

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HEMOCITOS DE LA HEMBRA DE *Dactylopius coccus* Costa (HEMIPTERA: COCCOIDEA: DACTYLOPIIDAE)

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF HEMOCYTES FROM THE FEMALE *Dactylopius coccus* Costa (HEMIPTERA: COCCOIDEA: DACTYLOPIIDAE)

Sandra Caselín-Castro¹, Celina Llanderal-Cázares¹, Arturo Ramírez-Cruz²,
Marcos Soto Hernández¹ y José T. Méndez-Montiel³

¹Entomología y Acarología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. ²Departamento de Morfología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n. Col. Casco de Sto. Tomás. 11340. México, D. F. ³División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México (scaselin@colpos.mx) (lcelina@colpos.mx) (aramirez@ipn.mx)

RESUMEN

Se determinaron y describieron cuatro tipos de hemocitos en la hembra adulta de *D. coccus*, mediante microscopía de contraste de fases. Se encontraron, en orden de abundancia, granulocitos, plasmotocitos, prohemocitos y oenocitoides. Los granulocitos (promedio, $25.15 \pm 2.97 \mu\text{m}$ anchura y $28.15 \pm 1.94 \mu\text{m}$ longitud), presentaron variación en tamaño y forma, además de granulaciones densas de tamaño variable en el citoplasma; núcleo central y denso, generalmente esférico y en ocasiones lobulado. Los plasmotocitos son células polimórficas de tamaño extremadamente variable (promedio $20.88 \pm 7.93 \mu\text{m}$ anchura y $24.88 \pm 8.32 \mu\text{m}$ longitud), con citoplasma poco denso, con menos granulaciones que los granulocitos y vacuolas abundantes; su núcleo es pequeño y generalmente se encuentra en posición central. Los prohemocitos fueron el tipo más pequeño (diámetro promedio $6.84 \pm 0.05 \mu\text{m}$) y también el más escaso y se distinguen principalmente por su tamaño y forma esférica, y por su núcleo grande y denso que ocupa la mayor parte del citoplasma. Los oenocitoides son ovals ($12 \times 15 \mu\text{m}$), sin granulaciones en el citoplasma y con presencia de un cristal ligeramente excéntrico.

Palabras clave: Ácido carmínico, cochinilla fina, microscopía de contraste de fases.

INTRODUCCIÓN

La importancia de *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae) o cochinilla fina del nopal, se debe a la presencia del ácido carmínico en el insecto, un colorante con diversas aplicaciones en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética (Zhang *et al.*, 2002). Llanderal y Nieto (2001) mencionan que el ácido carmínico se encuentra en todos los estados de desarrollo del insecto y González

ABSTRACT

Four types of hemocytes from adult *D. coccus* females were determined and identified using phase contrast microscopy. In order of abundance we found granulocytes, plasmotocytes, prohemocytes and oenocytoids. Granulocytes (average $25.15 \pm 2.97 \mu\text{m}$ wide and $28.15 \pm 1.94 \mu\text{m}$ long), varied in size and shape, and exhibiting dense granulations of varying size in the cytoplasm; the nucleus is central and dense, generally spherical and occasionally lobulate. Plasmotocytes are polymorphic cells of extremely variable size (average $20.88 \pm 7.93 \mu\text{m}$ wide and $24.88 \pm 8.32 \mu\text{m}$ long), cytoplasm is not dense, granulations are less than in granulocytes, and vacuoles are abundant; nucleus is small and generally central. Prohemocytes were the smallest type (average diameter $6.84 \pm 0.05 \mu\text{m}$), and also the sparsest; they are distinguished mainly by their size and spherical shape and by their large dense nucleus that occupies most of the cytoplasm. The oenocytoids are oval ($12 \times 15 \mu\text{m}$), with no granulations in the cytoplasm, but a slightly eccentric crystal is present.

Key words: Carminic acid, fine cochineal, phase contrast microscopy.

INTRODUCTION

The importance of *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae), or fine cochineal of the prickly pear cactus, is due to the presence of carminic acid in the insect. This dye has different applications in the food, pharmaceutical and cosmetic industries (Zhang *et al.*, 2002). Llanderal and Nieto (2001) found that carminic acid is found in all of the insect's development stages, and González *et al.* (2002) reported that the pigment can be observed in embryos as young as 10 days old. Adult females are the raw material for extraction of the dye (Hernández-Hernández *et al.*, 2005); thus, many studies on the insect's morphology, biology and taxonomy, have

Recibido: Julio, 2007. Aprobado: Marzo, 2008.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 349-355. 2008.

et al. (2002) reportaron que en embriones de 10 d ya se puede observar el pigmento. Las hembras adultas son la materia prima para la extracción del colorante (Hernández-Hernández *et al.*, 2005), por lo que varios estudios de morfología, biología y taxonomía se han efectuado con ese estado de desarrollo. Se ha sugerido que el ácido carmínico ejerce una función biológica importante en *D. coccus*, y que posiblemente interviene en la defensa del insecto contra ciertos depredadores (Eisner *et al.*, 1980; Harborne, 1988).

En los insectos la hemolinfa tiene dos fracciones, el plasma y los hemocitos, responsables de la respuesta inmune humoral y celular (Chapman, 1998; Barraco y Loch, 1991). La respuesta humoral del plasma incluye la producción de péptidos y proteínas antimicrobiales, el sistema profenoloxidasas y la cascada enzimática que regula la melanización y la coagulación de la hemolinfa, así como la producción de reactivos intermedios de oxígeno y nitrógeno (Gillespie *et al.*, 1997; Paskewitz y Gorman, 1999). Los hemocitos asumen funciones de defensa como la fagocitosis, el encapsulado, la nodulación y la coagulación, e intervienen en el metabolismo, síntesis y almacenamiento de nutrientes (Mandato *et al.*, 1997; Howard *et al.*, 1998; Lavine y Strand, 2002).

Joshi y Lambdin (1996) determinaron la estructura de cinco tipos de hemocitos en la cochinilla silvestre *Dactylopius confusus*, especie con un bajo contenido de ácido carmínico y considerada como una plaga del nopal, y establecieron que un granulocito, al que llamaron modificado (M), probablemente participa en la síntesis del ácido carmínico. Aquino *et al.* (2002) reportaron en la hemolinfa de *D. coccus* un tipo de célula al que consideraron un tipo de hemocito y denominaron cromatocito, atribuyéndole funciones de síntesis y almacenamiento de ácido carmínico. Sin embargo, ambas investigaciones carecen de los protocolos indispensables para asegurar la participación de los hemocitos en el almacenamiento o síntesis del pigmento.

Dado que la información es escasa, el objetivo de este trabajo fue determinar y describir los tipos de hemocitos presentes en la hembra adulta de *D. coccus*, considerando sus características morfológicas, para contribuir al conocimiento de estas células. La información está complementada con estudios de microscopía electrónica y técnicas citoquímicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares de *D. coccus* empleados en el estudio fueron identificados mediante las claves De Haro y Claps (1995). Los insectos fueron criados con pencas de nopal (*Opuntia ficus-indica*) infestadas mediante el método de bolsa de tul (Aldama-Aguilera y Llanderal-Cázares, 2003). Las pencas se colocaron verticalmente a

been conducted on this stage of development. It has been suggested that carminic acid has an important biological function in *D. coccus* and that it possibly intervenes in the insect's defense against certain predators (Eisner *et al.*, 1980; Harborne, 1988).

In the insects, the hemolymph has two fractions: the plasma and the hemocytes, which are responsible for cellular and humoral immune response (Chapman, 1988; Barraco and Loch, 1991). Humoral response of the plasma includes production of anti-microbial peptides and proteins, the prophenoloxidase system, and the enzymatic cascade that regulates melanization and coagulation of hemolymph, as well as the production of intermediate reactives from oxygen and nitrogen (Gillespie *et al.*, 1997; Paskewitz and Gorman, 1999). Hemocytes assume defense functions, such as phagocytosis, encapsulation, nodulation and coagulation, and intervene in nutrient metabolism, synthesis and storage (Mandato *et al.*, 1997; Howard *et al.*, 1998; Lavine and Strand, 2002).

Joshi and Lambdin (1996) determined the structure of five types of hemocytes in the wild cochineal insect, *Dactylopius confusus*, a species with low content of carminic acid and considered a pest of the prickly pear. They established that a granulocyte, which they denominated modified (M), probably participates in the synthesis of carminic acid. Aquino *et al.* (2002) reported a type of cell in the hemolymph, which they considered a type of hemocyte and denominated "chromatocyte", to which they attributed functions of carminic acid synthesis and storage. However, both studies lack protocols that are indispensable to assuring that hemocytes participate in storage or synthesis of the pigment.

Because information is scarce, the objective of this study was to determine and describe the types of hemocytes present in the adult *D. coccus* female, considering its morphological characteristics in order to contribute to knowledge of these cells. The information is complemented with electron microscopy and cytochemical techniques.

MATERIALS AND METHODS

The *D. coccus* specimens used in this study were identified with the De Haro and Claps (1995) keys. Insects were reared on prickly pear cladodes (*Opuntia ficus-indica*) infested using the tule bag method (Aldama-Aguilera and Llanderal-Cázares, 2003). The cladodes were hung vertically 1 m above the ground in the greenhouse set up for the purpose of cochineal rearing (Campos-Figueroa and Llanderal-Cázares, 2003) with an average temperature of 20 °C and relative humidity of 70%, located in the installations of the Colegio de Postgraduados, Montecillo, State of México.

To characterize the hemocytes, adult *D. coccus* females were used. Fresh hemolymph for the preparations was obtained by

1 m sobre el nivel del suelo, en el invernadero para cría de grana cochinilla (Campos-Figueroa y Llanderal-Cázares, 2003) con temperatura promedio de 20 °C y 70% de humedad relativa, ubicado en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.

Para caracterizar los hemocitos se usaron hembras adultas de *D. coccus*. La hemolinfa fresca para las preparaciones se obtuvo desprendiendo una de las patas anteriores del insecto, entre el fémur y la tibia, se depositó una gota sobre un portaobjetos y se observó. El material se analizó en la Central de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, con un microscopio Axiophot 1 Zeiss, una cámara digital ZVS-47 D E y el programa de captura KS400 versión 3.01.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se caracterizaron morfológicamente cuatro tipos de hemocitos en la hemolinfa de *D. coccus*. Sus características se describen a continuación:

Granulocitos

Fueron las células más abundantes; presentaron forma esférica, ovalada o alargada; $25.15 \pm 2.97 \mu\text{m}$ de anchura y $28.15 \pm 1.94 \mu\text{m}$ de longitud; su núcleo midió $10.81 \pm 1.09 \mu\text{m}$ de anchura y $13.9 \pm 2.26 \mu\text{m}$ de longitud; la relación núcleo citoplasma fue 0.30. Los granulocitos de *D. coccus* se caracterizaron por abundantes granulaciones de distintos tamaños, distribuidas homogéneamente en el citoplasma (Figura 1A y B). Tanto la forma de las células como las características de los granulaciones coinciden con las encontradas en los granulocitos de *D. confusus* por Joshi y Lambdin (1996) y en otras especies de Hemiptera como *Phenacoccus manihoti* y *Planococcus citri* (Pseudococcidae) (Russo *et al.*, 1994) y en *Rhodnius prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus*, *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* y *Dipetalogaster maximus* (Triatominae) (Azambuja *et al.*, 1991). El tamaño de estos gránulos está relacionado con el estado de desarrollo de la célula y son más grandes y prominentes en los insectos hemimetábolos (Gupta, 1985; Arnold, 1979). Arnold (1974) y Nation (2002) mencionan que las inclusiones en los granulocitos son de mucopolisacáridos y glicoproteínas. En los granulocitos de *D. coccus* el núcleo es pequeño, generalmente central, denso y esférico, aunque en ocasiones se observó parcialmente lobulado o formando grandes paquetes de cromatina (Figura 1B). Lackie (1988) señala que la morfología de estas células puede estar relacionada con su estado de actividad. Los granulocitos se han relacionado en insectos con funciones de respuesta inmune celular como el encapsulado, además del transporte de nutrientes (Gillespie *et al.*, 1997; Lavine y

removing one of the forelegs of the insect between the femur and tibia; a drop of hemolymph from the leg was placed on a slide and observed. The material was observed in the Microscopy Center of the Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, with an Axiophot 1-Zeiss microscope, a ZVS-47 D E digital camera, and KS400 version 3.01 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Four types of hemocytes were characterized morphologically in the hemolymph of *D. coccus*. Their characteristics are described in the following sections.

Granulocytes

Granulocytes were the most abundant cells. They were spherical, oval or elongated, $25.15 \pm 2.97 \mu\text{m}$ wide and $28.15 \pm 1.94 \mu\text{m}$ long; the nucleus measured $10.81 \pm 1.09 \mu\text{m}$ wide and $13.9 \pm 2.26 \mu\text{m}$ long; the nucleus:cytoplasm ratio was 0.30. *D. coccus* granulocytes were characterized by abundant granulations of different sizes distributed uniformly in the cytoplasm (Figure 1A and 1B). Both the shape of the cells and the characteristics of the granulations coincide with those described in *D. confusus* granulocytes by Joshi and Lambdin (1996) and in other Hemiptera species such as *Phenacoccus manihoti* and *Planococcus citri* (Pseudococcidae) (Russo *et al.*, 1994) and in *Rhodnius prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus*, *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* and *Dipetalogaster maximus* (Triatominae) (Azambuja *et al.*, 1991). The size of these granules is related to the development stage of the cell, and they are larger and more prominent in hemimetabolous insects (Gupta, 1985; Arnold, 1979). Arnold (1974) and Nation (2002) state that the inclusions in the granulocytes are mucopolysaccharides and glycoproteins. In *D. coccus* granulocytes the nucleus is small, generally central, dense and spherical, although occasionally it is observed to be partially lobulate or forming large packets of chromatin (Figure 1B). Lackie (1988) points out that the morphology of these cells may be related to their state of activity. Granulocytes have been associated with insects with cellular immune response functions, such as encapsulation, as well as of nutrient transport (Gillespie *et al.*, 1997; Lavine and Strand, 2002). They have also been identified as precursors of other types of hemocytes (Gupta, 1985; Nation, 2002).

Plasmatocytes

Plasmatocytes are less abundant than granulocytes. They are elongated, spherical, irregular in shape,

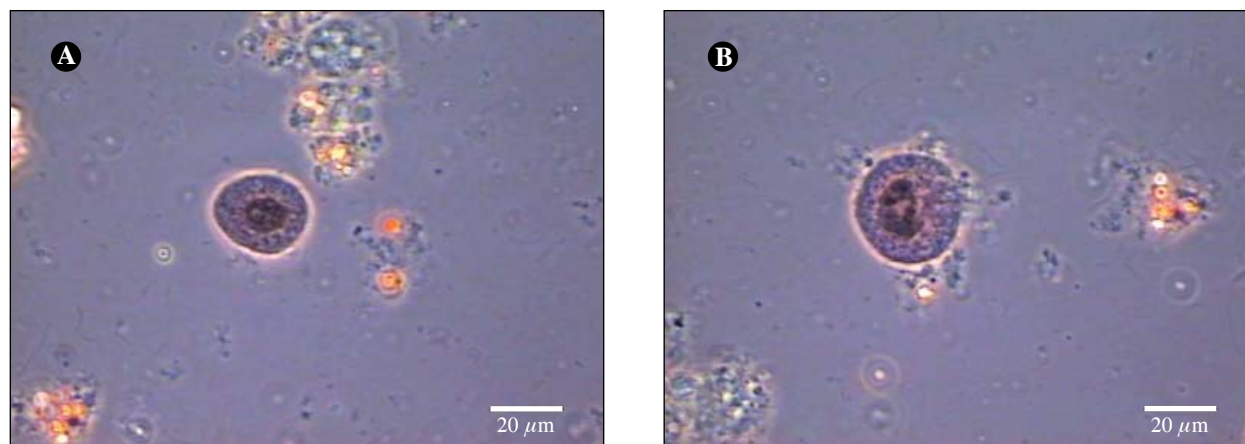


Figura 1A-B. Granulocitos de *Dactylopius coccus* Costa observados con microscopía de contraste de fases (100x). A Granulocito ligeramente oval, con los gránulos del citoplasma distribuidos homogéneamente. B Granulocito en el que se observa su cromatina en forma de grandes lóbulos.

Figure 1A-B. *Dactylopius coccus* Costa granulocytes observed with phase contrast microscopy (100x). A: Slightly oval granulocyte, with cytoplasm granules evenly distributed. B: Granulocyte in which chromatin is observed in the shape of large lobules.

Strand, 2002) y ser precursores de otros tipos de hemocitos (Gupta, 1985; Nation, 2002).

Plasmatocitos

Menos abundantes que los granulocitos, de forma alargada, esférica, irregular o con prolongaciones citoplasmáticas; $20.88 \pm 7.93 \mu\text{m}$ de anchura por $24.88 \pm 8.32 \mu\text{m}$ de longitud, aunque también se observaron plasmatocitos muy pequeños; el núcleo midió $8.81 \pm 1.56 \mu\text{m}$ de anchura y $9.32 \pm 1.42 \mu\text{m}$ de longitud; la relación núcleo citoplasma fue 0.20. El citoplasma fue poco denso, con granulaciones mucho menos abundantes que en los granulocitos (Figura 2A y B). Se observaron además vacuolas citoplasmáticas de tamaño variable, cuya presencia coincide con lo observado en plasmatocitos de *R. prolixus* (Azambuja *et al.*, 1991). El núcleo de los plasmatocitos de *D. coccus* es central y ocasionalmente excéntrico, de forma esférica y con la cromatina difusa, una propiedad que exhiben los plasmatocitos en otros insectos como *Diatraea saccharalis* (Falleiros *et al.*, 2003). En los insectos, los plasmatocitos realizan funciones de fagocitosis, encapsulamiento, nodulación y restauración de heridas (Gupta, 1985; Barracco y Loch, 1991; Chapman, 1998) y están considerados como formas de transición entre los prohemocitos y los granulocitos (Gupta, 1985; Nation, 2002).

Prohemocitos

Estas células fueron muy poco frecuentes en *D. coccus*; su forma fue esférica y su tamaño pequeño: su diámetro fue $6.84 \pm 0.05 \mu\text{m}$ y el del núcleo fue $5.92 \pm 0.66 \mu\text{m}$; la relación núcleo citoplasma fue 0.80

or have cytoplasmic prolongations; $20.88 \pm 7.93 \mu\text{m}$ wide by $24.88 \pm 8.32 \mu\text{m}$ long, although very small plasmatocytes were also observed. The nucleus measured $8.81 \pm 1.56 \mu\text{m}$ wide and $9.32 \pm 1.42 \mu\text{m}$ long; the nucleus:cytoplasm ratio was 0.20. The cytoplasm was not very dense and had much less abundant granulations than the granulocytes (Figure 2A and B). Also cytoplasmic vacuoles of varying size were observed; their presence coincides with observations of *R. prolixus* plasmatocytes (Azambuja *et al.*, 1991). The nucleus of *D. coccus* plasmatocytes is central and occasionally eccentric, spherical in shape with diffuse chromatin, a property exhibited by plasmatocytes in other insects, such as *Diatraea saccharalis* (Falleiros *et al.*, 2003). In insects, plasmatocytes carry out functions of phagocytosis, encapsulation, nodulation and wound healing (Gupta, 1985; Barracco and Loch, 1991; Chapman, 1998) and are considered transition forms between prohemocytes and granulocytes (Gupta, 1985; Nation, 2002).

Prohemocytes

These cells were of very low frequency in *D. coccus*. They were spherical and small with a diameter of $6.84 \pm 0.05 \mu\text{m}$ and that of the nucleus was $5.92 \pm 0.66 \mu\text{m}$. The nucleus:cytoplasm ratio was 0.80 (Figure 3A). The cytoplasm occupies a very small area around the nucleus, which is relatively large and dense. These characteristics coincide with those found in *P. manihoti* prohemocytes (Russo *et al.*, 1994). Prohemocytes are precursors of other types of cells since they have been observed in mitotic division (Azambuja *et al.*, 1991; Chapman, 1998; Nation, 2002).

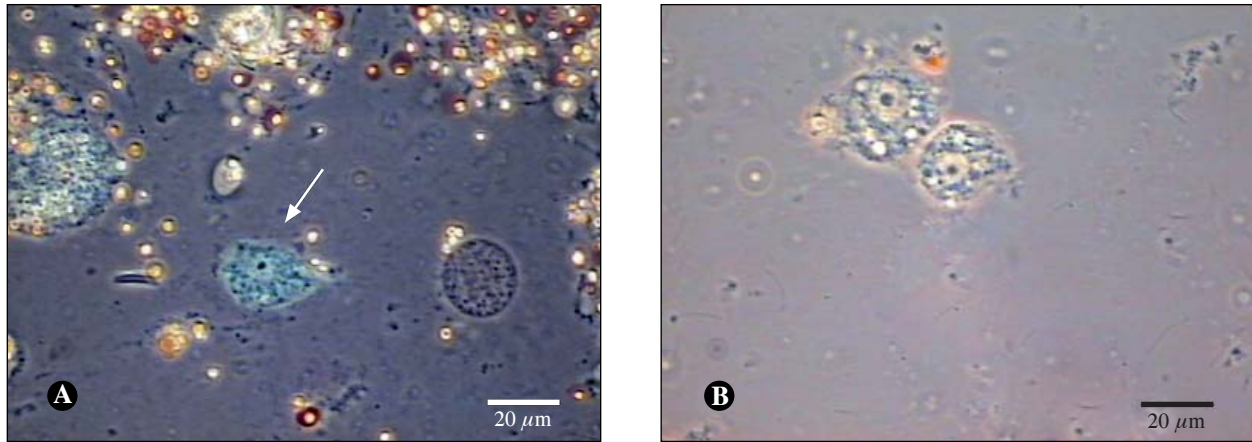


Figura 2A-B. Plasmatocitos de *Dactylopius coccus* Costa observados con microscopía de contraste de fases (100x). A Plasmatocito fusiforme con núcleo ligeramente excéntrico. B Plasmatocitos en los que son evidentes las vacuolas en el citoplasma.
 Figure 2A-B. *Dactylopius coccus* Costa plasmatocytes observed with phase contrast microscopy (100x). A: Fusiform plasmatocyte with slightly exocentric nucleus. B: Plasmatocytes in which vacuoles in the cytoplasm are evident.

(Figura 3A). El citoplasma ocupa un área muy pequeña alrededor del núcleo, el cual es relativamente grande y denso. Estas características coinciden con las halladas en los prohemocitos de *P. manihoti* (Russo *et al.*, 1994). Los prohemocitos son precursoras de otros tipos celulares, ya que se han observado en división mitótica (Azambuja *et al.*, 1991; Chapman, 1998; Nation, 2002).

Oenocitoides

Su forma es oval. Miden $12 \times 15 \mu\text{m}$. Su citoplasma es muy homogéneo y se observó un cristal ligeramente excéntrico (Figura 3B). La forma y la homogeneidad del citoplasma concuerdan con las

Oenocytoids

Oenocytoids are oval, measuring $12 \times 15 \mu\text{m}$. Their cytoplasm is very homogeneous and a slightly eccentric crystal was observed (Figure 3B). The shape and homogeneity of the cytoplasm agrees with the findings of Azambuja *et al.* (1991) in several species of *Rhodnius*. The presence of a crystal in the cytoplasm of these hemocytes was also reported in *D. confusus* (Joshi and Lambdin, 1996). The oenocytoid cells could be involved in preliminary metabolism of phenols for the sclerotization of the cuticle (Gupta, 1985).

Besides the four cell types mentioned, corpuscles of carminic acid were observed in the *D. coccus*

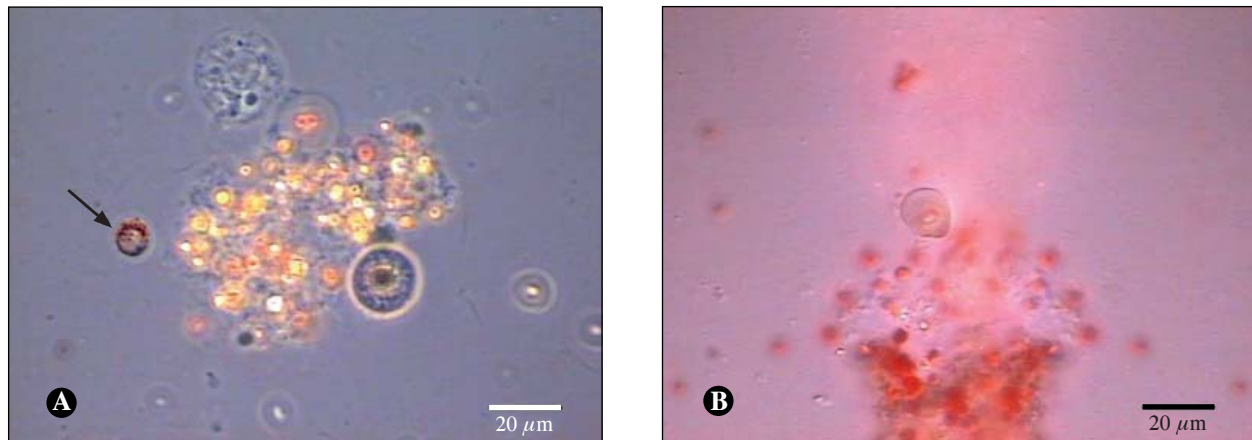


Figura 3A-B. Hemocitos de *Dactylopius coccus* Costa observados con microscopía de contraste de fases (100x). A Prohemocito (→) con el núcleo ocupando casi todo el volumen celular; a la derecha se aprecia un granulocito. B Oenocitoides en el cual es notoria la presencia de un cristal.
 Figure 3A-B. *Dactylopius coccus* Costa hemocytes observed with phase contrast microscopy (100x). A: Prohemocyte (→) with the nucleus occupying almost the entire cell volume; a granulocyte can be seen on the right. B: Oenocytoid in which a crystal is notably present.

encontradas por Azambuja *et al.* (1991) en varias especies de *Rhodnius*. La presencia del cristal en el citoplasma de estos hemocitos también se reporta en *D. confusus* (Joshi y Lambdin, 1996). Las células oenocitoides podrían estar involucradas en el metabolismo preliminar de fenoles para esclerotización de la cutícula (Gupta, 1985).

Además de los cuatro tipos celulares mencionados, en la hemolinfa de *D. coccus* se observaron corpúsculos de ácido carmínico, más pequeños que los cuatro tipos de hemocitos descritos y en ocasiones se aglomeran alrededor de un hemocito, dando la apariencia de ser un núcleo celular (Figura 4A y B). Probablemente este tipo de agrupaciones es el denominado cromatocito por Aquino *et al.* (2002), confundiéndolo con un tipo de hemocito, atribuyéndole funciones de síntesis y almacenamiento de ácido carmínico.

CONCLUSIONES

En la hemolinfa de hembras de *D. coccus* se determinó la presencia de cuatro tipos de hemocitos, y con base en su forma, tamaño y tipo de granulaciones en el citoplasma, fueron identificados como granulocitos, plasmacitos, prohemocitos y oenocitoides, siendo los primeros los más abundantes.

LITERATURA CITADA

- Aldama-Aguilera, C., y C. Llanderal-Cázares. 2003. Grana cochinilla: comparación de métodos de producción en penca cortada. *Agrociencia* 37: 11-19.
- Aquino P., G., N. M. Bárcenas C., y J. Valdez C. 2002. Avances en la citología de la cochinilla del nopal en condiciones *in vivo* e *in vitro* y su biología reproductiva. In: Portillo L., M., y A.

hemolymph; these were smaller than the four hemocyte types described, and occasionally they were seen to agglomerate around a hemocyte, giving it the appearance of being a cell nucleus (Figure 4A and B). It is likely that this type of grouping is what Aquino *et al.* (2002) denominated "chromatocyte", confusing it with a type of hemocyte and attributing it functions of carminic acid synthesis and storage.

CONCLUSIONS

In the hemolymph of *D. coccus* females, four types of hemocytes were determined, and on the basis of their shape, size and type of granulation in the cytoplasm, were identified as granulocytes, plasmacocytes, prohemocytes and oenocytoids, in this order of abundance.

—End of the English version—



- L. Viguera G. (eds). Memoria del II Congreso Internacional de Grana Cochinilla y Colorantes Naturales y II Reunión Internacional del Grupo de Trabajo en Cochinilla, Cactusnet-FAO. Universidad de Guadalajara, México. pp: 3-35.
- Arnold, J. W. 1974. The hemocytes of insects. In: Rockstein, M. (ed). The Physiology of Insecta. 2a. Ed. Academic Press, New York. pp: 201-254.
- Arnold, J. W. 1979. Controversies about hemocyte types in insects. In: Gupta, A. P. (ed). Insect Hemocytes Development, Forms, Functions, and Techniques. Cambridge University Press. Cambridge. pp: 231-258.
- Azambuja, P. de, E. S. García, and N. A. Ratcliffe. 1991. Aspects of classification of *Hemiptera* hemocytes from six

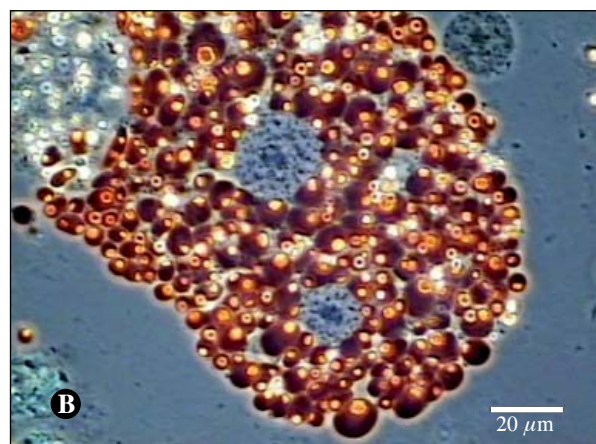
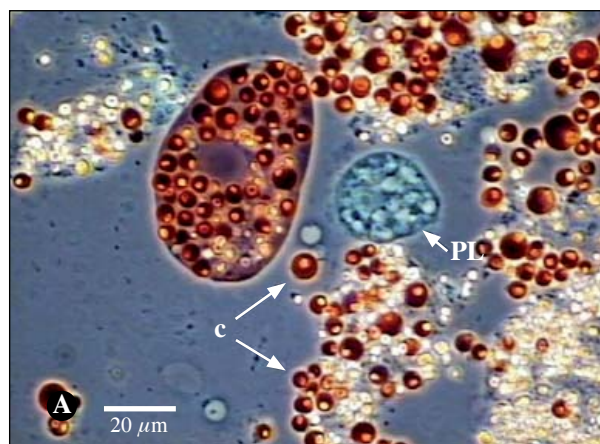


Figura 4A-B. Una muestra de hemolinfa de *D. coccus* vista con microscopía de contraste de fases. A. Conglomerado de corpúsculos de ácido carmínico (ac) y a la derecha un plasmacito (PL). B. Conglomerado de corpúsculos de ácido carmínico alrededor de dos granulocitos.

Figure 4A-B. Sample of *D. coccus* hemolymph viewed with phase contrast microscopy. A: Conglomerate of carminic acid (ac) corpuscles with a plasmacocyte (PL) on the right. B: Conglomerate of carminic acid corpuscles around two granulocytes.

- triatomine species. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro pp: 86: 1-10.
- Barracco, M. A., and C. T. Loch. 1991. Cellular and molecular aspects of insect immunity. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro 86: 23-24.
- Campos-Figueroa, M., y C. Llanderal-Cázares. 2003. Producción de grana cochinilla *Dactylopius coccus* (Homoptera: Dactylopiidae) en invernadero. Agrobiencia 37: 149-155.
- Chapman, R. F. 1998. The Insects Structure and Function. Cambridge University Press. United Kingdom. pp: 94-127.
- De Haro M. E., y L. E. Claps. 1995. Conociendo nuestra fauna III: Familia Dactylopiidae (Insecta: Homoptera): Morfología, biología e importancia económica. Instituto Superior de Entomología INSUE. Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo. Universidad Nacional de Tucumán. Serie Monográfica y Didáctica No. 19. 20 p.
- Eisner, T. S., S. Nowicki, M. Goetz, and J. J. Meinwald. 1980. Red cochineal dye (carminic acid): its role in nature. Science 208: 1039-1042.
- Falleiros, A. M. F., M. T. S. Bombonato, and E. A. Gregório. 2003. Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Braz. Arch. Biol. Tech. 46: 287-294.
- Gillespie, J. P., M. R. Kanost, and T. Trenczek. 1997. Biological mediators of insect immunity. Annu. Rev. Entomol. 42: 611-643.
- González G., M., N. M. Bárcenas O., G. Aquino P., J. M. Valdez C., M. L. Ortega D., e I. Ramírez R. 2002. Cultivo *in vitro* de células embrionarias de cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) a diferentes pH. Rev. Fitot. Mex. 25: 209-212.
- Gupta, A. P. 1985. Cellular elements in the hemolymph. In: Kerkut, G. A., and L. I. Gilbert (eds). Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Pergamon, Press Oxford. pp: 401-451.
- Harborne, J. B. 1988. Introduction to Ecological Biochemistry. 3rd. ed. Academic Press. Great Britain. 356 p.
- Hernández-Hernández, F. de la C., F. García G. de M., I. del Río D., y H. Lanz M. 2005. La cochinilla fina del nopal, colorante mexicano para el mundo. Ciencia 56: 78-86.
- Howard, R. W., J. S. Miller, and D. W. Stanley. 1998. The influence of bacterial species and intensity of infections on nodule formation in insects. J. Insect Physiol. 44: 157-164.
- Joshi, P. A., and P. L. Lambdin. 1996. The ultrastructure of hemocytes in *Dactylopius confusus* (Cockerell), and the role of granulocytes in the synthesis of cochineal dye. Protoplasma 192: 199-216.
- Lackie, A. M. 1988. Haemocyte behaviour. Adv. Insect Physiol. 21: 85-178.
- Lavine, M. D., and M. R. Strand. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem. Mol. Biol. 32: 1295-1309.
- Llanderal C., C., y R. Nieto H. 2001. Características biológicas de la grana cochinilla del nopal (*Dactylopius coccus* Costa). In: Llanderal C., C., y R. Nieto H. (eds). Producción de Grana Cochinilla. Colegio de Postgraduados. México. pp: 23-30.
- Mandato, C. A., W. L. Diehl-Jones, S. J. Moore, and R. G. H. Downer. 1997. The effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on prophenoloxidase activation, phagocytosis and cell spreading in *Galleria melonella*. J. Insect Physiol. 43: 1-8.
- Nation, J. L. 2002. Insect Physiology and Biochemistry. CRC Press. Florida. 485 p.
- Paskewitz, S. M., and M. J. Gorman. 1999. The global status of malaria. Am. Entomologist 45: 81-94.
- Russo, J., M. R. Allo, J. P. Nenon, and M. Brehélin. 1994. The hemocytes of the mealybugs *Phenacoccus manihoti* and *Planococcus citri* (Insecta: Homoptera) and their role in capsule formation. Can. J. Zool. 72: 252-258.
- Zhang, Z., L. Shi, L. Xu, and Z. Wang. 2002. The present research and utilization situation of cochineal insects in the world. For. Res. Beijing 15: 719-726.