excesiva.

Fotografiado y confección de los cariotipos

Las placas metafásicas pueden ser fotografiadas en un microscopio óptico, con objetivo de inmersión, en Kodak Photomicrography Monochrome Film SO-410 utilizando un índice de exposición 80 ASA. Buenos resultados se obtienen también con la película Recordak AHU 5460 y con un índice de exposición 10 ASA. En ambos casos para el procesado se empleó como revelador Kodak D-19.

Para la confección de los cariotipos, ordinariamente las metafases, fueron ampliadas a 6.000 aumentos.

Terminada la microfotografía las preparaciones pueden conservarse de modo permanente teniendo buen cuidado de eliminar el aceite de inmersión. Basta para ello introducir el portaobjetos en un recipiente que contenga xilol puro. Transcurridos tres o cuatro minutos, se pasan a otro recipiente que contenga nuevo xilol puro y se mantienen allí durante otros tres minutos. Luego se sacan, se dejan secar y se archivan, pudiendo ser utilizadas cuantas veces fuere preciso.

RESULTADOS

Las placas metafásicas obtenidas con el método anteriormente expuesto son de suficiente calidad para determinar el número cromosómi-

co característico de la especie estudiada y para la confección y descripción de su cariotipo.

Una muestra indicativa es la que se expone en las figs. 9 a 14, donde se presentan placas metafásicas obtenidas de distintas larvas hembra de *Chalcophora mariana* Linnaeus (Buprestidae), cuyo cariotipo no había sido descrito hasta ahora (figs. 9, 10 y 11), y de larvas de ambos sexos del cerambícido *Ergates faber* Linnaeus (figs. 12, 13 y 14) cuyos machos han sido estudiados por DUTRILLAUX (1970), siendo las hembras desconocidas citogenéticamente.

La confección de los cariotipos de estas dos especies se muestran en las figs. 15, 16 y 17, pudiendo ser homologadas con facilidad todos los pares cromosómicos del complemento.

CONCLUSIONES

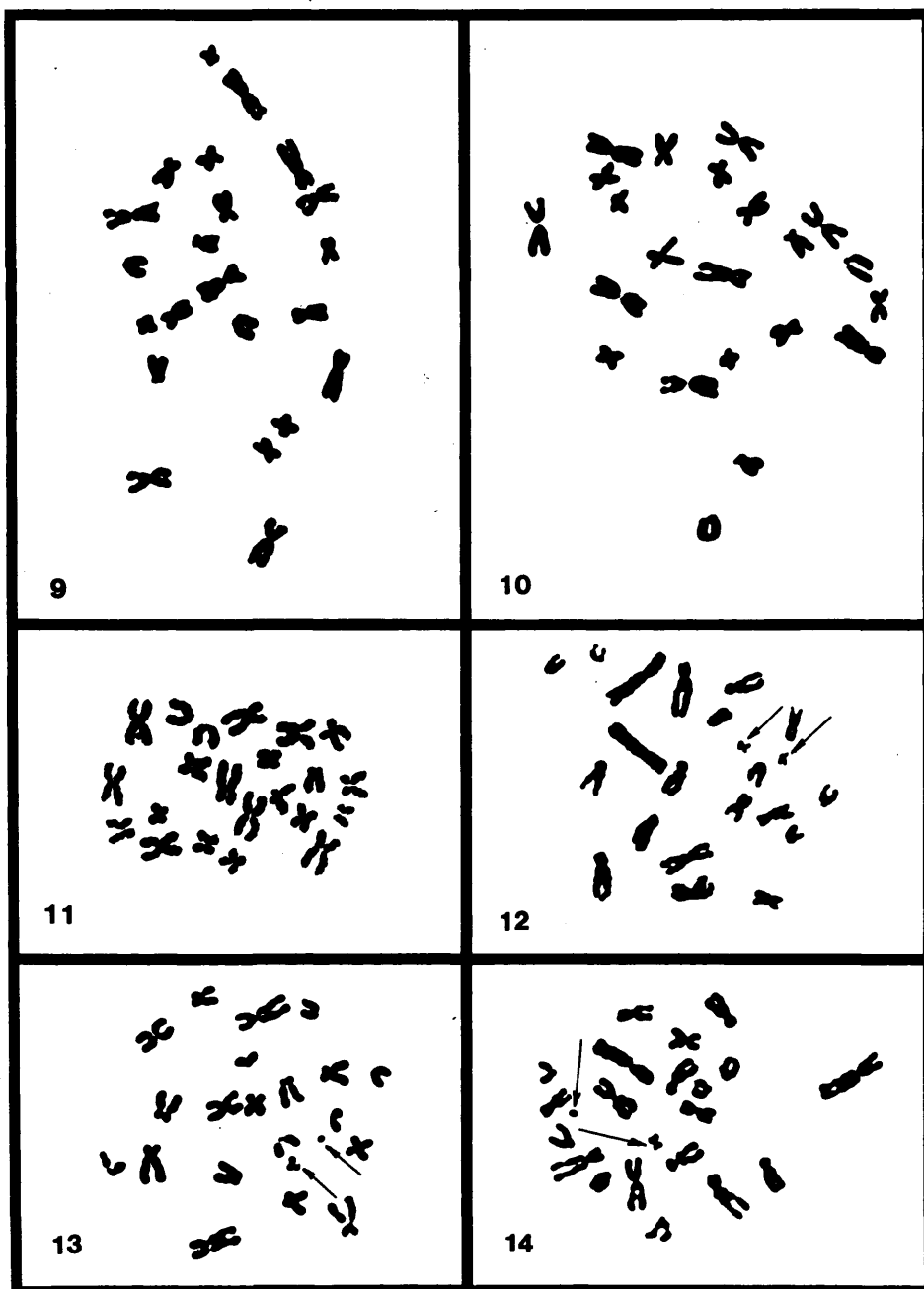
Por todo lo hasta aquí expuesto y teniendo a la vista los resultados obtenidos, podemos formular las siguientes conclusiones:

1. Los estados larvarios de Coleoptera constituyen una fuente de material de fácil recolección, de prolongado mantenimiento y de amplia disponibilidad en el laboratorio para realizar estudios cromosómicos en las distintas especies.

2. Los hemocitos obtenidos de estados larvarios resultan un material inmediato, nuevo, idóneo, abundante y fácilmente asequible para obtener los cariotipos de las diversas especies dentro del Orden Coleoptera (y probablemente también en cualquier otro Orden de Holometabola).

3. La utilización de este tipo de células somáticas permite obtener con igual facilidad los cariotipos de los machos y de las hembras obviando la dificultad hasta ahora existente de obtener en las hembras células en división.

4. El método desarrollado en el presente



Figs. 9, 10 y 11. *Chalcophora mariana* L. (Buprestidae). Metafases de hemocitos en división pertenecientes a distintas hembras en estado larvario. $2n = 22$. (X 4000); 12. *Ergates faber* L. (Cerambycidae). Hembra. $2n = 22, XX$. Metafase de un hemocito en división. Los cromosomas sexuales están indicados con una flecha. (X 4000); 13 y 14. *Ergates faber* L. (Cerambycidae). Macho. $2n = 22, XY$. Metafases de hemocitos en división. Los cromosomas sexuales X e Y (puntiforme) están indicados con una flecha. (X 4000).

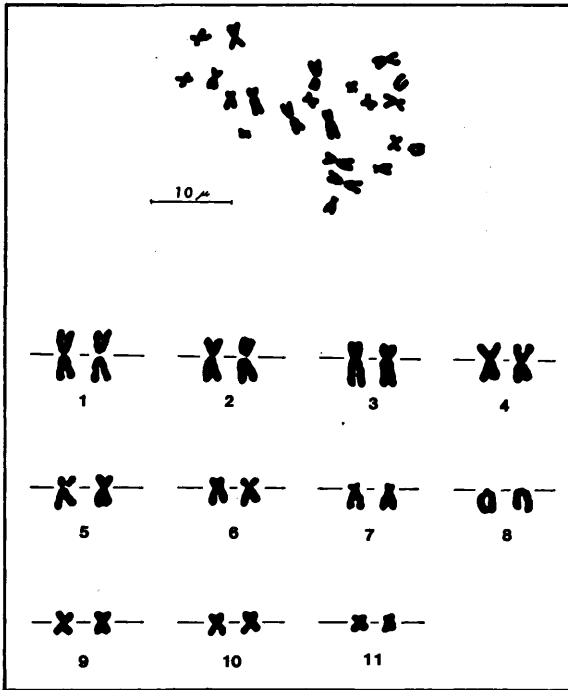


Fig. 15.—Cariotipo de *Chalcophora mariana* L. (Buprestidae). Hembra. $2n = 22$.

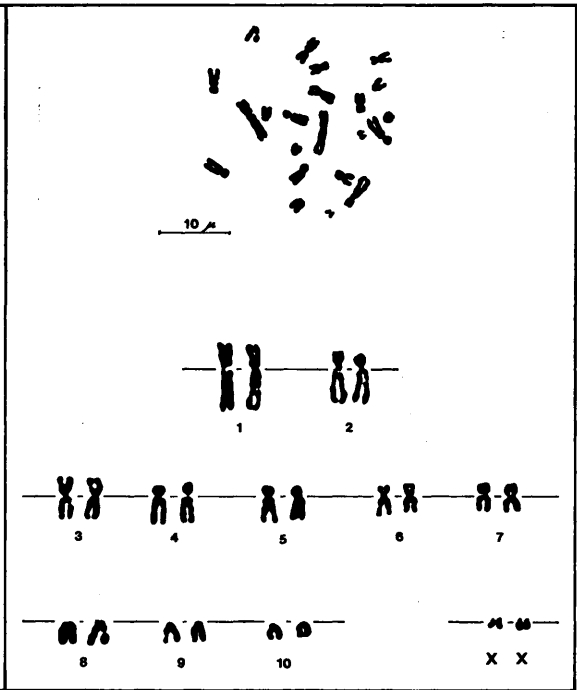


Fig. 17.—Cariotipo de *Ergates faber* L. (Cerambycidae). Hembra. $2n = 22, XX$.

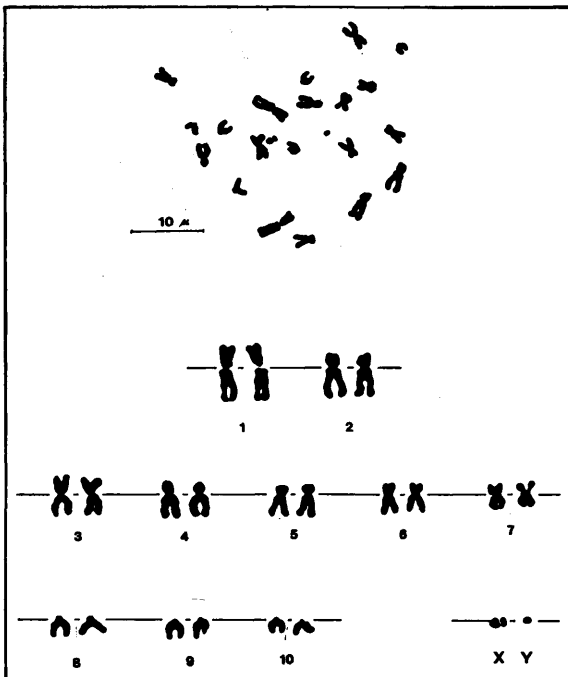


Fig. 16.—Cariotipo de *Ergates faber* L. (Cerambycidae). Macho. $2n = 22, YY$.

trabajo es sencillo, rápido y está al alcance de cualquier laboratorio no especializado.

5. La calidad de las preparaciones obtenidas permite una mejor caracterización e individualización de los cromosomas de las distintas especies, base imprescindible para posteriores estudios citotaxonómicos o filogenéticos.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi reconocido agradecimiento al Prof. D. Manuel G. de Viedma, Catedrático de Zoología y Entomología de la E.T.S. de Ingenieros de Montes que propuso, alentó y dirigió el presente trabajo y al Dr. Antonio Notario, a quien se debe el desarrollo de una dieta artificial definida que se ha utilizado en la cría en laboratorio de las larvas estudiadas.

ABSTRACT

R. BARAGAÑO, 1978.—Nuevo método para el estudio de cromosomas en Coleoptera a partir de hemocitos de estados larvarios. *Bol. Serv. Plagas*, 4: 23-33.

A simple, rapid method, accesible to a non-specialized laboratory by which well characterized mitotic chromosomes of Coleoptera can be obtained from haemocytes of larval instars is described. As an example, several metaphasic plates are presented as well as the karyotypes of females of *Chalcophora mariana* L. (Buprestidae) and *Ergates faber* L. (Cerambycidae), both previously unknown karyologically. Several metaphases and the karyotype of the male of *E. faber* L. are also illustrated.

REFERENCIAS

- AKAI, H., y SATO, S. 1971: An ultrastructural study of the hemopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Physiol.* 17: 1665-1677.
- ARNOLD, J. W. 1952: The haemocytes of the Mediterranean flour moth, *Ephesia kuehniella* Zell. (Lepidoptera: Pyralidae). *Canad. J. Zool.* 30: 352-364.
- ARNOLD, J. M. 1972: Haemocytology in insect Biosystematics: the prospect. *Can Ent.* 104: 655-659.
- ARVY, L. 1953 a: Données histologiques sur la leucopoièse chez quelques Lépidoptères. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 78: 45-49.
- ARVY, L. 1953b: Contribution à l'étude de la leucopoièse chez quelques Diptères. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 78: 158-169.
- BRAUER, A. 1928: Spermatogenesis of *Bruchus quadrimaculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *J. Morph.* 46: 217-231.
- CARNOY, J. B. 1885: La cytodièrese chez les Arthropodes. *La Cellule*, 1: 191-440.
- CROSSLEY, A.C.S. 1964: An experimental analysis of the origin and physiology of haemocytes in the blue blow-fly *Calliphora erythrocephala*. *Meig. J. Exp. Zool.* 157: 375-397.
- DASGUPTA, J. 1963: The cytology of *Cybister limbatus*, *Gymnopleurus koengii*, *Aulocophora intermedia* and *Alcides* sp. (Insecta: Coleoptera). *Proc. Zool. Soc.* 16: 123-134.
- DUTRILLAUX, B., y CHEVIN, H. 1969: Etude cytogénétique de *Timarcha goettingensis* L. et de *T. normanna* Reiche. (Col. Chrysomelidae). *Bull. Soc. Ent. Fr.* 4: 219-224.
- DUTRILLAUX, B. 1970: Etude cytogénétique de quatre espèces de Prioniens (Col. Cerambycidae). *Ann. Soc. Ent. Fr. (N.S.)*. 6(2): 443-450.
- ENNIS, T. J. 1974: Chromosome structure in *Chilocorus* (Coleoptera: Coccinellidae) I. Fluorescent and Giemsa banding patterns. *Can. J. Genet. Cytol.* 16: 651-661.
- GUENIN, H. A. 1952: Hétérochromosomes de Cicindelles. *Rev. Suisse Zool.* 59: 227-282.
- GUENIN, H. A. 1953: Les chromosomes sexuels multiples du *Blaps polychresta* Forsk. (Col. Ténébr.). *Rev. Suisse Zool.* 60: 462-466.
- HOFFMANN, J. A. 1970: Les organes hématopoiétiques de deux Insectes orthopteres: *Locusta migratoria* et *Gryllus bimaculatus*. *Z. Zellforsch.* 106: 451-472.
- HOFFMANN, H. A. 1976: Appareil circulatoire et circulation in GRASSE. *Traité de Zoologie*. VIII-4. *Masson et Cie.* 1976. pp. 2-91.
- HOY, W. E. 1914: A preliminar y account of the chromosomes in the embryos of *Anasa tristis* and *Diabrotica vittata*. *Biol. Bull.* 27: 45-51.
- HOY, W. E. 1918: A study of somatic chromosomes. II. The chromosomes in the embryos of *Epilachna borealis* and *Diabrotica vittata*. *Biol. Bull.* 35: 166-174.
- JONES, J. C. 1962: Current concepts concerning Insect haemocytes. *Amer. Zool.* 2: 209-246.
- JONES, L. C. 1970: Hemocytopenesis in Insects. In regulation of Hematopoiesis (Gordon A. S. ed.). *Appleton Century-Crofts*, New York.
- L'HELIAS, C. 1953: L'organe leucopoiétique des Tenthrèdes. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 78: 76-83.
- LUE, P. S.; GILLILAND, F. R. y WATSON, J. E. 1972: Karyology of the Boll Weevil. *Ann. Ent. Soc. Amer.* 66: 801-802.
- MIKULSKA, I. 1960: New Data of the Cytology of the Parthenogenetic Weevils of the Genus *Otiorrhynchys* Germ. (Curculionidae: Coleoptera) from Poland. *Cytologia*. 25: 323-333.
- NOTARIO, A. 1977: Desarrollo de una dieta definida para cría individual de insectos lignícolas con especial atención a Coleoptera. *Tesis Doctoral E.T.S. de Ingenieros de Montes*. Madrid.
- OCHSE, W. 1944: Experimentelle und histologische Beiträge zur inneren Metamorphose von *Sialis lutaria* L. *Rev. Suisse Zool.* 51: 1-82.
- PATTON, R. L. y FLINT, R. A. 1959: The variations in blood cell count of *Periplaneta americana* during a moult. *Ann. Ent. Soc. Amer.* 52: 240-242.
- PETRISZAK, B. 1975: Chromosome number of *Trachyploeus scabriculus* L. and *T. aristatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Acta Biologica Cracoviensis*, 18: 91-95.
- REES, R. W.; FOX, D. P. y MAHER, E. P. 1976: DNA content, Reiteration and satellites in *Dermestes*. *Curr. Chrom. Res.* 33-41.
- SCOTT, A. C. 1936: Haploidy and aberrant spermatogenesis in a coleopteran, *Micromalthus debilis* Le Cont. *J. Morph.* 59: 485-515.
- SEILER, J. 1947: Die Zytologie eines parthenogenetischen Russelkäfers *Otiorrhynchus salcatus*. *F. Chromosoma*, 3: 88-109.
- SMITH, S. G. 1943: Techniques for the Study of Insect Chromosomes. *Can. Entomol.* 75: 21-34.
- SUOMALAINEN, E. 1954: Zur Zytologie Der Parthenogenetischen Curculioniden der Schweiz. *Chromosoma*, 6: 627-655.
- STEVENS, N. M. 1905: Studies in Spermatogenesis with special reference to the «accessory chromosome». *Carnegie Inst. Wash. Publ.* 36: 1-33.
- STEVENS, N. M. 1906: Studies in Spermatogenesis. A comparative study of the heterochromosomes in certain species of Coleoptera, Hemiptera and Lepidop-

- tera with special reference to sex determination. *Carnegie Inst. Wash. Publ.* 36: 33-74.
- STEVENS, N. M. 1909: Further studies on the chromosomes of the Coleoptera. *J. Exp. Zool.* 6: 101-121.
- TAKENOUCI, Y. 1970: On the chromosomes of seven *Curculio* species. (Curculionidae: Coleoptera). *Japan J. Genet.* 45: 351-355.
- TYRKUS, M. 1971: Cricket Haematocytes: Chromosome Culture Method. *Ann. Ent. Soc. Amer.* 64: 1169-1170.
- WAHRMAN, J. 1966: A carabid beetle with only eight chromosomes. *Heredity* 2(1): 154-159.
- WEBER,, E. 1968: Die intraspezifische Variabilität des heterochromatischen Armes eines Chromosoms bei der Gattung *Carabus* L. (Coleoptera). *Chromosoma.* 23: 288-308.
- WHEELER, R. E. 1963: Studies on the total haemocyte count and haemolymph volume in *Periplaneta americana* L. with special reference to the last moulting cycle. *J. Insect Physiol.* 9: 223-236.
- WIEMAN, H. L. 1910: A study in the Germ Cells of *Leptinotarsa signaticollis*. *J. Morph.* 21: 135-216.
- WIGGLESWORTH, V. B. 1959: Insect Blood Cells. *Ann. Rev. Entomol.* 4: 1-16.
- WIGGLESWORTH, V. B. 1970: The pericardial cell of Insects: analogue of the reticuloendothelial system. *J. Ret. End. Soc.* 7: 208-216.
- YADAV, J. S. 1973: Chromosomes of seven species of Bruchidae (Coleoptera) from North India. *Genetica.* 44: 288-297.
- ZACHARY, P. y HOFFMANN, J. A. 1973: The haemocytes of *Calliphora erythrocephala* Meig. (Diptera). *Zeitsch. Zellforsch.* 141: 73-85.