

TÉCNICAS DE PREPARACIÓN MICROSCÓPICA, TINCIÓN E INCLUSIÓN PARA DERMATOPSIAS EN LOS LEPIDÓPTEROS. (INSECTA: LEPIDOPTERA)

Rafael Magro

C/Argales nº 11, 1º C, 47013.Valladolid. rmagro@teleline.es.

Resumen: En este trabajo se analizan diferentes técnicas para la preparación, fijación, tinción e inclusión microscópica de dermatopsias en los lepidópteros, con especial atención al exoesqueleto larval, las cápsulas cefálicas y escleritos abdominales de adultos.

Palabras clave: Dermatopsia, quetotaxia, tinción, inclusión, Lepidoptera.

Techniques for preparing, staining and mounting lepidopteran microscope dermatopsies (Insecta: Lepidoptera)

Abstract: Techniques for preparing, fixing, staining and mounting microscope dermatopsies in lepidopterans are analysed, with special attention paid to the larval exoskeleton, cephalic capsules and the adults' abdominal sclerites.

Key words: Dermatomy, chetotaxy, staining, mounting, Lepidoptera.

Introducción

Es muy común encontrar en la bibliografía el uso, que creemos ambiguo, del término quetotaxia para referirse a las preparaciones de piel. Siendo estrictos, la etimología de la palabra indica 'disposición del pelo'. Es decir, el estudio de la ubicación de las cerdas que hay en el exoesqueleto. Es frecuente leer frases como 'quetotaxia de la pata' para referirse al estudio completo de la pata, 'quetotaxia de la cabeza', para el examen de las cápsulas cefálicas, 'quetotaxia del tórax', etc. Proponemos el término genérico dermatopsia, es decir, 'visión de la piel', para estudios completos de la piel. El término quetotaxia debería utilizarse, exclusivamente, cuando el análisis se refiera únicamente a la disposición de los pelos.

En el presente artículo se presentan y analizan diferentes técnicas para la preparación, fijación, tinción e inclusión microscópica de dermatopsias en los lepidópteros, con especial atención al exoesqueleto larval, las cápsulas cefálicas y escleritos abdominales de adultos.

Con respecto a los antecedentes bibliográficos pueden consultarse BECK, 1960 y 1989; HINTON, 1946. Para técnicas microscópicas en general pueden consultarse FERNÁNDEZ-RUBIO, 1982; MARTÍNEZ, 2002; GABE, 1968; MARTOJA & MARTOJA, 1967, PEARSE, 1968; VIVES-MORENO, 1988; BERNIS-MATEU, 1973. Las conclusiones que se han obtenido en este trabajo se basan en la realización de 1282 preparaciones.

Material y métodos

Aquellos lectores que no estén familiarizados con los tratamientos más usuales en la preparación de genitales y en los de estructuras microscópicas de lepidópteros en general, han de saber que las cantidades de líquidos con que se hacen los tratamientos, mientras no se indique lo contrario, deberán acomodarse a los tamaños de los cuerpos que se van a tratar. Como norma general, los líquidos usados deberán cubrir ampliamente las estructuras. Igualmente, si no se dan indicaciones concretas, es preciso decir que la temperatura que se toma como referencia para los diferentes procesos es de 18°C. Con respecto al tiempo, si no se indica explícitamente, sucede lo mismo que con las cantidades. Como es obvio, no es igual tratar las partes de un macroheterócero que las de un

microlepidóptero. Debido a las grandes diferencias, en lo que respecta a las medidas de las estructuras entre las distintas especies, resulta imposible indicar específicamente estas cantidades y se ha de confiar para ello en la experiencia de cada operador.

No detallaremos aquí nada más que los utensilios más específicos y/o poco usuales, entendiendo que son necesarios los más comunes, como por ejemplo: tubos de Pyrex, gradilla, cristalizador, agujas enmangadas, asa de platino, sondas, jeringuillas, baño María con termostato, termómetro, pinzas, pocillos de cerámica, bisturíes, microtijeras, frasco lavador, probetas, balanza, microscopio estereoscópico, etc.

1. Preparación de la piel del cuerpo larval

Disección y maceración:

Antes de comenzar la preparación del exoesqueleto larval es recomendable dejar a las orugas en ayuno durante al menos dos o tres días. De esta manera, se evita que el contenido intestinal tiña o manche la piel de las orugas. La muerte se provoca con cualquier método conocido (véase SCHAUFF, 1986: 24-26), con vapores tóxicos, por inmersión en agua a 1º C, o por calentamiento a 80º C. Hay que tener en cuenta que el acetato de etilo y el cianuro, pueden alterar su coloración. Si la larva no es muy grande también se puede utilizar 1,1,2,2- tetracloroetano (léase FERNÁNDEZ-RUBIO, 1985: 102). Posteriormente, si la oruga es grande, se realiza la ablación de la cabeza con unas microtijeras y se da un corte longitudinal en la zona ventral, desde la cabeza hasta el anus (para anatomía larval véase EATON, 1987: 193-197, SNODGRASS, 1997: fig.196, HASENFUSS, 1963, HINTON, 1946 y STEINMANN & ZOMBORI, 1984). Hay que procurar no cortar el recto y el saco rectal, que luego resultará muy útil para posteriores manipulaciones (lám 1, fig. 13). Esta incisión debe ser realizada perfectamente centrada, entre las patas torácicas y las abdominales (fig.1 c). Los siguientes pasos son: maceración, limpieza, fijación, tinción, aclarado, deshidratación y montaje (fig.2). Para la maceración introducir la cabeza y el cuerpo abierto en un tubo que contenga una solución de hidróxido potásico al 15%, si la oruga es grande. Cuanto menor sea su tamaño y más fina la piel, menor debe ser la concentración de hidróxido potásico, pudiéndose llegar

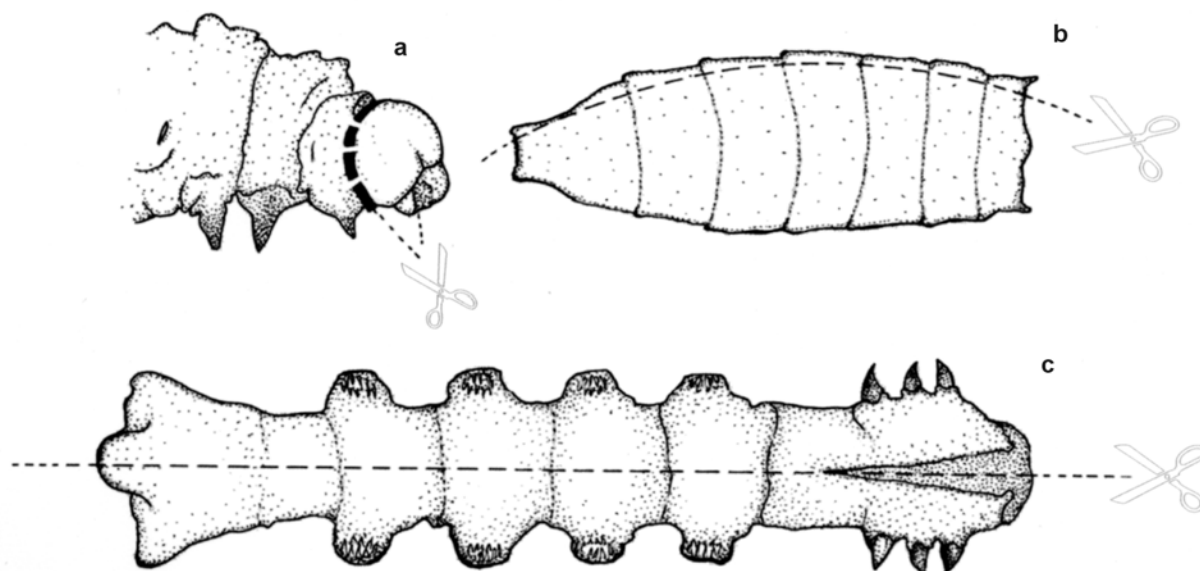


Fig. 1. Línea de corte de la cabeza (arriba, izda.), escleritos (arriba, dcha.) y cuerpo larval (abajo).

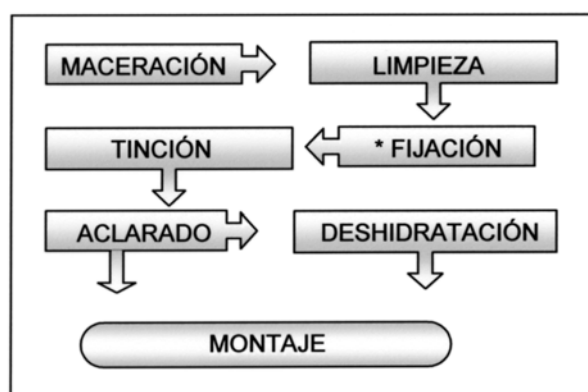


Fig 2. Diagrama de procesos (*: pasos opcionales).

a utilizar concentraciones del 5%. Calentar al baño María, como máximo 5 minutos, a 80° C. Finalizado el tiempo hay que proceder a una variante de la técnica de agitación descrita por MAGRO & DE LA TORRE (2002: 184). Se trata de agitar el tubo enérgicamente unas 20 veces y quitar la espuma que se forme con unas gotas de alcohol isopropílico. Una vez concluido este proceso, se introduce la larva en agua desionizada, agitando nuevamente unas 10 veces y se repite la operación como se ha descrito, finalmente se agita 5 veces más (véase fig. 4). Para terminar, aclarar con abundante agua. Después de estas operaciones el exoesqueleto y su cápsula cefálica deberían estar perfectamente limpias, si no fuese así habría que realizar una última limpieza manual con la siguiente solución de limpieza:

SOLUCIÓN DE LIMPIEZA A

Agua desionizada 65 ml
Ácido acético 35 ml

Una vez concluida la limpieza manual aclarar concienzudamente con agua, si no se realiza de esta manera, es posible que las soluciones que empleemos para teñir no se fijen adecuadamente. Si las preparaciones que se desean realizar son de partes con piel fuertemente quitinizada y pigmentada pueden macerarse en la siguiente solución oxidante:

SOLUCIÓN DE MACERACIÓN A

Agua desionizada 80 ml
Permanganato potásico 10 gr
Alumbre de roca.....10 gr

El permanganato teñirá los tejidos de un fuerte color morado que cambiará de tonalidad al marrón oscuro en contacto con el aire, estabilizándose a los pocos días. Esta tonalidad aclara con el tiempo y ha de lavarse concienzudamente con esta fórmula:

SOLUCIÓN DECOLORANTE A

Agua desionizada 100 ml
Ácido oxálico 10 gr

Se decolora mejor con el ácido oxálico pero es muy tóxico y se puede sustituir por sulfito sódico o bisulfito sódico al 10% en agua. Aclarar abundantemente. Después se bañan a 80°C durante el tiempo necesario, en la siguiente solución:

SOLUCIÓN DE MACERACIÓN B

Agua desionizada 100 ml
Hidróxido potásico 30 gr

Una vez que se considere que las partes están suficientemente claras se lavan bien con agua o con ácido cítrico al 30% en agua, finalizando el proceso con un nuevo aclarado. Si las orugas son muy pequeñas (inferiores a unos 3 mm), es muy difícil hacer el corte longitudinal y la ablación de la cabeza, por lo que se montarán enteras. Se calentarán en hidróxido potásico al 5% a 80 °C durante 2 minutos, o bien durante una hora o más en frío. Después se presionará con un pincel, por debajo de la cabeza, con cuidado de no deteriorar la cápsula cefálica, hasta que el contenido corporal salga por el anus. Se volverán a introducir en hidróxido potásico, se agitarán de manera no muy agresiva y se aclararán con agua.

Técnicas de fijación:

Se puede entender por técnicas de fijación dos conceptos: 1° la conservación de los tejidos, células y estructuras en el estado más aproximado posible a la materia viva; 2° la fijación de los colorantes con otras sustancias, para que sean estables, longevos, que penetren y tengan un poder cromógeno adecuado para el uso que se persigue. Al empleo de estas sustancias se le llama comúnmente, utilización de mordiente, aunque la palabra 'mordiente' tiene

otra acepción radicalmente distinta, generando cierta confusión. Mordiente, también es el punto en que algunas sustancias, muy cercanas al secado, están ligeramente pringosas al tacto, pero no manchan, por ejemplo en la técnica del Mixtión. Algunos autores para evitar la ambivalencia del término emplean la palabra curtiembre, que es la que nosotros usaremos. Las larvas muy pequeñas deben de fijarse con solución Ringer (LANGERON, 1969) y/o AFATD (MARTÍNEZ, 2002:187). La fijación de los colores puede realizarse preparando previamente las partes a teñir, para que el reactivo penetre profundamente, o bien después de la tinción para consolidar los colores. Esto depende de que proceso de tinción se trate, aunque en la mayoría de los casos no es necesario. Para la fijación de los colores, en general, empleamos la siguiente fórmula curtiembre:

SOLUCIÓN CURTIENTE A	
Agua desionizada	100 ml
Alumbre de roca	10 gr

Técnicas de Tinción:

Los colorantes que se han de utilizar dependen del grado de pigmentación y de pilosidad del exoesqueleto larval, del grado de contraste que se necesite y del medio de montaje que se vaya a usar. Para larvas con exoesqueleto poco quitinizado se puede utilizar la siguiente técnica de doble tinción. Se introduce la piel durante 4 minutos en la siguiente solución colorante:

SOLUCIÓN COLORANTE A	
Etanol	100 ml
Fucsina básica	5 gr

En vez fucsina se puede emplear picrocarmin (BERNIS-MATEU, 1973:52) o hematoxilina de Heidenhaim (léase MARTÍNEZ, 2002:191). Seguidamente durante 6 minutos en la solución:

SOLUCIÓN COLORANTE B	
Agua desionizada	100 ml
Azul de metileno	5 gr

Se puede sustituir el azul de metileno por azul de toluidina. Aclarar con agua (lám. 1, fig. 5) También da muy buenos resultados introducir los tejidos durante 5 minutos a 80°C en la siguiente solución:

SOLUCIÓN COLORANTE C	
Agua desionizada	80 ml
Índigo	10 ml
Bisulfito de sosa	5 gr

Ésta se realizará de la siguiente manera: mezclar el índigo con unas gotas de etanol en un almirez y con la mano de cerámica, hacer una pasta. Luego añadir el agua con el bisulfito de sosa y calentarlo a un máximo de 80°C con los exoesqueletos dentro, en un frasco tapado. Este tinte actúa por reducción-oxidación, las preparaciones salen color azul muy tenue y en contacto con el oxígeno del aire van oscureciendo en breves segundos. Se puede repetir la operación tantas veces como se crea necesario, pero hay que mantener el líquido en el recipiente, convenientemente cerrado, destapar para meter las preparaciones y tapar lo más rápidamente que sea posible. Fijar con la solución curtiembre A y lavar con agua. El sistema es lento, pero se pueden controlar las tonalidades de manera muy precisa. La solución no se conserva. Si se ha producido una severa sobrecoloración (tanto en la primera técnica, como con el índigo) se puede usar la solución propuesta por VIVES-MORENO, (1988:43), que es la siguiente:

SOLUCIÓN DECOLORANTE B	
Agua desionizada	50 ml
Etanol	25 ml
Ácido acético	25 ml

Si es una sobrecoloración no muy severa basta rebajar la solución en agua, no obstante la preparación debería de tener unas tonalida-

des bastante fuertes dado que en la posterior deshidratación perderá un poco de brillo, contraste y tonalidad. Seguidamente aclarar con abundante agua. Si la preparación no está lo suficientemente limpia se puede utilizar el mismo líquido para finalizar. Con esta técnica se conseguirá que las partes más quitinosas se tiñan de tonalidades cercanas al añil y el resto del tejido con tonos magenta. Para tejidos larvales muy quitinizados proponemos la siguiente técnica de doble tinción. Se introduce la piel durante 4 minutos en la siguiente solución colorante:

SOLUCIÓN COLORANTE D	
Agua desionizada	100 ml
Verde HE	10 gr
Azul de metileno	10 gr
Fenol	2 gr

El verde y el azul se pueden reemplazar con verde luz y azul de toluidina, empleando la mitad de la proporción, es decir, 5 gr. Seguidamente se pasa, agitando lentamente, durante 1 minuto, a una solución de mercurcescina sódica, proporción 1:1000. Este reactivo se puede sustituir por mercromina comercial, pero ésta da una coloración más clara y con una fluorescencia amarillo-verdosa mucho más acentuada que, en algunos casos, pudiera resultar molesta. La mercromina comercial, dependiendo de las marcas, puede tener diferentes concentraciones. Los aditivos y excipientes pueden ser variados y la combinación con éstos pueden provocar que las preparaciones se oscurezcan con el tiempo. Se aclara con agua desionizada. La coloración debe ser bastante acentuada dado que en los pasos de deshidratación, como ya se comentó anteriormente, la preparación perderá parte de su tonalidad aclarándose. No obstante si se ha producido una sobrecoloración se puede rebajar con la siguiente solución decolorante:

SOLUCIÓN DECOLORANTE C	
Agua desionizada	20 ml
Etanol	78 ml
Ácido acético	2 ml

Seguidamente aclarar con abundante agua. Si la preparación no está lo suficientemente limpia se puede utilizar el mismo líquido para terminar. Con esta técnica se conseguirá que las partes más quitinosas se tiñan de color verde azulado y el resto del tejido con una variable gama de magentas (lám. 1, fig. 6). Es necesario resaltar, que estos métodos de tinción sólo se pueden aplicar si el medio de montaje que se va a utilizar requiere la deshidratación previa de los tejidos. Si las estructuras se incluyen en otros medios, como por ejemplo, aquellos en que las preparaciones se pueden montar directamente con alcohol, los hidrosolubles o los que poseen en su fórmula hidrato de cloral, las preparaciones se pueden desteñir (véase el apartado medios de inclusión). Para montar los exoesqueletos, por ejemplo, en Euparal, (que se diluye en alcohol), se introducen los tegumentos durante 2 minutos en orceína acética B. Al término se aclaran con agua y se bañan las partes con la solución colorante B durante 4 minutos. Aclarar con agua y meter en la solución de orceína. Fijar con alcohol isopropílico. Para decolorar se puede usar la solución decolorante A (lám. 1, fig. 7). Si el medio de inclusión es hidrosoluble, por ejemplo, DMHF o se desean almacenar las preparaciones en frascos con glicerina o soluciones de la misma, se usará el siguiente líquido durante 1 minuto:

SOLUCIÓN COLORANTE E	
Agua desionizada	100 ml
Negro de clorazol	0,1 gr

Se aclaran y se limpian los tejidos de los residuos del negro (consúltese CARAYON, 1969) y se vuelven a teñir durante 2 minutos con la solución colorante A. Se lavan con abundante agua y se vuelven a introducir 30 segundos, si es necesario, en la solución colorante E. El negro de clorazol es difícil de decolorar. Si las preparaciones se sobrecolorean, se puede utilizar la solución de limpieza A. Si no se consigue la tonalidad deseada se puede

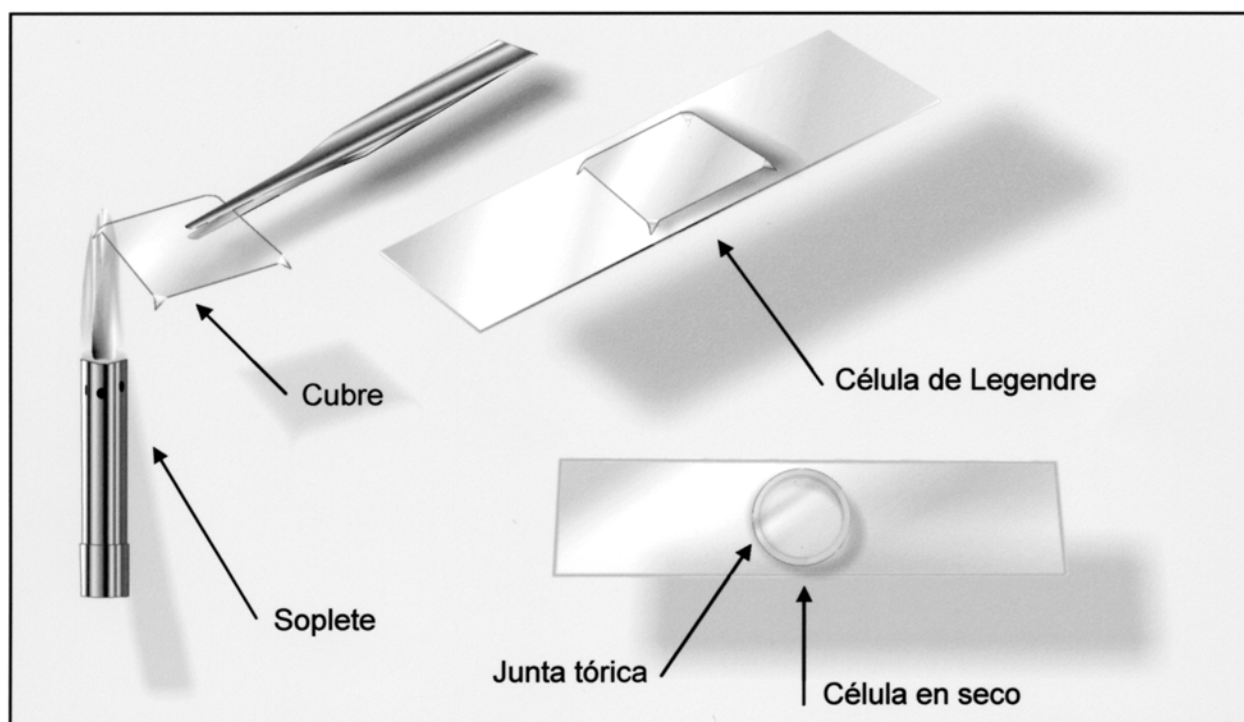


Fig. 3. Fabricación de la célula de Legendre y célula para preparaciones en seco.

utilizar la siguiente solución durante más de 24 horas:

SOLUCIÓN DECOLORANTE D	
Agua desionizada	100 ml
Hidrato de cloral	10gr

Se efectúa un profundo lavado y se dejan secar las preparaciones completamente, a temperatura ambiente. Para montarlas hay que volver a hidratarlas. De esta manera las preparaciones no se destiñen en el DMHF ni en la glicerina. Las partes quitinosas adquieren una tonalidad gris oscura y el resto del tejido rosas y azules grisáceos (véase lámina 1, figs. 8 y 10).

Medios y métodos de inclusión:

Como ya se ha comentado hay de varias clases, unos necesitan que los exoesqueletos estén deshidratados, otros son hidrosolubles y algunos admiten tegumentos deshidratados con alcohol isopropílico. Todos tienen ventajas e inconvenientes (véase anexo comparativo VI). Para montar entre porta y cubre algunas larvas de gran tamaño, es necesario emplear cubreobjetos de gran formato, por ejemplo, de 24 x 32 mm o mayores. Si las mismas superan el largo del porta, hay portas de gran formato en el comercio, pero su uso conlleva la adquisición de cajas especiales. Una manera de montarlas es seccionar la piel de larvas transversalmente por la mitad (lám 1, fig. 8). Si los tejidos son de gran grosor el cubre debe de separarse lo suficiente del porta como para no aplastar las preparaciones, en este caso se pueden usar trocitos de cristal con el suficiente grosor como para separarlos (Yela, com. pers.). También se pueden utilizar esquinas de hilo de plata o de latón, arandelas de P.V.C., etc. El método que consideramos, con diferencia, el más adecuado es el montaje en célula de Legendre. Se trata de doblar los ángulos con un micro-soplete tipo 'Pencil Torch' plegando lo necesario como para conseguir el grosor deseado. Consideramos que este es el sistema más sencillo, limpio, elegante y deseable, aunque menos utilizado (fig. 3). El sistema de almacenamiento en tubos con glicerina, no es muy útil para piel de las larvas, puesto que su manipulación resulta, en muchos casos un engorro y es fácil deteriorarlas. Con respecto a las sustancias de inclusión que contienen hidrato de cloral, ácido acético o

glicerina, están prácticamente en desuso, como por ej. el líquido de Hoyer, Faure, o el Berlèse, encontrándose multitud de medios más eficaces y modernos.

II. Preparación de cápsulas cefálicas larvales

Disección y maceración:

Se cortarán las cabezas, con unas pequeñas tijeras, lo más cercano al nacimiento, (fig. 1 a). Las cápsulas cefálicas larvales se maceran de la misma manera descrita para la piel del cuerpo de las larvas.

Fijación:

No se suele necesitar fijación de ningún tipo, excepto que se deseen emplear colorantes que requieran curtiente.

Tinción:

Las cápsulas cefálicas larvales se suelen almacenar en frascos de cristal en una solución a base de glicerina (véase MAGRO & DE LA TORRE, 2002: 187). Por lo tanto, se deben teñir empleando la solución colorante E y la decolorante D si es necesario. Conviene teñirlas muy sutilmente puesto que su estructura es, por lo general, bastante quitinizada y posee estructuras que si se sobrecoloran no se observarían con facilidad, como por ej. la hipofaringe. Si estas cápsulas son de tamaño muy pequeño, se pueden montar entre porta y cubre. La técnica de tinción que consideramos más adecuada para medios de inclusión que requieren la deshidratación de los tegumentos, consiste en usar la solución colorante D y después mercurcescina sódica, como se describió en el anterior apartado. Aunque no hay inconveniente en aplicar cualquiera de las otras. Otro sistema es pegarlas, en seco, en etiquetas, pero las cápsulas se suelen deformar.

III. Preparación de escleritos abdominales de adultos

Disección y maceración:

Una vez separado el abdomen completo, si el ejemplar es grande y/o pertenece a un macho, se debe introducir en un tubo durante 10 minutos, que contenga una solución de hidróxido potásico al

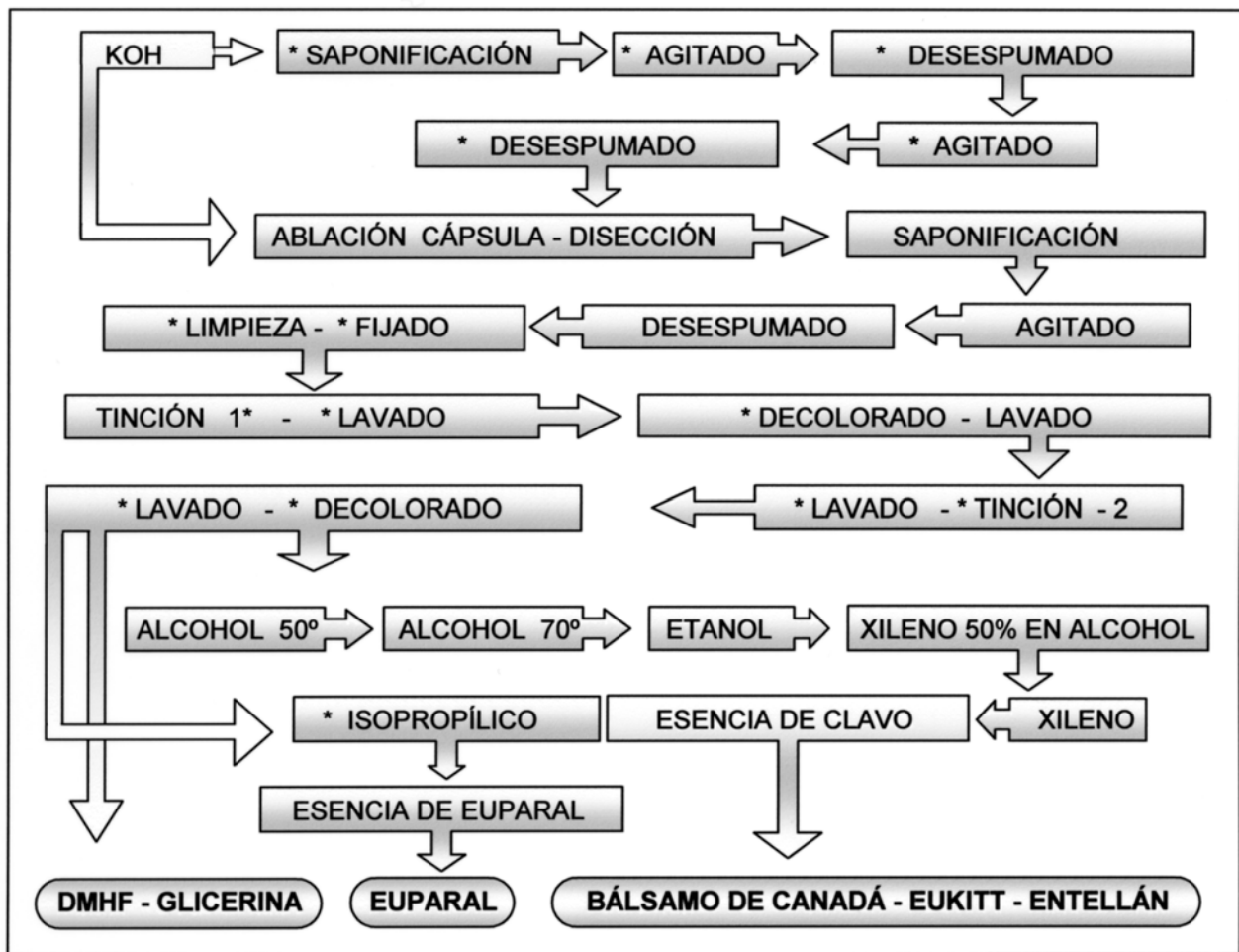


Fig. 4. Diagrama de procesos (*: pasos opcionales).

5%, y calentar a 80° C. Si es pequeño o es hembra, en una solución al 2%. Posteriormente se procede a la ablación de la armadura genital, ya sea andropigio o ginopigio, si es posible, con todos los órganos que se puedan conservar (espermateca, tubos de Maplhihi, etc.) que seguramente serán muy útiles para posteriores estudios morfológicos. Ahora debe abrirse el abdomen, para ello realizaremos un corte longitudinal con unas microtijeras justo por encima de los espiráculos de la parte izquierda, observando la preparación en norma ventral (fig. 1 b). Se debe comenzar por el primer segmento abdominal para terminar en el último urosternito. Seguidamente volvemos a introducir los escleritos en una nueva solución alcalina, a 80°C, durante el tiempo que se considere necesario para que estén más o menos limpios y/o blandos. Una vez finalizada la operación, y si el abdomen es de gran tamaño, se agita tal como se describió en el apartado 'Preparación de piel larval', subapartado 'Disección y maceración'. Si es pequeño o con piel muy delicada, se procederá tal como describen MAGRO & DE LA TORRE, 2002: 184. Hay que comentar, que algunos abdómenes poseen coremata y/o también mechones de pelo en los urosternitos. Estas estructuras pueden ser muy importantes para la determinación del ejemplar, en este caso, la agitación se debe hacer la mitad de las veces recomendadas y realizarlas no tan enérgicamente como se describe en el citado trabajo. Para finalizar, se aclaran los escleritos con abundante agua. De esta manera estos deberían estar completamente limpios. Si por alguna razón no es así, se hará una limpieza manual con la solución de limpieza A terminando con un nuevo aclarado. Si los abdómenes son muy pequeños (inferiores a unos 3 mm), es muy difícil hacer el corte longitudinal paralelo a los espiráculos, con lo cual se montarán enteros. Se tratarán con hidróxido potásico al 2%

a 80 °C durante 2 minutos, o bien durante una hora o más en frío, si el abdomen pertenece a un macho. Si por el contrario es una hembra la solución alcalina será al 1%. Después se presionará con un pincel, hasta que el contenido intestinal salga. Se procederá a un agitado no muy agresivo y se aclararán con agua. Si todavía han quedado algunos conductos traqueales, limpiar con el agua procedente de una jeringa, introduciendo la aguja del tamaño adecuado, hasta la mitad del hueco y luego presionar con contundencia. Esta aguja debe tener la punta roma, para lo cual ha de cortarse y pulirse de manera que desaparezcan los biselos. Puede darse el caso, de que incluso la ablación del abdomen sea difícil, o que esta operación, en ejemplares extremadamente pequeños, entrañe riesgos de deterioro de las estructuras del tórax. Para extraer el abdomen, basta golpear dorsalmente y hacia abajo, sobre el cuarto y quinto esternito, siempre y cuando el ejemplar esté seco y montado. Si el abdomen no se desprende con cierta facilidad es mejor no insistir, los ejemplares se deberán preparar enteros. Igualmente, puede suceder, que el ginopigio no se pueda separar de los urosternitos, en cuyo caso la genitalia femenina se montará junto al abdomen o con los últimos segmentos.

Fijación:

No se suele emplear fijación de ningún tipo, a no ser que se deseen utilizar sustancias con poder cromógeno que requieran curtiembre, como por ejemplo el índigo.

Tinción:

Se puede utilizar cualquiera de los métodos de tinción descritos para la piel de las larvas, pero se debe de tener presente que los escleritos se sobrecoloran con facilidad. Por lo general, debido su

estructura, las técnicas diferenciales provocan un gran contraste entre las partes. Recomendamos el uso de la solución colorante A y B y la decolorante C. También se puede utilizar una técnica de coloración más suave a base de Vigencial (100 ml), (véase MEF, 2001) y azul de metileno (1 gr) cuya composición completa es la siguiente:

SOLUCIÓN COLORANTE F

Violeta de genciana	5 gr
Etanol	10 ml
Nonoxinol	0,1 gr
Cloruro de benzalconio	0,02 gr
Agua desionizada	80 ml
Azul de metileno	1 gr

Primero introducir los escleritos, durante 2 minutos, en la solución colorante F. Aclarar con agua y decolorar, si es necesario, con esta solución decolorante:

SOLUCIÓN DECOLORANTE E

Hipoclorito sódico	6 ml
Agua desionizada	94 ml

Es importante después de usar la solución decolorante aclarar con abundante agua. No se debe abusar de esta solución ni aumentar la proporción de hipoclorito. Éste tiene una potente y eficaz acción aclarante pero puede causar amarilleamiento. Seguidamente colorear durante 1 minuto, agitando lentamente, con una solución de mercurcescina sódica, proporción 1:1000. Si es necesario, decolorar con la solución decolorante C. Para terminar aclarar con agua. Las partes más quitinosas de los escleritos quedarán con diferentes tonalidades azules o moradas y el tejido conjuntivo en gamas rosas o rojos (lám 1, fig.14-21). Esta técnica de doble tinción solo se puede aplicar si se incluyen las preparaciones en medios de montaje que necesitan deshidratación en xileno. Para incluir los escleritos en Euparal, se introducen los mismos durante 1 minuto en orceína acética B. Al término se aclaran con agua y se bañan las partes con la solución colorante B durante 2 minutos. Aclarar con agua y meter nuevamente en la solución de orceína. Fijar con alcohol isopropílico. Para decolorar se puede usar la solución decolorante A (lám 1, fig. 13). Si el medio de inclusión es DMHF, se usará la solución colorante E. Aclarar y limpiar los escleritos de los residuos del negro y volver a teñir durante 2 minutos con la solución colorante A. Se enjuagan con agua y se vuelven a introducir 15 segundos, si es necesario, en la solución colorante E. Si las preparaciones se sobrecoloran, se puede utilizar la solución de limpieza A. Si no se consigue la tonalidad deseada se puede utilizar la solución decolorante D y A y nuevamente D (lám.1, fig. 16). Léase más arriba, al final del apartado I, los comentarios sobre el negro de clorazol.

Medios y métodos de inclusión:

Los escleritos abdominales que se han cortado longitudinalmente, se suelen colocar en el porta en norma ventral, junto a la armadura genital y a la izquierda de la misma. Si éstos son de gran extensión, se ubicarán en el mismo porta pero

Página siguiente: Figuras 5-21.

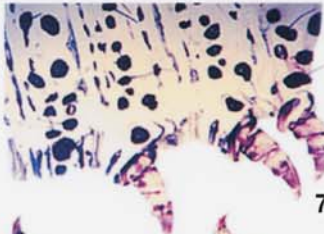
- Preparación de piel larval número 335-409 de *Cucullia verbasci* (Linnaeus, 1758), (det. 9-VII-1993). Se empleó para teñir azul de metileno + verde He (solución D).
- Preparación de piel larval número 334-407 de *Cucullia verbasci* (L.), (det. 9-VII-1993). Se empleó para teñir azul de metileno + verde He û mercurcescina (solución D û mercurcescina).
- Preparación de piel larval número 548-873 de *Cucullia thapsiphaga* Treitschke, 1826, (det. 4-V-1996). Fragmento de los cuatro primeros segmentos. Se empleó para teñir orceína acética û azul de metileno (B) û orceína acética.
- Preparación de piel larval número 533-843 de *Cucullia lychnitis* Rambur, 1833, (det. 4-IV-1996). Larva en último estadio que por su gran tamaño, se montó en dos partes. Se empleó para teñir negro de clorazol û fucsina básica û negro de clorazol (solución E û A û E). Este ejemplar presentaba una grave enfermedad con extrema pérdida de pigmentación, las amplias zonas marrones se pusieron de relieve tras la tinción (nótese que los puntos y las rayas dorsales blancos, en realidad deberían ser negros, y las zonas marrones transparentes, como corresponde a la especie a la que pertenece).
- Preparación de piel larval número 656-1086 de *Cucullia thapsiphaga* Tr. (det. 15-VII-2002). Fragmento de los tres primeros segmentos. Se empleó para teñir azul de metileno û mercurcescina (solución B û mercurcescina).
- Preparación de piel larval número 657-1088 de *Cucullia thapsiphaga* Tr. (det. 15-VII-2002). Fragmento de los primeros segmentos. Se empleó para teñir negro de Clorazol û fucsina básica û negro de clorazol (solución E û A û E).
- Preparación de piel larval número 660- 1094 de *Cucullia lychnitis* Rbr. (det. 15-VII-2002). Fragmento de los primeros segmentos. Se empleó para teñir azul de metileno + verde HE û fucsina básica (solución D û A).
- Preparación de piel larval número 661-1096 de *Cucullia thapsiphaga* Tr. (det. 15-VII-2002). Se empleó para teñir azul de metileno û fucsina básica (solución B û A). Ejemplar con grave enfermedad, los puntos azules, corresponden con la facies de la misma, que se pusieron de relieve tras la tinción y no con los puntos larvales relativos a la especie.
- Preparación de piel larval número 663-1100 de *Cucullia thapsiphaga* Tr. (det. 20-VII-2002). Se empleó para teñir Vigencial û mercurcescina (solución F1 û mercurcescina sódica). Nótese la conservación del tubo anal, muy útil para usarlo a modo de asidero y manipular con comodidad la piel.
- Preparación número 269-314 de escleritos abdominales de un adulto hembra de *Agrotis (Crassagrotis) obesa* [Boisduval, [1828]], (det. 2-IV-1993). Fragmento, 3º, 4º y 5º esternito en norma ventral. Se empleó para teñir orceína acética û azul de metileno (B) û orceína acética.
- Preparación número 277-324 de escleritos abdominales de un adulto macho de *Eurranthia plummistaria* (Villers, 1789), (det. 4-IV-1993). Se empleó para teñir azul de metileno + verde He û Fucsina básica (solución D û A).
- Preparación número 266-310 de escleritos abdominales de un adulto macho de *Zygaena (Zygaena) lavandulae barcelonica* Reiss, 1936, (det. 1-IV-1993). Fragmento, 6º, 5º y 4º esternito. Se empleó para teñir negro de clorazol û fucsina básica û negro de clorazol (solución E û A û E).
- Preparación número 274-319 de escleritos abdominales de un adulto macho de *Cossus cossus* (Linnaeus, 1758), (det. 4-IV-1993). Fragmento de los últimos urosternitos. Se empleó para teñir azul de metileno (B) û mercurcescina.
- Preparación número 313-370 de escleritos abdominales de un adulto macho de *Euxoa (Euxoa) temera* (Hübner, [1808]), (det. 6-VII-1993). Fragmento de los últimos urosternitos. Se empleó para teñir Vigencial û fucsina básica (solución F1 û A).
- Preparación número 267-312 de escleritos abdominales de un adulto hembra de *Agrotis (Crassagrotis) crassa* (Hübner, [1803]), (det. 2-IV-1993). Fragmento de los primeros esternitos. Se empleó para teñir azul de metileno + verde He (solución D).
- Preparación número 254- 292, de escleritos abdominales de un adulto macho de *Habrosyne pyritoides* (Hufnagel, 1766), (det. 20-III-1993). Fragmento de los últimos esternitos. Se empleó para teñir Fucsina básica û azul de metileno (solución A û B).
- Preparación número 260-301, de escleritos abdominales de un adulto macho de *Agrotis (Crassagrotis) crassa* (Hb.), (det. 28-III-1993). Fragmento de los últimos urosternitos. Se empleó para teñir Azul de metileno + verde He û mercurcescina (solución D û mercurcescina). (Todas las preparaciones y los ejemplares se encuentran depositados en la colección del autor. Rafael Magro, Det. et Leg.).



5



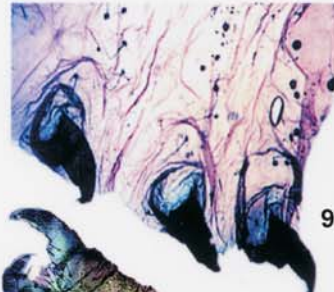
6



7



8



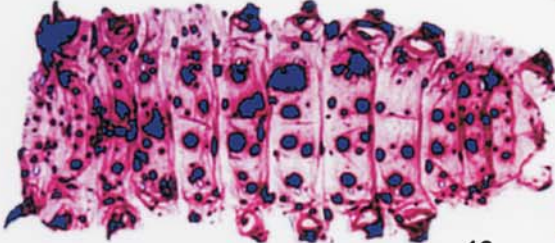
9



10



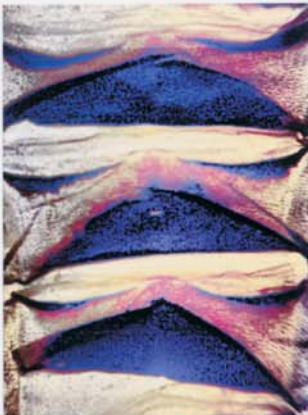
11



12



13



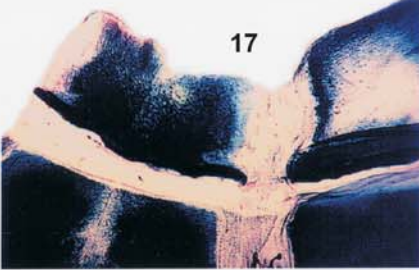
14



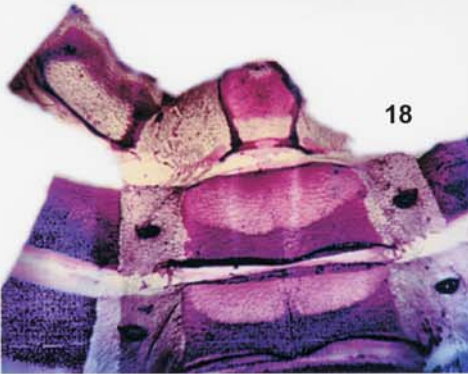
15



16



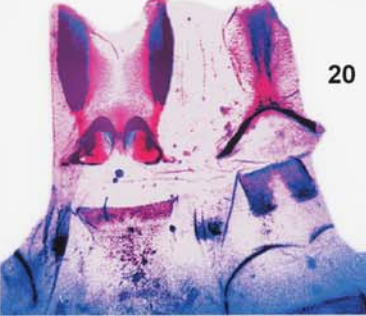
17



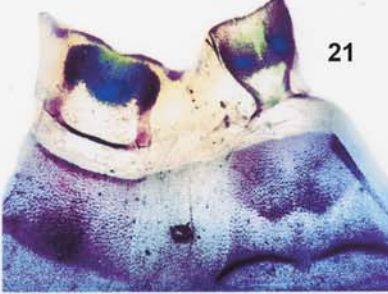
18



19



20



21

en otro cubre. Si la armadura genital es de gran espesor y los escleritos no y viceversa, se montarán en cubres separados. Si los escleritos tienen mucho grosor montar las preparaciones en célula de Legendre (fig. 3). Aquellos abdómenes que por su tamaño, no se pudieron seccionar, se montarán en norma dorso-lateral derecha, para que se puedan observar con facilidad los espiráculos. El sistema de almacenamiento en tubos con glicerina, no es muy útil para los escleritos abdominales, puesto que su manipulación resulta engorrosa y es fácil deteriorarlos.

IV. Otras preparaciones

Las preparaciones de patas y tórax, por lo general, no hace falta teñirlas, pero si se da el caso de que son apéndices poco quitinizados, se puede proceder aplicando las técnicas descritas para los escleritos. Las de antenas, no se deben calentar en ninguna solución alcalina, puesto que pudieran perder las lamelas antenales que, en algunas ocasiones, son importantes desde el punto de vista taxonómico. Se limpiarán, si es necesario, con alcohol etílico de 30°. El mismo procedimiento para las preparaciones de alas. Éstas no necesitan tinción. Las preparaciones de escamas es preferible realizarlas en seco. Para montarlas, basta colocar el cubre encima del porta y barnizar los bordes con bálsamo de Canadá, para sellarlos. Si las estructuras son de mucho grosor, es necesario montar en célula seca, para lo cual se procede de la siguiente manera: se baña una junta tórica de P.V.C. transparente de 15 mm de diámetro en una solución de bálsamo de Canadá al 50% en xileno y se deja secar. Se coloca en el centro del porta, se calienta ligeramente y se deja secar, de esta manera la junta tórica quedará pegada. Se colocan dentro las partes a examinar. Se cierra colocando un cubre redondo de 15 mm. Se sellará calentándolo nuevamente, con lo cual el cubre quedará pegado a la junta (fig. 3). Para hacer preparaciones de grosor medio se pueden usar portas excavadas. Con respecto a preparaciones de tégulas, palpos labiales, hipofaringes, órganos timpánicos, órganos de Julien, etc., se aplicarán las técnicas descritas para las cápsulas cefálicas, si están muy quitinizados. Si no fuese así, se aplicarán las mismas técnicas de tinción descritas para los escleritos abdominales.

V. Decoloración de estructuras

Un caso bastante frecuente es querer aclarar los tegumentos, para lo cual se utilizará la solución de maceración A y la decolorante A. Si de este modo, no se consigue hacerles todo lo transparentes que se desea, usar la solución de maceración B, donde se dejan varias horas o varios días, dependiendo del tamaño. Pasado el tiempo, se lavan con agua y se introducen en un tubo con ácido acético al 30%. Cuando cesa el desprendimiento de burbujas, se sumergen en el mismo ácido pero puro, durante unos minutos, y se lavan con agua bicarbonatada. Las soluciones aclarantes que usamos, son dos, una de acción suave que es la siguiente:

SOLUCIÓN ACLARANTE A

Ácido fénico	10 gr
Ácido láctico	10 gr
Glicerina bidestilada 30°	20 ml
Agua desionizada	10 ml

La segunda de acción más enérgica:

SOLUCIÓN ACLARANTE B

Hidrato de cloral	66 gr
Ácido fénico	33 gr
Agua desionizada	100 ml

Como aclarantes todavía más potentes, se pueden usar el peróxido de hidrógeno de 110 volúmenes y el hipoclorito sódico, variando su concentración, rebajándolos con agua (anexo VIII). Si se quieren utilizar éstos, es necesario protegerse adecuadamente, puesto que provocan graves y dolorosas quemaduras en la piel (anexo IV, campos F y G).

VI. Comentarios sobre los medios y métodos de inclusión, deshidratación y tinción

Es necesario insistir, como ya se ha comentado a lo largo del trabajo, que no todas las sustancias empleadas para teñir las estructuras son compatibles con todos los medios de inclusión. Con los que necesitan deshidratación de los tejidos, por ejemplo: bálsamo de Canadá, de cedro, hirax, Eukitt, Entellán, parafina, Dpx, etc. los tejidos han de sobrecolorarse, puesto que perderán parte de su tonalidad en el proceso. Como es sabido, para deshidratar, es necesario pasar por diferentes alcoholes hasta llegar al xileno y posterior baño en esencia (clavo o Eugenol, eucaliptol, geraniol, etc.; véase diagrama de procesos, fig. 4). Estos pasos de deben realizar con rapidez hasta llegar al xileno al 50% en etanol, que es cuando los tejidos pierden más color. Sin embargo, una vez superado este paso, se deben dejar reposar los exoesqueletos, ralentizando ostensiblemente el proceso. Si no se hace de esta manera las preparaciones pueden velarse, saliendo manchas turbias. También es posible deshidratar por calentamiento y secado, en cuyo caso la tonalidad no se pierde, pero el tipo de estructuras que aquí se estudian se deforman y encogen, por lo cual no es muy recomendable. Si se deshidratan preparaciones teñidas con Vigencial es preciso hacer el proceso más lentamente, en caso contrario podrían desteñirse en el medio de inclusión. La manipulación de escleritos y de pieles larvales, a la hora de colocarlas en el porta, es relativamente lenta y requiere un medio de montaje que no se seque rápidamente (véase anexo comparativo V). Entellán es muy transparente y aunque, con cierta práctica, se puede conseguir incluir los tejidos sin provocar ni una sola burbuja, con el paso del tiempo las burbujas microscópicas se agrandan, haciéndose visibles. Los portas se limpian con extrema facilidad. Eukitt es casi transparente, se limpia peor y se ha observado que preparaciones con más de 5 años se agrietan ostensiblemente. Hoyer contiene hidrato de cloral y las preparaciones se aclaran con el tiempo. El bálsamo de Canadá, medio de inclusión clásico muy antiguo, con cierta transparencia y que amarillea con el tiempo, para estructuras finas o de mediano grosor es muy adecuado. Permite un periodo de manipulación muy largo y desaloja las burbujas. El amarilleamiento no es problema a la hora de fotografiar las preparaciones, existen en el mercado filtros correctores para los oculares y los objetivos, tanto para el microscopio (o para la lupa estereoscópica) como para la cámara. Los medios de montaje que requieren incluir las estructuras con alcohol, tienen cierta limitación en lo referente a tinción y los problemas de evaporación reseñados en MAGRO & DE LA TORRE, 2002: 191-192 (véanse tablas comparativas V, VI y VII en ese trabajo). Euparal, resulta muy útil para estructuras que no se pueden deshidratar en xileno y/o aquellas en la que la observación microscópica precisa de grandes aumentos, dado su bajo índice de refracción. Para montar en célula de Legendre (fig. 3) no es muy recomendable. Su color es amarillento y se limpia bien, no desaloja las burbujas. El DMHF, no necesita que las estructuras se deshidraten. Pudiera parecer que presenta grandes ventajas, pero también presenta bastantes inconvenientes. Hay que emplear sustancias cromógenas que no sean hidrosolubles. Se puede teñir con soluciones liposolubles pero éstas son difíciles de eliminar de los tejidos, con la consecuente dificultad a la hora de incluirlas en un medio hidrosoluble. Montar con DMHF escleritos y exoesqueletos larvales que, requieren un largo tiempo de manipulación y operaciones relativas a su correcta ubicación en el porta, es una tarea ardua y difícil. El DMHF se seca en superficie con extrema rapidez a 18° C. Si además, la temperatura es superada por el ambiente o por el calor que genera la pletina de la lupa, se crea una película que a su vez genera gran cantidad de burbujas al colocar el cubre, imposibles o muy difíciles de quitar. El medio no las expulsa. Muchas de las preparaciones quedan pues inservibles si se desean utilizar para la fotografía. Es totalmente transparente y se limpia con facilidad (véase anexo V y VI).

Retoques y tinción puntual:

Se pueden realizar pequeños retoques de coloración realizando un teñido puntual, en una o varias zonas concretas para resaltarlas. Basta colorear manualmente con un pincel del número 00000, con verde o azul, la parte que se desee teñir y fijar. Esta operación, se debe hacer una vez acabada la tinción general y tras el aclarado de la estructura (lám 1, fig. 21). Otra técnica consiste en pintar las zonas que se desean contrastar, con la solución curtiente A. Se debe de partir de estructuras limpias y que no hayan sido teñidas. Dejar secar y hacer un teñido general, por ejemplo, con índigo. En aquellos lugares en que se aplicó el curtiente la tonalidad resultará ligeramente más fuerte que en el resto y además, se decolorarán peor.

Conclusiones

Es bastante frecuente que los entomólogos utilicen un único método de tinción para todo tipo de preparaciones. A nuestro juicio, es más lógico emplear el método de tinción más adecuado al tipo de estructuras a las que se han de aplicar (véase anexo VII). Si las estructuras se quieren fotografiar, las impresiones se deberían realizar antes del montaje en el medio de inclusión. Proceder de esta manera reporta grandes ventajas. Las fotografías obtenidas tendrán más luminosidad, al no tener la necesidad de tomar en cuenta la pérdida de contraste provocada por el color del medio de inclusión, ni su índice de refracción. Por otra parte, las preparaciones resultarán mucho más contrastadas antes de proceder a la deshidratación que, como ya se ha comentado, pierden cierta pigmentación en los sucesivos pasos por alcoholes. También puede suceder que, tras la colocación del cubre, las estructuras se aplasten provocando deformaciones que, en ocasiones, pueden confundirse con caracteres con valor taxonómico, ocasionando no pocos quebraderos de cabeza, a la hora de determinar las especies.

En lo referente a medios de inclusión, mucho se ha hablado de las excelencias del DMHF, al ser un medio soluble en agua que no necesita que las estructuras se deshidraten. Como ya se ha comentado, y no queriendo pecar de insistencia, si no dejar clara constancia del hecho, colocar preparaciones de estructuras grandes, que requieren lentas manipulaciones, con respecto a la

ubicación de las mismas en el porta y, además, no crear burbujas, es bastante difícil. Respecto al Euparal, tampoco parece darse demasiada importancia, al hecho de que se evapore y haya que rellenar las preparaciones más gruesas constantemente. Estas manipulaciones, cuando se han de mantener miles de preparaciones, resultan altamente tediosas (y desde el punto de vista económico, costosas), a la par que no vale la pena mantener los portas totalmente limpios, dado que cada vez que se rellenan, se vuelven a manchar. También es muy fácil ensuciar las etiquetas, con la consecuencia, de que es posible perder los datos escritos en las mismas. No digamos, si estas manipulaciones se tienen que realizar con los portas que posea una institución científica, donde se almacenen decenas de miles de preparaciones. En lo referente a Eukkit, se ha constatado, que una vez transcurridos varios años después del montaje, se suele agrietar comenzando por los bordes. Otros medios como por ejemplo: hirax, resina sammar, colofonia, líquido de Faure, líquido de Hoyer y solución Berlese, tienen innumerables desventajas y han sido superados por otros más modernos, por lo que, a la luz de los resultados de nuestras investigaciones, no recomendamos su uso (véase anexos comparativos V y VI). A la hora de elegir un medio de montaje, habría que delimitar claramente cual va a ser el uso futuro de las preparaciones. Si se van a observar muy pocas veces y su uso no va a ser intensivo, creemos, que el mejor método es el almacenaje en tubos con solución de glicerina (véase MAGRO & DE LA TORRE, 2002: 187). A lo sumo, la inclusión en el medio rápido Entellán. Si el uso va a ser intensivo y las preparaciones no muy gruesas, bálsamo de Canadá en porta y cubre. Si las preparaciones son gruesas y de rápida colocación, DMHF, asumiendo las limitaciones en lo referente a las técnicas de tinción y las burbujas. Para finalizar, si las estructuras sólo se pueden deshidratar con alcohol isopropílico, como por ejemplo, la evaginación de una vesícula o una bursa expandida, hay que usar Euparal.

Las técnicas para la preparación y montaje de dermataxias son relativamente sencillas. Basta hacer acopio de los utensilios y las soluciones curtientes, de tinción, decoloración, aclarantes e inclusión expuestas y armarse de una buena dosis de paciencia (véase diagrama de procesos, fig. 4).

El resumen de las técnicas tratadas en este trabajo se presenta en el anexo IX.

Agradecimiento

A Francisco De La Torre a por sus útiles comentarios y correcciones. A Juan Carlos Sáenz-Rojo por facilitarnos información sobre el Vigencial y el Eugenol. A José Luis Yela por buscarnos algunas referencias bibliográficas.

Bibliografía

- BECK, H. 1960. *Die Larvalsystematik der Eulen (Noctuidae)*. Handlungen zur Larvalsystematik der Insekten, vol. 4. Akademie-Verlag. Berlin.
- BECK, H. 1989. Die Bedeutung larvaler (morphologischer und ornamentaler) Untersuchungen für die Systematik der Noctuiden (Lep.). *Verhandlungen des IX. Symposium Internationalis Entomofaunistica Europaeae Centralis, Gotha*, (1986): 164-172.
- BERNIS-MATEU, J. 1973. *Atlas de microscopie*. Ediciones Jover, S.A. Barcelona. 86 pp., 43 lám.
- CARAYON, J. 1969. Emploi du noir du Chlorazol en anatomie microscopique des insectes. *Annales de la Société Entomologique de France, (N.S.)*, 5(1): 179-193.
- EATON, J. L. 1987. *Lepidopteran Anatomy*. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons. New York. 257 pp.
- FERNÁNDEZ-RUBIO, F. 1980. Contribución a la técnica de disección, preparación y tinción de las armaduras genitales (genitalia) de los lepidópteros. *Butll. Soc. Cat. Lepid.*, 28: 11-18.
- FERNÁNDEZ-RUBIO, F. 1985. Un nuevo modelo de trampa de luz portátil automática para la caza de insectos. *Bol. Estac. centr. Ecol.*, XIV, nº 28: 91-102.
- GABE, M. 1968. *Techniques histologiques*. Masson, Paris. VI+1113 pp.
- HASENFUSS, I., 1963. Eine vergleichend-morphologische Analyse der regulären Borstenmuster der Lepidopteren-larven. *Z. Morph. Ökol. Tiere.*, 52: 197-364.
- HINTON, H. E. 1946. On the homology and nomenclature of the setae of lepidopterous larvae, with some notes on the phylogeny of the Lepidoptera. *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 97: 1-37.
- LANGERON, M. 1969. *Precis de microscopie*. 7ème. Édition. Masson et Cie. Paris. 1430 pp.
- MAGRO, R. & DE LA TORRE, F. 2002. Crítica razonada de los métodos para la preparación de genitales internos y uso de nuevas sustancias. *SHILAP Revta. Lepid.*, 30 (118), 2002: 181-201.
- MARTÍNEZ, I. 2002. Técnicas básicas de anatomía microscópicas y de morfometría para estudiar los insectos. *Bol. S.E.A.*, nº 30 (2002): 187-195.
- MARTOJA, R. & MARTOJA, M. 1967. *Initiation aux techniques de l'histologie animal*. Masson et Cie. Paris. 345 pp.
- MEF. 2001. Modificaciones de especialidades farmacéuticas (actualizado en enero del 2001). [Página en línea]. Disponible desde Internet:

<[http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000024.nsf/voDocumentos/0EAA6BE57C2EAF2EC1256AD100302BC1/\\$File/pam_modificaciones.pdf](http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000024.nsf/voDocumentos/0EAA6BE57C2EAF2EC1256AD100302BC1/$File/pam_modificaciones.pdf)> [Con acceso el 20-7-2002].

PEARSE, A. 1968. *Histochemistry theoretical and Applied*. Vol.1. Little, Brown and Company. Boston. 759 pp.

SCHAUFF, M.E. 1986. *Collecting and preserving insects and mites: Techniques and tools*. [Libro en línea]. Disponible desde Internet: Página principal <<http://www.sel.barc.usda.gov/selhome/collpres/collpres.pdf>> [Con acceso el 20-7-2002].

SNODGRASS, R.E. 1997, actualizado por SCHOUEST, L., *Principles of insect morphology*. [Libro en línea]. Disponible desde Internet: página principal < <http://ag.arizona.edu/classes/ento415/snodgrass/contents.html>> [Con acceso el 9-8-2002].

STEINMANN, H., & ZOMBORI, L., 1984. *A morphological atlas of insectae larvae*. Akad. Kiadó, Budapest.

VIVES-MORENO, A. 1988. Técnicas de montaje microscópico en el estudio de los lepidópteros.- 1ª *Jornada Ibérica de Lepidopterología*. *Resúmenes*: 43. Madrid.

ANEXOS

Anexo I. Resumen de las soluciones de maceración y oxidantes

Solución	Componente 1	Componente 2	Base
A	Hidróxido potásico, 10 gr	-	Agua desionizada, 100 ml
B	Hidróxido potásico, 5 gr	-	Agua desionizada, 100 ml
C	Permanganato potásico, 10 gr	Alumbre de roca, 10 gr	Agua desionizada, 80 ml
D	Hidróxido potásico, 1 gr	-	Agua desionizada, 100 ml

Anexo II. Resumen de las soluciones de limpieza y curtientes

Solución	Componente	Base
Limpieza A	Ácido acético, 35 ml	Agua desionizada, 65 ml
Curtiente A	Alumbre de roca, 10 gr	Agua desionizada, 100 ml

Anexo III. Resumen de las soluciones colorantes

S.	Cromógeno1	Cromógeno2	Componente 1	Base
A	Fuscina básica, 5 gr	-	-	Etanol, 100 ml
A1	Hematoxilina, 10 gr	-	-	Etanol, 100 ml
B	Azul de metileno, 5gr	-	-	Agua desionizada, 100 ml
B1	Azul de Toluidina, 5 gr	-	-	Agua desionizada, 100 ml
C	Índigo, 10 ml	Bisulfito de sosa, 5 gr	Etanol (gotas)	Agua desionizada, 80 ml
D	Verde He, 10 gr	Azul de metileno, 10 gr	Fenol, 2 gr	Agua desionizada, 100 ml
E	Negro de clorazol, 0,1 gr	-	-	Agua desionizada, 100 ml
F	Violeta de genciana, 5 gr	Azul de metileno, 1 gr	Etanol, 10 ml	Agua desionizada, 90 ml
F1	Vigencial, 100 ml	Azul de metileno, 1 gr	-	-
F2	Vigencial	-	-	Según solución comercial.
G	Orceína acética B	-	-	Según solución comercial.

Anexo IV. Resumen de las soluciones decolorantes

Solución	Componente 1	Componente 2	Base
A	Ácido oxálico, 10 gr	-	Agua desionizada, 100 ml
A1	Bisulfito sódico, 10 gr	-	Agua desionizada, 100 ml
B	Ácido acético, 25 ml	Etanol, 25 ml	Agua desionizada, 50 ml
C	Ácido acético, 2 ml	Etanol, 78 ml	Agua desionizada, 20 ml
D	Hidrato de cloral, 10 gr	-	Agua desionizada, 100 ml
E	Hipoclorito sódico, 6 ml	-	Agua desionizada, 94 ml
F	Peróxido de hidrógeno, 110 Vol.	-	-
G	Hipoclorito sódico, 80 ml	-	Agua desionizada, 20 ml

Anexo V. Datos comparativos de los medios de inclusión reseñados en este trabajo. (*) Medios de inclusión no recomendables.

Medio de inclusión	Periodo secado	Disolución	Deshidratación	Transparencia	Color	Generación de burbujas	Limpieza
DMHF	Muy rápido	Agua	No precisa	Alta	Incoloro	Sí, muy fácil	Fácil
Canadá	Muy lento	Xileno	Precisa	Media	Ámbar	Las desaloja	Engorrosa
Cedro*	Muy lento	Xileno	Precisa	Media	Poco amarillo	Sí, difícil	Engorrosa
Sammar*	Rápido	Xileno	Precisa	Media	Amarillento	Sí, fácil	Engorrosa
Colofonia*	Rápido	Xileno	Precisa	Baja	Ámbar oscuro	Sí, fácil	Muy engorrosa
Hirax*	Rápido	Xileno	Precisa	Media	Muy amarilla	Sí, fácil	Muy engorrosa
Eukitt	Lento	Xileno	Precisa	Media-alta	Incoloro	Sí, fácil	Engorrosa
Entellán	Rápido	Xileno	Precisa	Muy alta	Incoloro	Sí, fácil	Muy fácil
Euparal	-	Alcohol	Isopropílico	Media	Ámbar claro	Sí, difícil	Engorrosa
DPX	Lento	Xileno	Precisa	Media	Amarillento	Sí	Engorrosa
Faure*	No seca	Glicerina	Lactofenol	Media	Amarillento	Sí, difícil	Fácil
Hoyer*	No seca	Glicerina	Lactofenol	Media	Amarillento	Sí, difícil	Fácil
Berlèse*	-	Ácido acético	Precisa	Media	Amarillento	Sí	Engorrosa

Anexo VI. Compatibilidades entre técnicas de tinción y medios de inclusión

Medio	Solución								
	A	A1	B	B1	C	D	E	F	F1
DMHF	Sí	No	No	No	No	No	Sí	No	No
Canadá	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Cedro	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Sammar	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Colofonia	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Hirax	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Eukitt	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Entellán	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Euparal	No	No	Sí	No	No	No	Sí	No	No
DPX	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Faure	Sí	No	No	No	No	No	Sí	No	No
Hoyer	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Berlèse	Sí	No	No	No	No	No	Sí	No	No

Anexo VII. Tinción y partes anatómicas

Estructura	Deshidratación		Sin deshidratación
	En xileno	Alcohol isopropílico	
Cápsula cefálica muy quitinizada	D û mercurcescina Rebajado	Orceína B û B û orceína B	E
Cápsula cefálica poco quitinizada	D û mercurcescina	Orceína B û B û orceína B	E
Esclerito muy quitinizado	A û B	Orceína B û B û orceína B	E û A û E
Esclerito poco quitinizado	F û mercurcescina	Orceína B û B û orceína B	E û A û E
Larva muy quitinizada	D û mercurcescina	Orceína B û B û orceína B	E û A û E
Larva poco quitinizada	A û B û C	Orceína B û B û orceína B	E û A û E
Patas, téglulas, palpos y otros órganos muy quitinizados	D û mercurcescina Rebajado	Orceína B û B û orceína B	E
Patas, téglulas, palpos y otros órganos poco quitinizados	F û mercurcescina	Orceína B û B û orceína B	E û A û E
Órganos timpánicos, Julien, etc	D û mercurcescina	Orceína B û B û orceína B	E

Anexo VIII. Resumen de las soluciones aclarantes

Solución	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Base
Aclarante A	Ácido fénico, 10 gr	Ácido láctico, 10 gr	Glicerina 30°, 20 ml	Agua desionizada, 10 ml
Aclarante B	Hidrato de cloral, 66 gr	Ácido fénico, 33 gr	-	Agua desionizada, 100 ml

Anexo IX. Resumen las técnicas desarrolladas en este trabajo

TRATAMIENTOS	
Estructura	Diagrama de procesos simplificado
Tratamientos alcalinos	
Piel larval grande o gruesa	KOH, 15%, 80°C, 2 min. ' Agitado 20 veces ' Gotas alcohol isopropílico ' Lavado ' Agitado 20 veces ' Lavado ' Agitado 5 veces ' Lavado
Piel larval pequeña o fina	KOH, 5%, 80°C, 2 min. ' Agitado 10 veces ' Gotas alcohol isopropílico ' Lavado ' Agitado 5 veces ' Lavado
Piel larval muy quitinizada	Solución A, 1 día * ' Agitado ' Lavado solución decolorante A ' Lavado ' KOH 30%* ' Lavado ' Ácido cítrico 30% ' Lavado
Escleritos abdominales grandes de machos o muy gruesos	KOH, 5%, 80°C, 10 min. ' Ablación armadura ' Corte longitudinal ' KOH, 5%, 80°C* ' Agitado 20 veces ' Gotas alcohol isopropílico ' Lavado ' Agitado 10 veces ' Lavado ' Agitado 5 veces ' Lavado
Escleritos abdominales pequeños o de hembras o más finos	KOH, 5%, 80°C, 10 min. ' Ablación armadura ' Corte longitudinal ' KOH, 5%, 80°C* ' Agitado 10 veces ' Gotas alcohol isopropílico ' Lavado ' Agitado 5 veces ' Lavado
Escleritos abdominales con coremata o más delicados	KOH, 5%, 80°C, 8 min. ' Ablación armadura ' Corte longitudinal ' KOH, 5%, 80°C* ' Agitado 5 veces ' Gotas alcohol isopropílico ' Lavado ' Agitado 2 veces ' Lavado
Escleritos abdominales muy pequeños y delicados	KOH, 2%, 80°C, 2 min. ' Ablación armadura ' Agitado 5 veces ' Gotas alcohol isopropílico ' Aspiración contenido intestinal ' Agitado 2 veces ' Lavado
Tratamientos aclarantes	
Todo tipo, de acción muy suave	Solución de maceración A* ' Solución decolorante A* ' Lavado
Todo tipo, de acción suave	Solución de maceración A* ' Lavado
Todo tipo, de acción media	Solución de maceración A* ' Solución decolorante A* ' Solución de maceración B* ' Lavado ' Ácido acético 30% ' Ácido acético puro ' Lavado en sulfito o bisulfito sódico al 10% en agua ' Lavado
Todo tipo, de acción fuerte	Solución de maceración B* ' Lavado
Todo tipo, de acción muy fuerte (dependiendo disolución en agua)	1ª Peróxido de hidrógeno 110 Vol.* ' Lavado 2ª Hipoclorito sódico rebajado* ' Lavado
Tratamientos curtientes	
Todo tipo, de estructuras	Solución curtiente A* ' Lavado

* Tiempo que se estime necesario según estructura y cometido.

TRATAMIENTOS	
Estructura	Diagrama de procesos simplificado
Tinciones generales	
Piel larval poco quitinizada	1ª Solución colorante A, 18°C, 4 min. ' Solución colorante B, 18°C, 6 min. ' Limpieza ' Solución decolorante B* ¹ ' Deshidratado 2ª Solución colorante C, 80°C, 5 min. ' Solución curtiente A (solo pasar) ' Limpieza ' Solución decolorante B* ¹ ' Deshidratado
Piel larval muy quitinizada	Solución colorante D, 18°C, 4 min. ' Mercurceséina sódica, 18°C, 1 min. ' Lavado ' Solución decolorante C* ¹ ' Lavado ' Deshidratado
Piel larval para incluir en medios alcohólicos	Solución Orceína B, 18°C, 2 min. ' Lavado ' Solución colorante B, 18°C, 4 min. ' Solución decolorante A* ¹ ' Alcohol isopropílico
Piel larval para incluir en medios hidrosolubles	Solución colorante E, 18°C, 1 min. ' Lavado Solución colorante A, 18°C, 2 min. ' Solución de limpieza A* ¹ ' Solución decolorante D* ¹ ' Secado ' Hidratado
Cápsulas cefálicas grandes	Solución colorante E, 18°C, 1 min. ' Lavado ' Solución colorante A, 18°C, 2 min. ' Solución de limpieza A* ¹ ' Solución decolorante D* ¹ ' Lavado
Cápsulas cefálicas pequeñas	Solución colorante A, 18°C, 4 min. ' Solución colorante B, 18°C, 6 min. ' Limpieza ' Solución decolorante B* ¹ ' Deshidratado
Escleritos abdominales poco quitinizados	Solución colorante A, 18°C, 4 min. ' Solución colorante B, 18°C, 6 min. ' Limpieza ' Solución decolorante C* ¹ ' Deshidratado
Escleritos abdominales muy quitinizados	Solución colorante F, 18°C, 2 min. ' Lavado ' Solución decolorante E* ¹ ' Lavado ' Mercurceséina sódica, 18°C, 1 min. ' Lavado ' Deshidratado
Escleritos abdominales para incluir en medios alcohólicos	Solución Orceína B, 18°C, 1 min. ' Lavado ' Solución colorante B, 18°C, 2 min. ' Solución decolorante A* ¹ ' Alcohol isopropílico
Escleritos abdominales para incluir en medios hidrosolubles	Solución colorante E, 18°C, 1 min. ' Lavado ' Solución colorante A, 18°C, 2 min. ' Solución de limpieza A* ¹ ' Solución decolorante D* ¹ ' Secado ' Hidratado
Tinción puntual	
Todo tipo de estructuras	Tinción o doble tinción ' Lavado ' Tinción puntual con verde He o azul de metileno ' Deshidratado
Deshidratación	
Todo tipo de estructuras	Etanol 50°, 30 segundos ' Alcohol 70°, 1 min. ' Etanol puro, 2 min. ' Xileno 50% en Etanol, 15 min. ' Xileno, 30 min. ' Esencia, 1 hora

* Tiempo que se estime necesario según estructura y cometido. ¹ Proceso a requerimiento u optativo.