

TECNICA PARA MONTAR ESPECIMENES DE *TRICHOGRAMMA* SPP (*Hymenoptera:Trichogrammatidae*)

M. Ramírez Gómez

Universidad Autonoma Chapingo-Unidad Regional Universitaria de Zonas aridas
Bermejillo, Dgo. mramirez@chapingo.uruza.edu.mx

RESUMEN. El objetivo del trabajo fue desarrollar una técnica para montar especimenes de *Trichogramma* spp de acuerdo a los pasos siguientes: 1. Preparación, 2. Clareo, 3. Posicionamiento, 4. deshidratación, 5. Transferencia al aceite de clavo, y 6. Montaje.

Palabras clave: *Trichogramma*, montaje identificacion

SUMMARY. Due to the fact that mounting *Trichogramma* specimens is a hard work and a spending time process, the objective of this study was to develop a new mounting technique for *Trichogramma* ssp specimens. To do that, several procedures were carried out and evaluated until get similar results than other expensives and time consuming techniques. During this study a new technique to positioning the specimen was developed and dehydration process was reduced significantly. Quality mounting specimens by using this technique are suitable to be identified fully and in minor time.

INTRODUCCION

En el trabajo taxonomico siempre es importante la preservacion y el montaje para dar paso a la identificacion de especimenes. En el caso especimenes de *Trichogramma spp* muy escasas las técnicas de montaje que permitan identificar las especies y las disponibles requieren de sofisticados procedimientos y/o materiales que las hacen muy consumidoras de tiempo, costosas, y muy difícil de llevarlas a la practica por el tamaño diminuto (1-1.5 mm), de estas avispa parasiticas, dando como resultado que menos investigadores se lleguen a interesar en su estudio.

De acuerdo a Platner, *et al* (1998), los pasos para montar un espécimen son: preparación del espécimen, clarearlo, posicionarlo, deshidratarlo, transferirlo a aceite de clavo y montarlo. La técnica desarrollada y descrita a continuación ha sido utilizada por el autor en su trabajo de tesis de maestría y actualmente, una vez difundida verbalmente, ha empezado a ser utilizada por otros investigadores interesados en la materia, de ahí la importancia de la difusión escrita de la misma. Por tal razon, el objetivo del presente trabajo es describir cada uno de los pasos necesarios para lograr un montaje exitoso.

MATERIALES Y METODOS

La metodologia se ira describiendo conforme se describa cada paso. Los materiales utilizados son:

- 1) Microscopio estereoscopio
- 2) Lampara optica
- 3) Aspirador
- 4) Alcohol 200 Proof (siempre que se pueda)
- 5) Dos goteros
- 6) Soluciones de alcohol al 10 % (mezclado con Triton X); 20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 95% y 100%
- 7) Triton X
- 8) Aceite de clavo
- 9) Balsamo de Canada
- 10) Hidroxido de Potasio (KOH)
- 11) Biales
- 12) Cajas Petri
- 13) Vidrios portaobjetos
- 14) Vidrio cubreobjetos
- 15) Agujas de diseccion o palillos de bamboo con alfileres 00 en las puntas
- 16) Pinzas para montaje
- 17) Matraz de 100ml
- 18) Papel Kleenex®

- 8) Cotonetes
- 9) Porcelanas de 12 recipientes circulares, y
- 10) "Paciencia"(indispensable)

RESULTADOS

La metodología es como se indica a continuación:

1. Preparación del espécimen: Este paso puede incluir al tomar la muestra de especímenes vivos y matarlos. Usualmente lo hacemos con un pequeño aspirador y soplando suavemente se transfieren a alcohol al 75%

2. Clareo del espécimen: Una vez en el alcohol al 75%, los especímenes se transfieren a una solución de Hidróxido de Potasio (KOH) que puede ser al 5, 10, o 15 % para clarificarlo. El KOH desintegra los órganos internos del espécimen y da transparencia al mismo, garantizando de esta manera una buena visión de las estructuras consideradas para la identificación correspondiente. El tiempo que puede durar un espécimen en la solución de KOH depende de la consistencia del espécimen. Usualmente 40-60 minutos es suficiente, pero algunos pueden requerir 24 horas. Se debe tener cuidado de revisar el espécimen cuando este en el KOH, pues un sobre-clareo dejara el espécimen simple y completamente transparente quedando obsoleto para su identificación. Una vez clareado el espécimen debe pasarse a una mezcla de alcohol al 10% y Triton X por una noche. Se debe agregar solamente el 1.5 % de Triton X a la cantidad de alcohol al 10%. Por ejemplo: 1.5 ml Triton X se debe mezclar con 100 ml de alcohol al 10%. Esta es la única concentración de alcohol que se mezcla con el Triton X.

3. Posicionamiento: De acuerdo a varios autores (Platner *et al*, 1998; Ramirez, 2000), este es el paso más importante y determinante para obtener un montaje exitoso. No abundaremos demasiado en el porque ya lo hemos hecho anteriormente en otro congreso (Ramirez, 2000), pero si tenemos que decir que la modificación del sustrato y la manera en que lo hacemos, son dos aspectos nuevos y relevantes. Entonces primeramente se coloca el vidrio portaobjeto bajo el microscopio, se coloca sobre el una pieza de papel Kleenex de 1 cm² aprox. Dicha pieza de papel se satura con la mezcla de Triton X y alcohol al 10% utilizando un gotero, entonces sobre el se coloca el espécimen. Se debe lograr acomodarlo en posición de reposo al menos, pero si es posible se pueden expandir las alas y antenas. El uso del Triton X permitira reposicionar el espécimen en el mismo momento del

montaje. Lo que si es fundamental es que la región ventral del espécimen quede paralela al sustrato, de esta manera aseguramos una buena posición de la placa genital y sus estructuras. Posteriormente, tomando un vidrio cubreobjetos (8mm circular o 8mm cuadrangular) y lo dejamos caer "gentilmente" a una altura de 1cm aprox. sobre el espécimen. Si es necesario se puede eliminar el exceso de alcohol-Triton X utilizando un cotonete y posandolo en varios puntos alrededor del espécimen que ha sido cubierto con el cubreobjetos. Entonces se inicia el proceso de deshidratación.

4. Deshidratación: Una vez posicionado, el vidrio portaobjetos con el espécimen cubierto por el cubreobjetos se coloca a un lado del sitio de trabajo. Una vez ahí, se elimina por completo el exceso de la mezcla alcohol 10%-Triton X con un cotonete y utilizando un gotero tomamos ahora alcohol al 20% e impregnamos el papel Kleenex con el. El Kleenex debe estar saturado por al menos 30 minutos a temperatura ambiente de laboratorio. Posteriormente se elimina el exceso del alcohol al 20% utilizando cotonete y se procede a saturarlo con alcohol al 40%. De esta manera sucesiva se va corriendo el espécimen por el resto de las concentraciones y/o soluciones de alcohol (60%, 80%, 90%, 95% y 100%).

5. Transferencia del espécimen al aceite de clavo: El aceite de clavo debe colocarse en las hendiduras circulares de las porcelanas. Una vez que el espécimen ha estado al menos los 30 minutos en la solución de alcohol al 100% entonces se lleva de nuevo bajo el microscopio y utilizando un palito de bambú con punta de alfiler 00 se desliza suave y lateralmente el cubre objetos hasta dejar libre el espécimen. Entonces, y utilizando el mismo instrumento agudo, se toma el espécimen y se transfiere gentilmente al aceite de clavo. Ahí debe permanecer una noche antes de ser definitivamente montado.

6. Montaje: Un espécimen bajo este proceso, se recomienda montarlo en una solución de aceite de clavo y bálsamo de Canadá la cual constituye el medio de montaje. Las mezclas aceite:bálsamo pueden ser 4:1 o 5:1. Ello depende de que tan suave, flexible y/o viscoso, prefieramos el medio de montaje. Cualquiera de las dos proporciones antes mencionadas proveen un medio bastante flexible y viscoso. Entonces se procede a colocar el portaobjetos bajo el microscopio; se deposita una pequeña gota del medio de montaje preparado (2mm de diámetro) sobre y en el centro del portaobjetos; se procede a tomar el espécimen con uno de los instrumentos de punta aguda y se transfiere gentilmente sobre la gota del medio de montaje. Hecho

esto se reposiciona el espécimen cuidando expandir las alas y antenas, así como las patas posteriores. La consistencia de este medio permite llevar a cabo el reposicionamiento del espécimen. Una vez hecho esto, utilizando las pinzas para montaje, se coloca directamente el cubreobjetos y/o se puede agregar en el centro del cubreobjetos otra pequeña gota de medio y entonces ahora si colocarse sobre el espécimen reposicionado. Finalmente el espécimen ha sido montado y de inmediato se puede observar bajo el microscopio compuesto en un aumento de 10, si la posición de la placa genital muestra sus estructuras plenamente para la identificación correspondiente. Entonces si ello es afirmativo, se dejara descansar el montaje por 3-5 días para que seque el medio y este listo para observarse e identificarse en el microscopio compuesto a aumento de 40X y 100X.

DISCUSION

Todas estas técnicas para himenopteros parasíticos de tamaño pequeño requieren paciencia y tiempo para dominarlas. La experiencia muestra que un individuo interesado en el montaje de *Trichogramas* puede lograr los primeros montajes exitosos en un día trabajando intensivamente. Pues esta técnica resulta por demás mas asimilable que otras propuestas por otros autores.

Pero sobre todo la consistencia en los montajes y la calidad de los mismos obtenidos a través de esta técnica, son comparables a los que se realizan en la Universidad de California por citar un ejemplo.

De esta manera se espera que el "facilitamiento" de montajes de especímenes de *Trichogramma* spp a través de esta técnica, resulte en un mayor número de personas con interés de investigar a este parasitoide, el cual se reproduce muy fácil, pero no se hace un uso eficiente del mismo por la carencia de conocimiento taxonómico a nivel de especie, de lo cual otros aspectos como capacidad de búsqueda y preferencia de hospederos (planta y herbívoro), se derivan.

LITERATURA CITADA

- Platner G.R., Velten R.K., Planoutene M., Pinto J.D. 1998. Slide-mounting techniques for *Trichogramma* (Hymenoptera:Trichogrammatidae) and other minute parasitic Hymenoptera. *Entomological News*. 110(1): p. 56-64
- Ramirez, G.M., 2000. Positioning *Trichogramma* spp (HYMENOPTERA:TRICHOGRAMMATIDAE) SPECIMENS ON MICROSCOPE SLIDES. Memorias del Congreso Nacional de Control Biológico. Sociedad mexicana Control Biológico 2000

