

Una técnica para apreciar estados inmaduros de *Cales noacki* How. (Himenop: Aphelinidae)

A. GARRIDO, T. DEL BUSTO, J. TARANCON, M.^a MARTINEZ

Se describe una técnica de fácil ejecución en la cual se omite la disección de ejemplares, examinando éstos sobre fondo negro con luz directa, que permite efectuar conteos rápidos de larvas de *Aleurothrixus floccosus* Mask. parasitadas por *Cales noacki* How. y diferenciarlas de las no parasitadas, desde el momento que el parásito deposita el huevo en el huésped.

La técnica expuesta ha esclarecido algunos aspectos biológicos de los estados inmaduros de *Cales noacki* How. y de su evolución y desarrollo en el huésped. También con ella se pueden diferenciar el sexo de la mosca blanca de los cítricos desde su cuarto estado larvario y examinar los órganos genitales internos así como el desarrollo de los ovocitos sin recurrir a técnicas complicadas de uso tradicional.

A. GARRIDO, T. DEL BUSTO, J. TARANCON, M.^a C. MARTINEZ. Departamento de protección vegetal. Centro Regional de Levante - Crida-07. Moncada (Valencia).

INTRODUCCION

Para realizar estudios de microscopía e histología en un ente animal o vegetal es necesario recurrir a técnicas más o menos complejas que hagan visibles los órganos o partes que se desean examinar; pero dichas técnicas deben en lo posible ser fáciles de ejecutar y que al mismo tiempo den nitidez y realidad a las partes que se van a examinar, sin deformación de las mismas.

Por ello, en las preparaciones microscópicas, antes de su montaje y examen se recurre a una serie de operaciones sucesivas tales como: fijación, deshidratación, inclusión, coloración, etc., que en términos generales requieren mucho tiempo para su ejecución.

Cuando se trata de examinar un artrópodo en su conjunto, las técnicas empleadas para tal fin suelen diferir mucho de las que se utilizan en las preparaciones microscópicas y se reducen en la mayoría de los casos a sumergir al pequeño animal en los llamados líquidos fisiológicos y líquidos adicionales (M. LANGERON, 1925); entre los primeros se encuentran los líquidos de:

Ringer, Locke y J. Amar, teniendo la ventaja que los artrópodos que no mueren en ellos, y entre los segundos, que por regla general producen la muerte de los organismos que en ellos se sumergen, podemos citar el líquido de Lugol entre otros.

Los líquidos fisiológicos sirven para examinar los organismos en estado vivo y los adicionales los hacen transparentes.

Los líquidos adicionales no sólo permiten realizar el examen anatómico externo, sino que con ellos se puede efectuar el estudio anatómico interno de ciertos órganos, con la diferencia que cuando se utilizan los líquidos fisiológicos, en la mayoría de los casos hay que hacer la disección del animal que se examina, mientras que con los otros se omite esta última operación, ya que se hacen visibles por transparencia aquellas partes que se estudian.

Cuando no se colorean los especímenes en estudio a veces es difícil captar con nitidez todos los detalles morfológicos internos de los mismos, problema que se resuelve produciendo

coloraciones de fondo (M. LANGERON, 1925).

ONILLON (1973) realiza el examen de larvas parasitadas de mosca blanca por *Cales noacki* How. haciendo uso del líquido de Ringer; para ello en un vidrio de reloj o bien en un porta escavado coloca unas gotas de la solución preparada e introduce en el mismo las larvas que desea examinar, realizando en las mismas la disección sobre fondo negro en el cual se realizan las partes a estudiar.

El método preconizado por ONILLON para cuantificar el parasitismo y ver el estado evolutivo del insecto útil, da muy buen resultado; pero cuando se trata de examinar un gran número de especímenes, la operación se hace lenta al tener que realizar la disección en cada uno de los ejemplares; por ello y desde que iniciamos los trabajos de mosca blanca y sus parásitos hemos procurado encontrar una técnica fiable y de fácil ejecución, la cual se describe a continuación, haciendo resaltar las ventajas e inconvenientes de la misma.

MATERIAL Y METODOS

Binocular con platina negra en una cara.

Pincel del 0 (DA VINCI-MAESTRO Tobolsky-Kolinsky 10 Germani) para manipulación de los especímenes.

Cápsula de vidrio.

Aguja de entomología.

Xilol.

Para desarrollar la técnica se procede como sigue:

a) Se recoge el material verde atacado por mosca blanca para ser examinado.

b) Se deposita una gota de xilol sobre las larvas que se deseen examinar.

Esta manipulación es importante por lo siguiente:

Si se intenta desprender las larvas del soporte vegetal con ayuda de aguja entomológica sin

haber puesto xilol se deforman y después se desvirtúan muchas observaciones.

Sin embargo, si la operación se efectúa como se ha indicado se consiguen las siguientes ventajas:

— El xilol produce la muerte instantánea del espécimen a examinar (se trata de un líquido adicional), sea de mosca blanca o cales, y le hace al mismo tiempo rígido, rigidez que permite despegarle del soporte vegetal con ayuda de la aguja entomológica sin que se deteriore. Al mismo tiempo, si el ejemplar está cubierto por secreción cérica, ésta en xilol se disuelve parcialmente y el resto se hace invisible, pudiéndose examinar externamente antes de seguir la técnica.

Si se desea examinar todas las larvas que pueblan una hoja se abrevia la operación introduciendo todo el órgano en xilol.

c) Impregnados los especímenes con xilol se separan del soporte verde con ayuda de la aguja entomológica y posteriormente y con el pincel se introducen en una cápsula en la que previamente se ha puesto xilol, al menos una capa cuyo espesor sea de 1,5 cm para que vayan al fondo de la cápsula y queden bien cubiertos.

d) Antes de ser examinados deben de permanecer al menos durante 3 a 4 horas en la cápsula, con objeto de que se clarifiquen y el tegumento externo se haga transparente; este tiempo suele ser variable según la temperatura ambiente, alargándose cuando es inferior a 2° C y acortándose a 2 horas de duración cuando es superior a los 25° C. No conviene sobrepasar en mucho el intervalo de tiempo indicado por hacerse los especímenes muy traslúcidos y perderse detalles incluso en órganos de los mismos que se desean examinar.

Durante el tiempo que permanecen los especímenes expuestos al xilol conviene cubrir las cápsulas con un vidrio de reloj para evitar que caigan materias extrañas y pérdidas excesivas de xilol por evaporación del mismo.

e) Pasado el tiempo de exposición en xilol se procede a la observación, para ello:

— Se coloca la platina por su cara de color negro o en su defecto se coloca un fondo negro de papel; sobre el fondo negro se pone la cápsula con los especímenes a examinar y se iluminan los mismos con una intensidad adecuada, haciendo incidir los rayos luminosos directamente sobre los especímenes a través del xilol.

— Por último se realiza la observación u observaciones necesarias, con los aumentos elegidos en ocular y objetivo.

Con binoculares Wild M-5 se hacen buenos exámenes utilizando oculares de 10 y objetivos de 12 ó 25 aumentos.

RESULTADOS

Los resultados de la técnica descrita los exponemos con fotos por ser más explicativas que cualquier texto sobre el particular, por ello hacemos en este apartado un comentario de las mismas.

Desde la foto número 1 a la 7 se da una idea clara y concisa del parasitismo ocasionado en mosca blanca por *Cales noacki* How.

Foto 1.—La mancha negra corresponde al huevo de *Cales noacki* How. que recién puesto aparece siempre entre el tórax y el abdomen de la mosca blanca. No obstante, si existe superparasitismo el primer huevo es colocado siempre en la zona indicada y los otros, en caso de ser varios, en cualquier parte del huésped, siendo de todos ellos viable solamente el que primero fue puesto por el parásito.

Foto 2.—Se trata de una larva de *Cales noacki* How, próxima a realizar la ninfosis; en ella la mosca blanca ha quedado destruida y la larva del parásito ocupa totalmente la cavidad que llenaba la larva de mosca blanca. La mancha negra corresponde al corión del huevo del parásito y permanece en el mismo lugar en que el huevo fue depositado; pero cuando comienza la ninfosis de la larva de *Cales noacki* How. el



Fig. 1.—Larva de segundo estado de *Aleurothrix floccosus* Mask., parasitada por *Cales noacki* How. La mancha negra es el huevo del parásito, el cual ha comenzado a desarrollarse y la larva de mosca blanca se ha deformado.



Fig. 3.—Ninfa de *Cales noacki* How., obsérvese que, al estar en un estado muy avanzado de desarrollo, el corión del huevo del parásito se encuentra en la región vasiforme del despojo de mosca blanca.



Fig. 6.—Ninfa de *Cales noacki* How. a la izquierda y de *Aleurothrix floccosus* Mask. a la derecha, nótese las diferencias entre ambas.



Fig. 2.—Larva de cuarto estado de mosca blanca parasitada. La mancha negra representa el corión del huevo del parásito que queda en ese sitio hasta el momento en que empieza la ninfosis del parásito.



Fig. 4.—Posición que ocupa el corión del huevo de *Cales noacki* How., cuando la ninfa ha llegado al fin de su estado evolutivo y está próxima la emergencia del adulto.

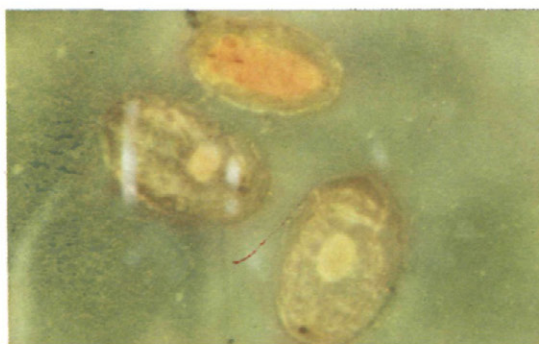


Fig. 5.—Larvas parasitadas de mosca blanca, en diferentes fases evolutivas del parásito, obsérvese que los coriones de los huevos de *Cales noacki* How. ocupan diferentes posiciones en cada una de ellas, según el estado de desarrollo del parásito.

corión se traslada a la zona vasiforme de lo que fuera mosca blanca, como veremos en las siguientes fotos.

Fotos 3 y 4.—Ninfas de *Cales noacki* How. a punto de emerger; se observa en ambas la posición que ocupó el corión del huevo del parásito. Como se ve en la foto 4 el corión del huevo se dispone al fin de su desplazamiento en la región vasiforme y situado con respecto a la ninfa de *Cales noacki* How. en la parte dorso-abdominal de ésta, próximo a los últimos anillos abdominales.

Foto 5.—Nos muestra diferentes fases evolutivas de *Cales noacki* How. a partir del momento en que la larva del parásito ha alcanzado su máximo desarrollo hasta el estado ninfal del mismo. La larva de la parte inferior está a punto de realizar la ninfosis y el corión del huevo se encuentra en la posición donde fue depositado: la intermedia es una larva de *Cales noacki* How. que ha iniciado la metamorfosis y el corión ha comenzado su desplazamiento hacia la región vasiforme. El ejemplar de la parte superior nos muestra una ninfa de *Cales* en que sus ojos han adquirido la tonalidad rojo cereza y ya en este estado de desarrollo el corión del huevo se encuentra en la región vasiforme. Vemos, pues, que la posición que ocupa el corión del huevo del parásito respecto a él mismo o al despojo de lo que fue la epidermis de la mosca blanca, nos da una idea clara del estado evolutivo en que se encuentra la ninfa del parásito.

Foto 6.—A la izquierda ninfa de cales y a la derecha ninfa de mosca blanca. Nótese las diferencias entre ambas.

Foto 7.—Larva de cuarto estado de mosca blanca en la que se aprecian los ojos simples de la misma y la región vasiforme; como se deduce al comparar esta foto con las anteriores la técnica descrita permite sin lugar a equívocos diferenciar los estados inmaduros de mosca blanca que se encuentran parasitados de aquellos que no lo están.



Fig. 7.—Larva de mosca blanca sin parasitar de cuarto estado. En ella se ven los ojos puntuales y la región vasiforme y ausencia total de alguna mancha que indujese a error, con las larvas parasitadas.



Fig. 8.—Ninfa de mosca blanca macho en la que se aprecian las partes de los órganos genitales internos y su disposición.

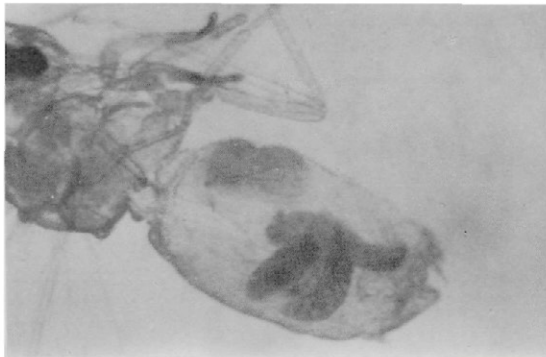


Fig. 9.—Ninfa de mosca blanca macho a punto de emerger el adulto. Se aprecia en la misma la disposición de las diferentes partes que constituyen los órganos genitales internos, desde la parte superior a la inferior: testículos, canales deferentes, vesículas seminales (dilataciones de los canales deferentes) y glándulas accesorias.

La técnica descrita no sólo permite realizar las observaciones anteriormente comentadas según las fotos expuestas, sino que nos permite diferenciar el sexo de la mosca blanca antes de su emergencia, incluso a partir del cuarto estado larvario de la misma ya que hace posible el examen de los órganos sexuales internos como veremos a continuación.

Fotos 8 y 9.—Representan dos hembras adultas de mosca blanca. La foto 8 nos da una idea de cómo se disponen los ovarios, que son como dos pequeñas mórulas casi juntas una a la otra. Estos ovarios contienen un gran número de ovariolos cada uno que forman como una masa compacta alrededor de un punto común y por ello cada ovario adquiere el aspecto de una mórula; los ovariolos no desarrollan los óvulos de una forma ordenada y, por ello, como se observa en la foto 9, los óvulos maduros (huevos de moscas blancas) se disponen de forma irregular alrededor de los ovarios.

La figura 1a representa el aparato genital del macho de mosca blanca, reconstruido a partir de las observaciones realizadas por esta técnica.

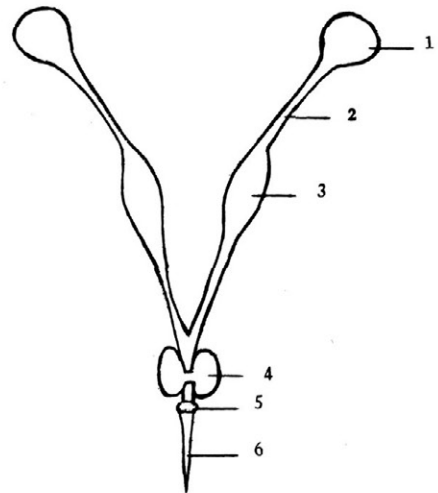


Fig. 1a.—Aparato genital macho de *Aleurothrix floccosus* Mask. 1. Testículos; 2. Canal deferentes; 3. Vesícula seminal; 4. Glándula accesoria; 5. Ampolla espermática; 6. Canal eyaculador (según los autores).

CONCLUSIONES

Después del comentario efectuado en el apartado anterior y del examen de las fotos expuestas se puede llegar a las siguientes conclusiones:

— La técnica preconizada en el presente artículo es de fácil ejecución, permitiendo diferenciar un gran número de ejemplares inmaduros de *Cales noacki* How. y de *Aleurothrixus floccosus* Mask. en un tiempo relativamente corto, lo cual abrevia los conteos masivos que es necesario efectuar en los estudios de parasitismo.

— Ha permitido seguir la evolución del parásito, desde la puesta del huevo hasta la emergencia del adulto, sin necesidad de realizar la disección de los ejemplares examinados.

— Se ha puesto de manifiesto la estrecha relación que guarda el desplazamiento del corión del huevo desde el lugar que lo colocó el parásito hasta la región vasiforme de la mosca blanca y el estado de desarrollo ninfal de *Cales noacki* How. desde el momento en que la larva de este último inicia la ninfosis.

— Ha permitido demostrar, por el enorme

número de larvas parasitadas de mosca blanca examinadas, que en el caso de que exista superparasitismo, solamente un huevo llega a feliz término, ya que en todos los casos examinados solamente se ha podido ver un corión de huevo de *Cales*. Ello hace pensar que los otros huevos puestos son consumidos por la larva de *Cales* que se desarrolla normalmente.

— Solamente llega a feliz término el primer huevo puesto por ocupar el lugar más privilegiado en la larva de mosca blanca.

— La técnica permite diferenciar el sexo de mosca blanca a partir de su cuarto estado larvario y examinar con precisión los órganos genitales internos de adultos de ambos sexos; así como el desarrollo de los ovocitos en las hembras.

— El hallazgo de esta técnica ha contribuido a poder establecer con precisión la evolución y desarrollo de los estados inmaduros de *Cales noacki* How. así como algunos datos biológicos del mismo y estudiar las partes de que consta el aparato genital masculino de *Aleurothrixus floccosus* Mask.

ABSTRACT

A. GARRIDO, T. DEL BUSTO, J. TARANCON, M.^a MARTINEZ, 1978.—Una técnica para apreciar ensayos inmaduros de *Cales noacki* Hoaw. (*Himenop: Aphelinidae*). *Bol. Serv. Plagas*, 4: 35-41.

A technique of easy accomplishment is reported. By this technique, dissection of specimens is not necessary, and these are examined by being placed on a black background under direct light, allowing rapid countings of larvae of *Aleurothixus floccosus* Mask. parasited by *Cales noacki* How., and also to differentiate them from those non parasited, since the moment the parasite lays the egg on the host. The described technique has cleared up some biological aspects of immature stages of *Cales noacki* How. and its evolution and subsequent development on the host. The technique is also suitable for sex differentiation of the citrus white fly from its fourth larval stage, and for internal genitals examination, as well as the development of oocytes, avoiding the need of using other sophisticated, traditional techniques.

REFERENCIAS

- BONNEMAISON, L.: Enemigos animales de las plantas cultivadas y forestales 1^o Traducción española de Francisco Guerrero, 1964. Ediciones de Occidente, S.A., (España), 589 pp.
- C.F.A. PANTIN, Sc. D., F.R.S.: Técnicas microscópicas para zoólogos. Traducción del Dr. M. Cordero del Campillo. Editorial Academia (España), 1968, 99 pp.
- DE BACH, PAUL: Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas, 1.^a edición en español, 1968.
- Compañía Editorial Continental, S.A. (Méjico-España-Argentina), 929 pp.
- LANGERON, M.: Précis de Microscopie, Masson et Cie, Editeurs. París, 1925, 1007 pp.
- MARTOJA, R., y MARTOJA-PIERSO, M.: Initiation aux Techniques de l'Histologie Animale, Masson et Cie, Editeurs, 1967, 331 pp.
- ONILLON, J. C.: Comunicación personal. 1973.