



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

CAMPUS SAN LUIS POTOSÍ

POSTGRADO EN
INNOVACIÓN EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

**EFFECTIVIDAD DE TRES GÉNEROS DE HONGOS
ENTOMOPATÓGENOS SOBRE LA COCHINILLA SILVESTRE DEL
NOPAL *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (HEMIPTERA:
DACTYLOPIIDAE)**

CARLOS JESÚS RAMÍREZ SÁNCHEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

Salinas de Hgo., San Luis Potosí, México

Noviembre, 2016

La presente tesis, titulada: **EFFECTIVIDAD DE TRES GÉNEROS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE LA COCHINILLA SILVESTRE DEL NOPAL *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (HEMIPTERA: DACTYLOPHIDAE)**, realizada por el alumno **Carlos Jesús Ramírez Sánchez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada y aceptada por el mismo como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
INNOVACIÓN EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:

Dr. Santiago de Jesús Méndez Gallegos

ASESOR:

Dr. Francisco Javier Morales Flores

ASESOR:

Dr. Jaime Mena Covarrubias

**SALINAS DE HGO., SAN LUIS POTOSÍ
NOVIEMBRE, 2016**

**EFFECTIVIDAD DE TRES GÉNEROS DE HONGOS
ENTOMOPATOGENOS SOBRE LA COCHINILLA SILVESTRE DEL
NOPAL *Dactylopius opuntiae* (Cockerell)
(HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE)**

Carlos Jesús Ramírez Sánchez, MC
Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

La investigación tuvo como finalidad evaluar la efectividad de hongos entomopatógenos sobre la cochinilla silvestre del nopal *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) como una estrategia alternativa de control. El estudio se dividió en dos capítulos principales: en el primero se abordaron aspectos de patogenicidad con el objetivo de determinar la efectividad de hongos sobre la cochinilla. Para ello, se probaron dos aislamientos de cada una de las siguientes especies *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium lecanii*. Con la información recabada en la primera fase, se consideró oportuno evaluar los tres aislamientos que presentaron los mejores resultados sobre la mortalidad de ninfas de cochinilla. Los resultados mostraron que los hongos *M. anisopliae* y *L. lecanii* pueden infectar y ser efectivos contra la cochinilla en condiciones de laboratorio. El aislamiento Ma 130, perteneciente a la especie *M. anisopliae* presentó la mayor virulencia que se determinó por medio de la CL_{50} con un valor de 6.63×10^7 conidios mL^{-1} . Se concluye en que aislamientos de hongos entomopatógenos pueden ser considerados en la integración de planes de manejo de la cochinilla silvestre del nopal.

Palabras clave: Nopal, plaga, control biológico, entomopatógenos.

**EFFECTIVENESS OF THREE ENTOMOPATHOGENIC FUNGI
ON WILD COCHINILLA *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (HEMIPTERA:
DACTYLOPIIDAE)**

Carlos Jesús Ramírez Sánchez, MC
Colegio de Postgraduados, 2016

ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate the effectiveness of entomopathogenic fungi on the wild cochineal *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) as an alternative control strategy. The study was divided into two main chapters: the first dealt with aspects of pathogenicity with the objective of determining the effectiveness of fungi on the cochineal. For this purpose, two isolates of each of the following species *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium lecanii* were tested. With the information collected in the first phase, it was considered opportune to evaluate the three isolates that presented the best results on the mortality of cochineal nymphs. The results showed that the fungi *M. anisopliae* and *L. lecanii* can infect and be effective against the cochineal under laboratory conditions. The isolation Ma 130, belonging to the species *M. anisopliae* presented the highest virulence that was determined by means of the LC50 with a value of 6.63×10^7 conidia mL⁻¹. It is concluded that isolates of entomopathogenic fungi can be considered in the integration of plans of management of wild cochineal.

Key words: Cactus pear, pest, biological control, entomopathogens.

DEDICATORIA

A mis padres, por supuesto.

Todos nos revolcamos en el lodo, pero algunos miramos las estrellas.

O. Wilde

AGRADECIMIENTOS

A mis maestros del Instituto Tecnológico de Ciudad Valles: Dra. Aida, Dr. Peraza, Ing. Carlos Reyes, maestra Anita y especialmente a mi papá académico, Ing. Nacho Morales, a todos ellos gracias por motivarme a estudiar un postgrado.

Agradezco al personal administrativo del ColPos *Campus* San Luis por todas las atenciones mostradas desde que inicié el proceso de inscripción hasta la conclusión de esta empresa.

A mi consejo particular, muchas gracias por su apoyo y su paciencia.

Al Dr. Méndez, muchas gracias por ser un buen consejero.

Agradezco de forma especial a la Dra. Raquel Alatorre Rosas por recibirme en su laboratorio y enseñarme Patología de Insectos.

A la Familia González Alonso de Texcoco, muchas gracias por incluirme en todo. Especialmente a Karina, gracias por tu apoyo pero sobre todo por esas noches de vino y ópera.

A mis compañeros del Laboratorio de Patología de Insectos, muchas gracias por los conocimientos compartidos y por los buenos momentos vividos.

Agradezco a mis amigos de generación todos los recuerdos inolvidables.

Al CONACYT y todos los que lo hacen posible, gracias.

Gracias al grupo “Becarios Conacyt SIN CENSURA” por toda la información compartida y por todas las alegrías brindadas.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
1.1. Origen, distribución y taxonomía de <i>Dactylopius opuntiae</i> (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae)	2
1.2. Descripción morfológica.....	3
1.3. Biología y hábitos	5
1.4. Hospedantes	6
1.5. Daños	6
1.6. Control de <i>Dactylopius opuntiae</i>	7
1.6.1. Control biológico	7
1.6.1.1. Control microbiológico.....	7
1.6.1.2. Hongos entomopatógenos.....	8
1.6.1.2.1. Modo de acción de los hongos entomopatógenos	8
1.6.1.2.2. Efecto de las condiciones ambientales sobre los hongos entomopatógenos.....	10
Temperatura	10
Humedad.....	10
Radiación solar	10
Agroquímicos.....	11
1.7. Hongos seleccionados en la presente investigación.....	11
1.7.1. Descripción de <i>Beauveria bassiana</i>	11
1.7.2. Descripción de <i>Lecanicillium lecanii</i>	12
1.7.3. Descripción de <i>Metarhizium anisopliae</i>	13
1.8. LITERATURA CITADA	15
CAPÍTULO II. PATOGENICIDAD DE <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Lecanicillium lecanii</i> SOBRE NINFAS DE <i>Dactylopius opuntiae</i> (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE) EN CONDICIONES DE LABORATORIO	19
2.1. Resumen.....	19
2.2. Abstract.....	20
2.3. INTRODUCCIÓN	21
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.4.1. Obtención del pie de cría inicial de <i>D. opuntiae</i>	23

2.4.2. Infestación de cladodios	23
2.4.3. Cultivo de hongos empleados.....	24
2.4.4. Evaluación de patogenicidad.....	25
2.4.5. Análisis estadístico	26
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
2.5.1. Patogenicidad	26
2.6. CONCLUSIONES	31
2.7. RECOMENDACIÓN	31
2.8. LITERATURA CITADA	32
CAPÍTULO III. VIRULENCIA DE <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Lecanicillium lecanii</i> SOBRE NINFAS DE SEGUNDO INSTAR DE <i>Dactylopius</i> <i>opuntiae</i> (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE) EN CONDICIONES DE	
LABORATORIO	36
3.1. Resumen.....	36
3.2. Abstract.....	37
3.3. INTRODUCCIÓN	38
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS	40
3.4.1. Pie de cría	40
3.4.2. Cultivo de hongos empleados.....	41
3.4.3. Evaluación de virulencia	42
3.4.4. Análisis estadístico	43
3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
3.6. CONCLUSIONES	52
3.7. LITERATURA CITADA	53
DISCUSIÓN GENERAL.....	56
CONCLUSIONES GENERALES	59
RECOMENDACIÓN.....	60
ANEXOS.....	61

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Distribución de <i>Dactylopius opuntiae</i> en México y el mundo	3
2	Etapas biológicas de <i>Dactylopius opuntiae</i> y su duración en días	5
3	Referencia de hongos empleados en la evaluación de patogenicidad contra <i>Dactylopius opuntiae</i>	25
4	Mortalidad de ninfas de segundo instar de <i>Dactylopius opuntiae</i> tratadas con seis aislamientos de hongos entomopatógenos	28
5	Referencia de los hongos empleados en la evaluación de virulencia sobre ninfas de segundo instar de <i>Dactylopius opuntiae</i>	41
6	Porcentajes de mortalidad observada (\pm E.E.) y corregida empleando la fórmula de Abbott	44
7	CL ₅₀ y CL ₉₅ de tres aislamientos de hongos entomopatógenos sobre ninfas de segundo instar de <i>Dactylopius opuntiae</i>	47
8	Estimación de conidios por cada tratamiento aplicado	48

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Características morfológicas principales de <i>Dactylopius opuntiae</i> (Cockerell).	4
2	Ciclo biológico de hembra y macho de la familia Dactylopiidae. A) Huevo, B) Ninfa I (hembra), C) Ninfa II (Hembra), D) Hembra adulta, E) Ninfa I (Macho), F) Ninfa II (Macho), G) Prepupa, H) Pupa, I) Macho adulto (Tomado de De Haro y Claps, 1995).	5
3	Establecimiento de la micosis en un invertebrado. A) Adhesión de la espora sobre la cutícula, B) Germinación, C) Penetración de la cutícula por medio del tubo germinativo, D) Colonización del hemocele y reacción de las defensas del hospedero (Modificado de Samson <i>et al.</i> , 1988).	9
4	Hongo <i>Beauveria bassiana</i> . A) Conidios, B) Fialides en forma de zigzag, C) Hifas.	12
5	<i>Lecanicillium lecanii</i> . A-B) Fialides verticiladas, C) Conidios (Samson <i>et al.</i> , 1988).	13
6	Figura 6. Hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> . Fialides (izquierda) y conidios (derecha). (Samson <i>et al.</i> , 1988).	14
7	Evaluación de la patogenicidad de tres hongos entomopatógenos sobre <i>Dactylopius opuntiae</i> .	23
8	Mortalidad general por especie de hongos entomopatógenos sobre ninfas de segundo instar de <i>Dactylopius opuntiae</i>	27
9	Porcentaje de mortalidad corregida de <i>Dactylopius opuntiae</i> a diferentes niveles de concentración de conidios de tres aislamientos evaluados.	45
10	Porcentajes de mortalidad de ninfas de segundo instar de <i>Dactylopius opuntiae</i> obtenida a los ocho días después de la aplicación de los tres aislamientos de hongos entomopatógenos en las diferentes concentraciones	46
11	Porcentajes de mortalidad acumulada en el tiempo de tres aislamientos de hongos entomopatógenos sobre ninfas de segundo instar de <i>Dactylopius opuntiae</i> en condiciones de laboratorio	49

INTRODUCCIÓN GENERAL

Por su amplia distribución y disponibilidad el nopal representa un recurso con una gran diversidad de usos, los cuales abarcan ámbitos alimenticios, forrajeros, medicinales, construcción de viviendas, ornamentos, combustibles, colorantes, entre otros. De todos estos usos mencionados, el más importante en México es el alimenticio, seguido por el forrajero.

Actualmente en México, el nopal se cultiva con fines hortícolas o “nopalitos” y para la producción de fruto o “tuna”. En la producción de nopal verdura participan 26 estados, destacando entre ellos, el estado de Morelos, el cual aporta aproximadamente el 40% del total de la producción y el el Distrito Federal con una participación de 35.8% del total. Respecto a la producción de tuna el nopal se cultiva en 17 estados del país, dentro de los cuales Zacatecas es considerado el principal productor aportando alrededor del 38.6% de la producción nacional total, seguido por el Estado de México con un 32.3%. El estado Puebla ha presentado un notable crecimiento durante los últimos años y actualmente ya participa con el 16.2 % del total nacional de tuna (SIAP, 2015).

Una de las principales limitantes a las que se enfrenta la producción de tuna y verdura es la presencia de fitófagos; tan solo en México, actualmente existen alrededor de 15 especies de insectos que reducen la calidad y cantidad de las cosechas, entre los que destacan el barrenador del tronco *Metamasius spionolae*, el escarabajo barrenador o torito *Moneilema spp*, el gusano blanco *Laniifera cyclades*, entre otros. Sin embargo, la cochinilla del nopal *Dactylopius opuntiae* es la principal plaga que limita la producción de nopal tunero a nivel nacional (Mena, 2013).

Los métodos de control de *D. opuntiae* tales como el manejo químico, físico, mecánico, cultural y biológico actualmente empleados, no han conseguido los resultados esperados, por lo que la investigación pretende evaluar el uso de hongos entomopatógenos contra la cochinilla, para generar información que permita minimizar su impacto y reducir los daños económicos mediante su inclusión en los planes de manejo del insecto en México.

CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Origen, distribución y taxonomía de *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae)

La cochinilla silvestre del nopal *Dactylopius opuntiae* es un insecto originario del continente americano y tiene como hospedantes a cactáceas pertenecientes a los géneros *Opuntia* (Rodríguez y Niemeyer, 2000) y *Nopalea* (Chávez-Moreno *et al.*, 2011). Actualmente su distribución geográfica incluye 18 países alrededor del mundo (García *et al.*, 2016) y en México se ubica en 22 (Chavez-Moreno *et al.*, 2011) de los 26 estados donde existe producción de nopal con diferentes fines, lo cual da una idea de su amplia distribución y facilidad de dispersión (Cuadro 1).

D. opuntiae pertenece a la familia Dactylopiidae, la cual contiene solamente al género *Dactylopius*, éste está conformado por nueve especies: *D. coccus* Costa, *D. ceylonicus* (Green), *D. confusus* (Cockerell), *D. opuntiae* (Cockerell), *D. tomentosus* (Lamarck), *D. austrinus* De Lotto, *D. confertus* De Lotto, *D. salmianus* De Lotto y *D. zimmermanni* De Lotto (Chávez-Moreno *et al.*, 2011), aunque recientemente se han incluido otras dos especies más: *D. bassi* (Targioni Tozzetti) y *D. gracilipilus* (Van Dam & May). De acuerdo con Triplehorn y Johnson (2005) actualmente *D. opuntiae* presenta la siguiente clasificación taxonómica:

Phylum Artropoda

Clase Insecta

Orden Hemiptera

Suborden Sternorrhyncha

Superfamilia Coccoidea

Familia Dactylopiidae

Género *Dactylopius*

Especie *Opuntiae*

Cuadro 1. Distribución de *Dactylopius opuntiae* en México y el mundo.

Distribución mundial	Distribución en México
Australia	Aguascalientes
Brasil	Baja California Norte
República de Cabo Verde	Chiapas
Francia	Chihuahua
Hawái (EUA)	Distrito Federal (CDMX)
India	Durango
Israel	Guanajuato
Jamaica	Guerrero
Kenia	Hidalgo
Madagascar	Jalisco
Republica de Mauricio	Estado de México
México	Michoacán
Pakistán	Morelos
Sudáfrica	Nayarit
Sri Lanka	Nuevo León
Estados Unidos de América	Oaxaca
República de Zimbabue	Puebla
	Querétaro
	San Luis Potosí
	Tamaulipas
	Veracruz
	Zacatecas
Fuente: García <i>et al.</i> (2016)	Fuente: Chavez-Moreno <i>et al.</i> (2011)

1.2. Descripción morfológica

1.2.1. Descripción morfológica

De acuerdo con Williams y Watson (1990) la hembra adulta es generalmente de forma ovalada y presenta una secreción blanca que cubre su cuerpo. Muestra lóbulos anales poco desarrollados. Las antenas presentan normalmente 7 segmentos; sin embargo, ocasionalmente puede presentar sólo 6; sus patas son bien desarrolladas y diferenciadas. En la superficie dorsal presenta setas cilíndricas cortas, las cuales pueden variar en tamaño, muestra también poros agrupados (2-4), cada grupo con un ducto tubular, distribuidos en el área media y submedia del tórax. La superficie ventral presenta setas similares a las de la parte dorsal y poros agrupados de igual forma (Figura 1) (Anexo1).



Figura 1. Características morfológicas principales de *Dactylopius opuntiae* (Cockerell).

En el caso de las hembras de cochinilla silvestre *D. opuntiae* presentan una metamorfosis incompleta, con tres estadios biológicos: huevo, ninfa (dos instares) y adulto (Figura 2). Por el contrario los machos presentan una metamorfosis completa (Huevo, ninfa, prepupa, pupa y adulto) (Flores-Hernández *et al.*, 2006).

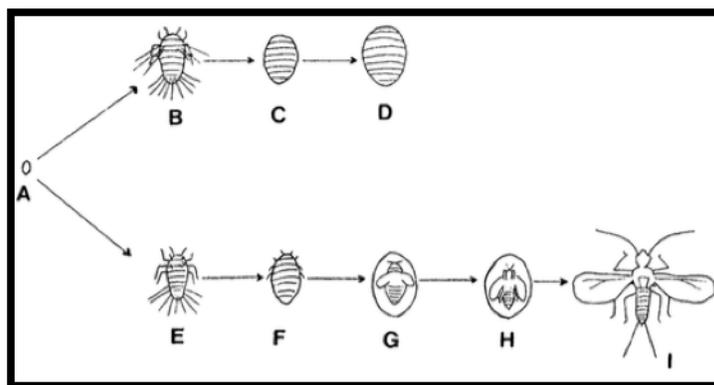


Figura 2. Ciclo biológico de hembra y macho de la familia Dactylopiidae. A) Huevo, B) Ninfa I (hembra), C) Ninfa II (Hembra), D) Hembra adulta, E) Ninfa I (Macho), F) Ninfa II (Macho), G) Prepupa, H) Pupa, I) Macho adulto (Tomado de De Haro y Claps, 1995).

1.3. Biología y hábitos

Los estados biológicos dependen del sexo del insecto; los dos instares ninfales tienen una duración de 18 a 19.8 días. En el caso de los machos, su etapa adulta tiene una duración de 4.18 días; en contraste las hembras presentan una etapa adulta con una duración promedio de 38.42 días, como se muestra en el Cuadro 2. La duración total del ciclo biológico para los machos es un promedio de 43.3 días y en el caso de hembras de 77 días (Romero *et al.*, 2006). Lo anterior puede variar y verse influenciado por las condiciones ambientales como la temperatura (Méndez, 1992). Esta especie presenta un periodo de oviposición estimado de 21 días y puede llegar a ovipositar hasta 131 individuos (Flores-Hernández *et al.*, 2006).

Cuadro 2. Etapas biológicas de *Dactylopius opuntiae* y su duración en días.

Estadio	Machos (días)	Hembras (días)
Ninfa I	19.18	19.80
Ninfa II	19.36	18.07
Adultos	4.18	38.42

Fuente: Romero *et al.* (2006)

Algunas características importantes de cada una de las etapas de desarrollo de la cochinilla silvestre del nopal *D. opuntiae* se resaltan a continuación:

Huevo. Los huevos son color rojo y de forma ovoide.

Ninfa. Las ninfas presenta un color rojo intenso y se cubren de una secreción blanca y filamentos del mismo color (Flores-Hernández *et al.*, 2006).

Adulto. Las hembras son de forma oval, con un largo de aproximadamente 0.2 a 0.25 cm y se encuentran cubierta por una secreción algodonosa; los machos poseen un par de alas y dos filamentos en el extremo del cuerpo y se encuentran cubiertos por un polvo blanquecino sin cubierta algodonosa (Mena y Rosas, 2007; Mena, 2013).

1.4. Hospedantes

Los insectos pertenecientes al género *Dactylopius* son fitófagos en su totalidad y a su vez polípagos de la familia de las cactáceas (De Haro y Claps 1995). Los principales hospedantes de este insecto pertenecen a los géneros *Opuntia* y *Nopalea* y se ha detectado en México un total de 17 especies donde se desarrolla *D. opuntiae*: *Nopalea cochenillifera*, *N. karwinskiana*, *N. sp.*, *O. atropes*, *O. ficus-indica*, *O. jaliscana*, *O. megacantha*, *O. undulata*, *O. robusta*, *O. tomentosa*, *O. vulgaris*, *O. engelmannii*, *O. fuliginosa*, *O. hyptiacantha*, *O. leucotricha*, *O. macdougaliana* y *O. streptacantha* (Chavez-Moreno *et al.*, 2011).

1.5. Daños

Los insectos escamas, como también se les conoce a estos insectos que pertenecen a la superfamilia Coccoidea; son las principales plagas agrícolas y representan un grave problema cuando se introducen en otras regiones del mundo sin la presencia de enemigos naturales (Miller *et al.*, 2005). La principal plaga que afecta la producción de nopal tunero en México es *D. opuntiae*, los daños son ocasionados por la succión de la sabia tanto en los cladodios y frutos, lo que puede causar un desprendimiento de cladodios y un debilitamiento o muerte de la planta; además, disminuye el tamaño y dulzura de frutos, de igual forma, la presencia de este insecto influye en la estética del producto, lo cual repercute en el precio de venta (Mena, 2013).

1.6. Control de *Dactylopius opuntiae*

A pesar de la incidencia y severidad de los daños causados, son pocas las alternativas de control que existen contra *D. opuntiae* (Vanegas-Rico *et al.*, 2010). Respecto al control más común que se lleva a cabo en México, generalmente se emplean insecticidas como malatión, paratión metílico y triclorfon (Badii y Flores, 2001). Sin embargo, existen factores que limitan la efectividad de las aplicaciones de los insecticidas químicos contra este insecto; el traslape de los cladodios interfiere en la llegada de las gotas de la aspersión, el comportamiento del insecto de buscar lugares protegidos dentro de la planta y la protección de las ninfas recién nacidas bajo el cuerpo de la madre, entre otros (Mena, 2013). En la búsqueda de opciones viables para el control de este insecto, se han probado extractos botánicos a base de plantas como *Tagetes erecta*, *T. florida*, *Chenopodium ambrosioides*, *Mentha viridis* y *M. piperita*, los cuales han mostrado altas mortalidades contra el insecto en diferentes estadios en condiciones de laboratorio (Vigueras *et al.*, 2009). Respecto al control biológico (parásitos y depredadores) de *D. opuntiae*, la investigación se ha dirigido a identificar a los enemigos naturales presentes en regiones del centro de México, tales como: *Leucopis bellula*, *Symphorobius barberi*, *S. angustus*, *Laetilia coccidivora*, *Hyperaspis trifurcata*, *Salpingogaster cochenillivorus*, y *Chilocorus cacti* (Vanegas-Rico *et al.*, 2010). Al respecto, se menciona que hembras adultas de *C. cacti* pueden regular o suprimir a *D. opuntiae* cuando las densidades de población son bajas (Flores *et al.*, 2013). Hasta el momento no existen registros de parasitoides que ataquen a *D. opuntiae* (Spodek *et al.*, 2014).

1.6.1. Control biológico

El control biológico se define como el uso de enemigos naturales con la finalidad de suprimir las poblaciones de plagas y con ello reducir el daño asociado a su hospedante (Hajek, 2002). Uno de los objetivos más importantes del empleo de control biológico es la reducción de los niveles de plagas hasta un nivel manejable y económicamente aceptable (Bruckart, 2002).

1.6.1.1. Control microbiológico

Los entomopatógenos son microorganismos que invaden, se multiplican en insectos y se propagan para infectar a otros insectos (Kaya y Vega, 2012). Los patógenos son transmitidos a

los hexápodos por contacto, ingestión, vectores y por los padres a sus descendientes (Tanada y Kaya, 1993). En general se puede considerar que existen cuatro tipos de patógenos de insectos que son: bacterias, virus, hongos y protozoarios (Ansari *et al.*, 2013). *Bacillus thuringiensis* es la bacteria más empleada como entomopatógeno, son principalmente empleadas para el control de larvas de lepidópteros y mosquitos (Senthil-Nathan, 2015). Uno de los virus más empleados en el manejo de insectos es el virus de la poliedrosis nuclear (NPV) el cual es efectivo contra larvas de lepidópteros (Evans y Shapiro, 1997). En el caso de protozoarios, estos son organismos flagelados unicelulares como los pertenecientes al orden tripanosomatida y que infectan principalmente insectos del orden hemiptera y díptera (Undeen y Vávra, 1997). Existe un aproximado de 750 especies de hongos entomopatógenos, los cuales pertenecen principalmente al orden de los entomoftorales e hipocreales y que en su mayoría pertenecen a los géneros *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Hirsutella* e *Isaria* (Liu, 2012). El empleo de microorganismos está tomando importancia, como alternativa al uso de insecticidas químicos, porque el empleo de biopesticidas es el principal componente en la mayoría de los programas de manejo de plagas (Senthil-Nathan, 2015).

1.6.1.2. Hongos entomopatógenos

La mayoría de los entomopatógenos deben de ser ingeridos para causar infección; sin embargo, los hongos entomopatógenos infectan directamente a través de la penetración de la cutícula del insecto, lo que ejerce ventajas sobre otros microorganismos y por tal razón pueden ser empleados con mayores ventajas, contra una amplia clase de insectos plaga (Hajek y Delalibera, 2010).

Las infecciones causadas por hongos entomopatógenos, en ocasiones, son lo suficientemente severas para causar epizootias y con ello pueden llegar a eliminar una población completa de insectos en un hábitat determinado (Herrera y Ulloa, 1998).

1.6.1.2.1. Modo de acción de los hongos entomopatógenos

El primer paso en la infección es la adherencia de la espora del hongo a la cutícula del insecto, si existen condiciones ambientales favorables ésta germina y emite un tubo germinativo el cual puede penetrar la cutícula del insecto (Anexo 4). La penetración de la cutícula es un proceso químico y físico, en el que intervienen enzimas y fuerzas físicas que

deforman las capas cuticulares por efectos de la presión que ejerce el tubo germinativo. Las enzimas que se presentan en este proceso son: proteasas, aminopeptidasas, lipasas, esterases y quitinasas. Las estructuras vegetativas del hongo conocidas como hifas, se desarrollan por medio de gemación en el hemocele del insecto, una vez establecido en éste el hongo evade el sistema inmune del insecto por medio del desarrollo de protoplastos; adicionalmente, forma cuerpos hifales en forma de levadura lo que le permite multiplicarse y dispersarse rápidamente, asimismo, la producción de micotoxinas ayuda a acelerar la muerte del insecto (Tanada y Kaya, 1993), en esta etapa el hongo se desarrolla en forma saprófita. Las hifas del hongo continúan su desarrollo generando la momificación del insecto (Figura 3). La última etapa consiste en la emergencia del micelio del cadáver del insecto (Ansari *et al.*, 2013).

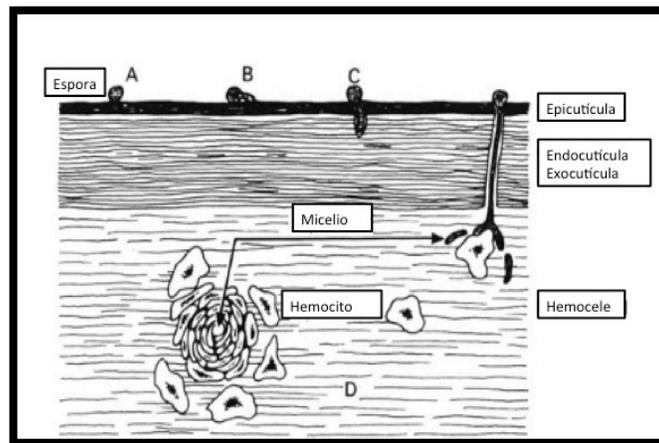


Figura 3. Establecimiento de la micosis en un invertebrado. A) Adhesión de la espora sobre la cutícula, B) Germinación, C) Penetración de la cutícula por medio del tubo germinativo, D) Colonización del hemocele y reacción de las defensas del hospedero (Modificado de Samson *et al.*, 1988).

1.6.1.2.2. Efecto de las condiciones ambientales sobre los hongos entomopatógenos

Una variedad de factores abióticos y bióticos pueden influenciar el proceso de infección de los hongos entomopatógenos. Algunos de los factores más importantes son: temperatura, humedad relativa, radiación solar y el efecto de agroquímicos (Liu, 2012).

Temperatura

La mayoría de los hongos entomopatógenos tienen un amplio límite de tolerancia de temperatura. Sin embargo, la temperatura óptima de infección, crecimiento y esporulación oscila entre los 20-30 °C (Wraight *et al.*, 2007). Las altas temperaturas resultan perjudiciales en la supervivencia del hongo, mientras que las bajas temperaturas pueden forzarlo a producir esporas de resistencia conocidas como “clamidosporas” (Liu, 2012), los límites de temperatura a la cual los hongos pueden sobrevivir e infectar a un hospedante varían dependiendo la especie y aislamiento del hongo.

Humedad

La desecación es una de las principales causas de muerte de las esporas de los hongos en el medio ambiente (Liu, 2012). La germinación y esporulación de los hongos requieren una alta humedad o agua disponible, la mayoría de los hongos entomopatógenos pueden germinar en condiciones que varían entre 40 a 70 % de humedad relativa (Liu, 2012). Se ha demostrado que el desarrollo micelial sobre insectos del hongo *B. bassiana* requiere de 92% de humedad (Vega *et al.*, 2012). Muchos de los fracasos en el empleo de hongos entomopatógenos son atribuidos a las condiciones adversas de humedad tales como la sequía, lo que vale la pena considerar dado que la mayoría de las principales zonas de producción son semiáridas. Sin embargo, existen estudios de hongos entomopatógenos que tienen la capacidad de infectar por abajo del 13% de humedad relativa, como es el caso de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Esta capacidad de operar en condiciones de sequía es atribuido a la presencia de microhabitats en los que el hongo puede permanecer activo (Wraight *et al.*, 2007).

Radiación solar

Todos los propágulos de los hongos son afectados por la radiación solar directa, especialmente la radiación ultravioleta de onda media dentro de los límites de 280-320 nm, la

exposición a esta radiación causa daños en el DNA del hongo y causa altos niveles de mutación (Liu, 2012).

Agroquímicos

Toda clase de agroquímicos (insecticidas, fungicidas, herbicidas y reguladores de crecimiento) presentan un potencial inhibidor de los hongos entomopatógenos. Los compuestos químicos empleados en plaguicidas reducen la actividad de organismos vivos usados como bioinsecticidas, causando mortalidad, bajas tasas de reproducción, reducción de infectividad y cambios en el comportamiento de búsqueda del hospedante (Manachini, 2002). Actualmente, muchos agroquímicos se están formulando para tener compatibilidad con el uso de hongos (Liu, 2012), por ejemplo el insecticida Carbofuran el cual incrementa la efectividad del hongo *B. bassiana* frente algunas plagas (Manachini, 2002).

1.7. Hongos seleccionados en la presente investigación

Los hongos entomopatógenos son los agentes de control con mayor versatilidad y aplicación, comprende un grupo de 100 géneros con aproximadamente 750 especies que afectan a diferentes grupos de insectos. Los más importantes hongos entomopatógenos son: *Metarhizium spp.*, *Beauveria spp.*, *Nomuraea rileyi*, *Verticillium lecanii* e *Hirsutella spp* (Sujeetha y Sahayaraj, 2014). A continuación, se describe de manera breve las principales características, diferencias y posibles comportamientos de tres hongos que serán evaluados en esta investigación.

1.7.1. Descripción de *Beauveria bassiana*

B. bassiana es considerado un hongo filamentoso. Los diversos aislamientos de éste, son altamente adaptables a determinados hospedantes, principalmente, insectos pertenecientes a los órdenes Coleoptera, Lepidoptera y Hemiptera (Tanada y Kaya, 1993). Crece naturalmente en el suelo a través de todo el mundo, ataca a diversas especies de insectos causando la enfermedad conocida como “muscardina blanca”. La colonia de este hongo es color blanco y el micelio aéreo presenta una forma algodonosa (Sujeetha y Sahayaraj, 2014). Las células conidiógenas se presentan en forma de matraz, densamente agrupadas y extensión apical denticulada (zigzag). La forma de los conidios es casi globosa con diámetros $\leq 3.5 \mu\text{m}$ (Humber, 1997) como se observa en la Figura 4.

Clasificación taxonómica de *B. bassiana* (Hajek y Delalibera, 2010).

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Cordycipitaceae

Género: *Beauveria*

Especie: *bassiana*

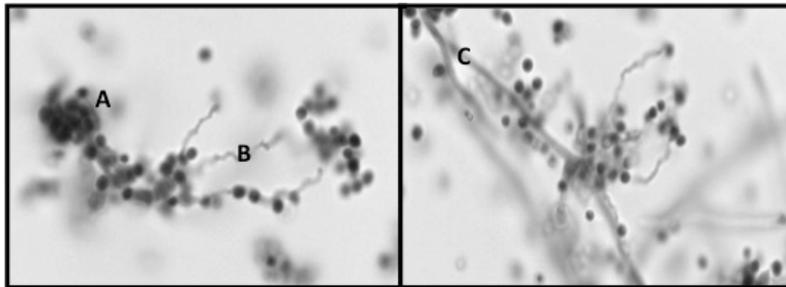


Figura 4. Hongo *Beauveria bassiana*. A) Conidios, B) Fialides en forma de zigzag, C) Hifas.

1.7.2. Descripción de *Lecanicillium lecanii*

Este hongo es conocido por ser patógeno primario de áfidos, escamas, mosca blanca, trips y algunos ácaros. Se le conoce también como el hongo de halo y se caracteriza por la presencia de conidióforos en forma verticilada (Sujeetha y Sahayaraj, 2014). Los verticilios se pueden presentar en agrupaciones de 2 a 6, o bien en forma solitaria (Figura 5). Los conidios son hialinos y aseptados, en forma ovoide, con ápices redondeados y un largo de 2-10 μm (Humber, 1997).

Clasificación taxonómica de *L. lecanii* (Hajek y Delalibera, 2010).

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Cordycipitaceae

Género: *Lecanicillium*

Especie: *lecanii*

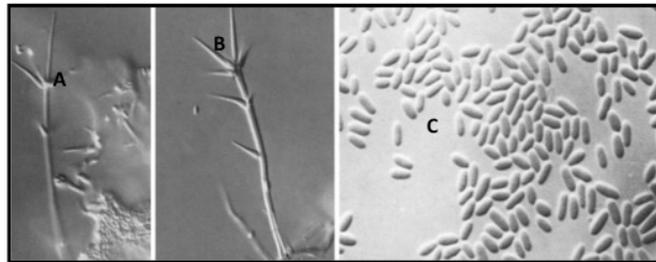


Figura 5. *Lecanicillium lecanii*. A-B) Fialides verticiladas, C) Conidios (Samson *et al.*, 1988).

1.7.3. Descripción de *Metarhizium anisopliae*

M. anisopliae es comúnmente conocido como el hongo de la “muscardina verde”. Es un patógeno de insectos plaga, se encuentra ampliamente distribuido y ha sido detectado en más de 300 hospedantes. Los insectos parasitados por este hongo muestran un micelio aéreo color verde (Sujeetha y Sahayaraj, 2014). Presenta conidióforos agrupados y compactados; en el caso de los conidióforos individuales, éstos crecen ampliamente ramificados en forma de “candelabro”. Los conidios son aseptados, de forma cilíndrica u ovoide y presentan una longitud $\leq 9 \mu\text{m}$ (Humber, 1997) como se muestra en la Figura 6.

Clasificación taxonómica de *M. anisopliae* (Hajek y Delalibera, 2010).

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Clavicipitaceae

Género: *Metarhizium*

Especie: *anisopliae*

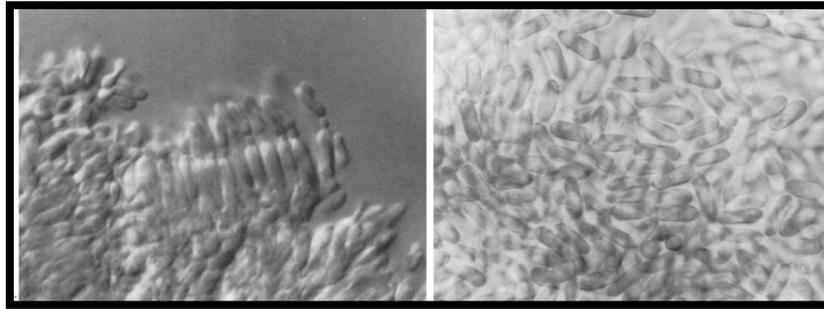


Figura 6. Hongo *Metarhizium anisopliae*. Fialides (izquierda) y conidios (derecha). (Samson *et al.*, 1988).

1.8. LITERATURA CITADA

- Ansari M., S. Ahmad, N. Ahmad, , T. Ahmad and F. Hasan. 2013. Microbial insecticides: food security and human health. In: Malik, A., E. Grohmann and M. Alvis (eds). Management of Microbial Resources in the Environment. Springer Science and BusinessMedia pp:341-360.
- Badii, M. H., and A. E. Flores. 2001. Prickly pear cacti pests and their control in México. Florida Entomologist 84 (4): 503-505.
- Bruckart, W. L. 2002. History of biological controls. In: M. Dekker (ed). Encyclopedia of pest management. Frederick, Maryland, USA. pp. 373-375.
- Chávez-Moreno, C., A. Tecante, A. Casas and L. Claps. 2011. Distribution and habitat in México of *Dactylopius Costa* (Hemiptera: Dactylopiidae) and their cacti host (Cactaceae: Opuntioideae). *Neotropical Entomology* 40 (1) 62-71.
- De Haro, M., and L. Claps. 1995. Conociendo nuestra fauna III: Familia Dactylopiidae (Insecta: Homoptera): Morfología, biología e importancia económica. Serie monográfica y didáctica. Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, UNT. pp 1-19.
- Evans H. and M. Shapiro. 1997. Viruses. In Lacey L. A. (ed). Manual of Techniques in Insect Pathology. Wapato, Washington, USA: ACADEMIC PRESS. pp: 17-53.
- Flores, A., H. Olvera, S. Rodríguez, and J. Barranco. 2013. Predation potential of *Chilocorus cacti* (Coleoptera: Coccinellidae) to the prickly pear cacti pest *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae). *Neotrop Entomol.* 42: 407-411.
- Flores-Hernández, A., B. Murillo-Amador, E. Rueda-Puente, J. Salazar-Torres, J. L. García-Hernández and E. Troyo-Diéguez. 2006. Reproducción de cochinilla silvestre *Dactylopius opuntiae* (Homoptera: Dactylopiidae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* 77: 97-102.
- García, M., B. Denno, D. Miller, G. Miller, Y. Ben-Dov and N. Hardy. 2016. A literature-based model of scale insect biology and systematics. Recuperado de: <http://scalenet.info/catalogue/dactylopius%20opuntiae/> Consultado Marzo 12, 2016.
- Hajek, A. E. 2002. Biological control of insects and mites. In: Dekker M. (ed). Encyclopedia of pest management. Ithaca, New York, USA. 1: 57-60.

- Hajek, A. E., and I. Delalibera. 2010. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. *BioControl* 55: 147-158.
- Herrera, T. y M. Ulloa, 1998. El reino de los hongos. 2ª Ed. Fondo de Cultura Económica-UNAM, México. pp: 386-397.
- Humber, R. A. 1997. Fungi: Identification. *In*: Lacey L. A. (ed). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Wapato, Washington, USA: ACADEMIC PRESS. pp: 153-185.
- Kaya H. K. and F. E. Vega. 2012. Scope and basic principles of insect pathology. *In* H. K. Kaya and F. E. Vega. *Insect Pathology*. Elsevier. pp: 1-12.
- Liu, H. 2012. Microbial control of crop pests using entomopathogenic fungi. *In*: Abrol D. P. and U. Shankar (eds). *Integrated Pest management*. Middletown: CAB International. pp. 237-280
- Manachini, B. 2002. Compatibility of chemical and biological pesticides. *In*: Dekker M. (ed). *Encyclopedia of pest management*. Milan, Italy. pp: 134-137.
- Mena C., J. 2013. Tecnologías de manejo integrado para los insectos plaga del nopal tunero en el Altiplano Mexicano. *In*: Gallegos C., S. J. Méndez, y C. Mondragón (eds). *Producción sustentable de la tuna en San Luis Potosí*. Colegio de Postgraduados-Fundación Produce San Luis Potosí. pp: 127-161.
- Mena C., J. y S. Rosas G. 2007. Guía para el manejo integrado de las plagas del nopal tunero. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Zacatecas. México. Publicación especial 14. pp: 16-18.
- Méndez G., S. de J. 1992. Tasas de supervivencia y reproducción de la grana cochinilla *Dactylopius coccus* (Costa) (Homoptera: Dactylopiidae) a diferentes temperaturas. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Entomología y Acarología, Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México. 70 p
- Miller, D. R., G. L. Miller, G. S. Hodges, and J. A. Davidson. 2005. Introduced scale insects (Hemiptera: Coccoidea) of the United States and their impact on U.S. agriculture. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*. pp: 123-158.
- Rodríguez L., C., and H. M. Niemeyer. 2000. Evidencias indirectas sobre el origen de la cochinilla *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopiidae). *Rev. Chilena Ent.* 27: 85-89.

- Romero B., E., A. Flores, E. Santamaría, J. Salazar, M. Ramírez y A. Pedroza. 2006. Identificación, biología y adaptación de la cochinilla silvestre *Dactylopius opuntiae* (Homoptera: Dactylopiidae) a las condiciones ambientales de Bermejillo, Durango. *Revista Chapingo Zonas Aridas* 5: 41-48.
- Samson, R. A., H. C. Evans, and J. P. Latgé. 1988. *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. New York: Springer-Verlag. pp: 103-129.
- Senthil-Nathan, S. 2015. A review of biopesticides and their mode of action against insect pest. *In: Thangavel, P. and G. Sridevi (ed). Environmental Sustainability*. pp: 49-63.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2015. Consultado 05-12-2015
Recuperado de: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>
- Spodek, M., Y. Ben-Dov, A. Protasov, C. Carvalho and Z. Mendel. 2014. First record of *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera:Coccoidea:Dactylopiidae) from israel. *Phytoparasitica*. 42: 377-379.
- Sujeetha, A. and K. Sahayaraj. 2014. Role of entomopathogenic fungus in pest management. *In: Sahayaraj, K. (ed). Basic and applied aspects of biopesticides*. India. pp. 31-46.
- Tanada, Y. and H. K. Kaya. 1993. *Insect Pathology*. San Diego: Academic Press. pp: 318-387.
- Triplehorn, C. and N. Johnson. 2005. *Introduction to the study of insects*. 7th ed. Belmont, CA, USA: Peter Marshall. pp: 268-332.
- Undeen A. H. and J. Vávra. 1997. Research methods for entomopathogenic protozoa. *In Lacey L. A. (ed). Manual of Techniques in Insect Pathology*. Wapato, Washington, USA: ACADEMIC PRESS. pp: 117-151.
- Vanegas-Rico, J. M., J. R. Lomelí, E. Rodríguez, G. Mora y J. M. Valdez C.. 2010. Enemigos naturales de *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) en *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller en el centro de México. *Acta Zoológica Mexicana* 26 (2): 415-433.
- Vega F., E., N. Meyling, J., J. Luangsa-ard and M. Blackwell. 2012. Fungal Entomopathogens. *In Insect Pathology*. Elsevier Inc. pp: 171-220.
- Vigueras A. L., J. Cibrian and C. Pelayo. 2009. Use of botanicals extracts to control wild cochineal (*Dactylopius opuntiae* Cockerell) on cactus pear. *Acta Horticulturae*. 811: 229-234.

Williams D. J. and G. W. Watson. 1990. *The Scale Insects of the Tropical South Pacific Region*.
London: CAB International Institute of Entomology.

Wright S. P., G. Douglas and M. Goettel. 2007. Fungi. *In*: Lacey L. and H. Kaya (ed). *Field manual of Techniques in invertebrate pathology*. Springer. pp. 223-248.

CAPÍTULO II. PATOGENICIDAD DE *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium lecanii* SOBRE NINFAS DE *Dactylopius opuntiae* (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE) EN CONDICIONES DE LABORATORIO

2.1. Resumen

La cochinilla silvestre del nopal *Dactylopius opuntiae* Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae) es un insecto parásito de cactáceas de los géneros *Opuntia*, *Nopalea* y *Cylindropuntia* que causa severos daños a cladodios y frutos, convirtiéndose así en el principal enemigo fitosanitario de esta planta a nivel nacional e internacional. Existen pocas alternativas de control efectivo para este insecto, donde el químico ha sido el más empleado hasta el momento. Considerando que los hongos entomopatógenos ofrecen una opción en el manejo integrado de plagas, en la investigación se evaluó la patogenicidad de seis aislamientos de hongos (GHA, Bb1, Ma 129, Ma 130, 974, 2009) pertenecientes a tres especies de hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii* (dos aislamientos por cada especie), sobre ninfas de segundo instar de *D. opuntiae* empleando una concentración de 1×10^8 conidios mL^{-1} . La patogenicidad se determinó en base a la mortalidad de ninfas (%) y se evaluó durante ocho días en intervalos de 24 horas. El análisis de los resultados mostró que todos los aislamientos analizados generaron diferente grado de patogenicidad; sin embargo, los aislamientos Ma 130 (51.12%), 974 (38.85%) y Ma 129 (31.58%) pertenecientes a las especies *M. anisopliae*, *L. lecanii* y *M. anisopliae* presentaron mayor efectividad.

Palabras Clave: Cochinilla silvestre, hongos entomopatógenos, control biológico, porcentaje de mortalidad.

2.2. Abstract

Dactylopius opuntiae Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae) is a parasitic insect of cactus species *Opuntia*, *Nopalea* and *Cylindropuntia* that causes severe damages to cladodes and fruits, becoming the main phytosanitary enemy of this plant at national level and international. There are few effective control alternatives for this insect, where the chemical has been the most widely used so far. Considering that the entomopathogenic fungi offer an option in integrated pest management, in the research the pathogenicity of six fungal isolates (GHA, Bb1, Ma 129, Ma 130, 974, 2009) belonging to three species of entomopathogenic fungi *Beauveria Bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Lecanicillium lecanii* (two isolates per species), on second instar nymphs of *D. opuntiae* using a concentration of 1×10^8 conidia mL⁻¹. Pathogenicity was determined on the basis of nymphal mortality (%) and evaluated for eight days at 24 hour intervals. The analysis of the results showed that all the isolates analyzed generated a different degree of pathogenicity; However, the isolates Ma 130 (51.12%), 974 (38.85%) and Ma 129 (31.58%) belonging to the species *M. anisopliae*, *L. lecanii* and *M. anisopliae* were more effective.

Keywords: Wild cochineal, entomopathogenic fungi, biological control, mortality rate.

2.3. INTRODUCCIÓN

Dactylopius opuntiae (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae) es un insecto comúnmente conocido como “cochinilla silvestre del nopal”, es endémico del continente americano y tiene como hospedante natural, cactáceas pertenecientes al género *Opuntia* (Rodríguez y Niemeyer, 2000). Actualmente se encuentra presente en 18 países alrededor del mundo y en México su distribución geográfica comprende de 22 estados (García *et al.*, 2016). *D. opuntiae* es la principal plaga que afecta la producción de nopal tunero en México, los daños son ocasionados por la succión de jugos vasculares en cladodios y frutos, lo que produce debilitamiento, desprendimiento de cladodios y en ocasiones la muerte de la planta; aunado a también reduce el tamaño de los frutos y afecta la dulzura de los mismos. Además, la presencia de este insecto reduce la estética del fruto lo cual tiene efectos negativos en el precio de venta (Mena, 2013).

El control químico y el control cultural son dos alternativas que se emplean para combatir esta plaga. Los insecticidas químicos que son empleados en el manejo de este insecto son: malatión, paratión metílico y triclorfon (Badii y Flores, 2001), aunque, actualmente no existen insecticidas autorizados en México contra esta plaga (Vanegas-Rico *et al.*, 2010). Acciones como el cepillado o barrido mecánico de los cladodios, como medida cultural también se realiza en algunas regiones nopaleras (Mena y Rosas, 2007). Asimismo, se han probado otros métodos como la aspersión con silicio orgánico e inorgánico mezclados con jabones biodegradables, el cual se emplea para el control del insecto en su fase adulta (Mena, 2013). Respecto al control biológico se ha evaluado el potencial de depredación del coccinélido *Chilocorus cacti*, observando que puede suprimir o regular a *D. opuntiae* cuando las densidades de éste último son bajas (Flores *et al.*, 2013).

El uso de biopesticidas, incluyendo aquellos formulados a base de hongos entomopatógenos, están tomando importancia como una alternativa al uso de insecticidas químicos, además de ser parte importante en programas del manejo integrado de plagas (Senthil-Nathan, 2015). La mayoría de los entomopatógenos como virus, bacterias o protozoarios deben ser ingeridos por el hospedero para causar infección; sin embargo, los hongos entomopatógenos infectan directamente a través de la cutícula del insecto (Hajek y Delalibera, 2010) y son los principales microorganismos que causan daño a insectos

chupadores, puesto que éstos no pueden ingerir aquellos patógenos que infectan a través de la pared intestinal (Hajek y Leger, 1994). Existen más de 500 especies de hongos que pueden parasitar insectos, la mayoría de las cuales pertenecen a los géneros: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Verticillium*, *Nomuraea*, *Entomophthora* y *Neozygites* (Shahid *et al.*, 2012). No obstante, a pesar de su importancia existen pocos estudios donde se evalúe hongos entomopatógenos se para el control de insectos del género *Dactylopius*.

La patogenicidad se puede definir como la habilidad que presenta un microorganismo de causar enfermedad y en ocasiones es considerada una capacidad determinada genéticamente, la cual se aplica a grupos o especies de microorganismos (Tanada y Kaya, 1993). Es común que patogenicidad se emplee como sinónimo de virulencia; sin embargo, la patogenicidad es un prerequisite de virulencia; virulencia no se puede medir en un organismo que no es patógeno, por el contrario un organismo virulento puede ser considerado patógeno (Liu, 2012).

La investigación tuvo como finalidad evaluar la patogenicidad de tres especies de hongos entomopatógenos: *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *L. lecanii* sobre ninfas de segundo instar de la cochinilla del nopal *D. opuntiae*.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología de Insectos del Colegio de Postgraduados *Campus* Montecillo, durante el periodo comprendido de agosto 2015 a Diciembre de 2015. En la figura 7 se esquematiza el proceso de evaluación, desde la etapa de recolección en campo hasta el análisis de datos.

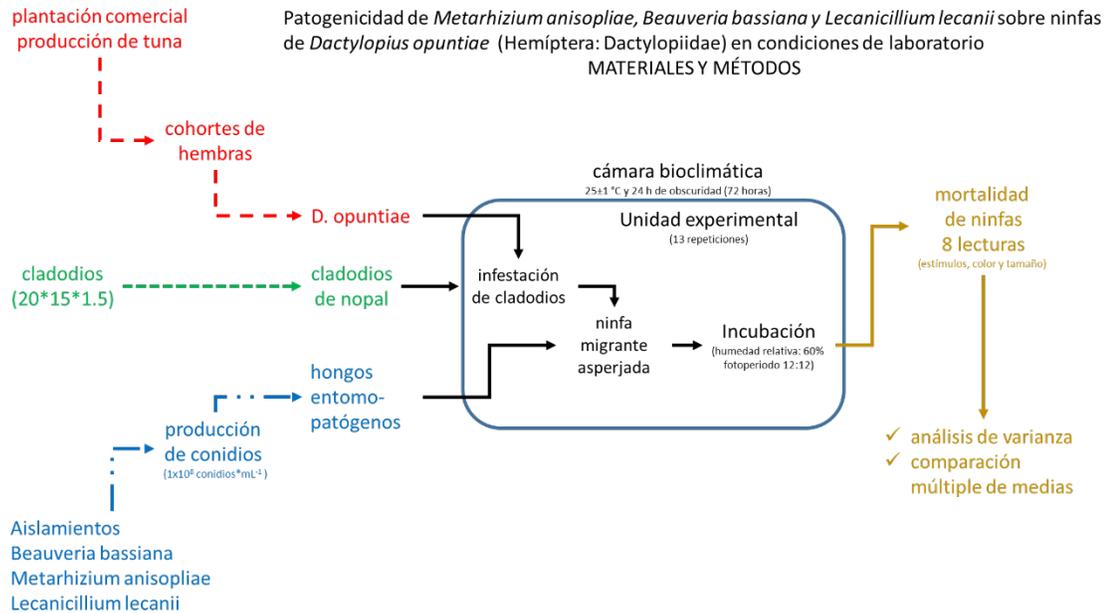


Figura 7. Evaluación de la patogenicidad de tres hongos entomopatógenos sobre *Dactylopius opuntiae*.

2.4.1. Obtención del pie de cría inicial de *D. opuntiae*

El pie de cría inicial del insecto se obtuvo por medio de la recolección de cladodios infestados de *D. opuntiae*, durante el mes de julio de 2015, en una plantación comercial para la producción de tuna, ubicada en la comunidad de Cuautlacingo, municipio de Otumba, Estado de México (Anexo 6). Los cladodios conteniendo colonias de *D. opuntiae* se cortaron y se revisaron cuidadosamente, para evitar la presencia de cualquier enemigo natural; posteriormente, se trasladaron y confinaron en un invernadero del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo (Anexo 6).

2.4.2. Infestación de cladodios

Para obtener cohortes de hembras de la misma edad de *D. opuntiae* los cladodios infestados se mantuvieron en una unidad de cría de acuerdo al método propuesto por Aldama y Llanderal (2003). Para realizar la infestación de los cladodios, las hembras adultas se recolectaron cuidadosamente y se introdujeron en ‘nidos de tul’ considerando las características descritas por Aldama y Llanderal (2003). Los cladodios de nopal *Opuntia ficus-*

indica (L.) Mill. utilizados para el estudio fueron de aproximadamente 20 cm largo, 15 cm ancho, 1.5 cm de grosor. Posteriormente, los cladodios con los nidos se introdujeron en recipientes de plástico transparente cerrados con las siguientes dimensiones: 25x15x5cm (largo, ancho y altura, respectivamente); finalmente, se colocaron en una cámara bioclimática (Thermo SCIENTIFIC) a una temperatura de 25 ± 1 °C y un fotoperiodo de 24 horas de oscuridad, durante un periodo de 72 horas, para asegurar el establecimiento y fijación de la ninfa migrante. Una vez obtenidas ninfas sésiles se realizaron cortes cuadrados en los cladodios con áreas de 25 cm^2 , en los que se contabilizó un total de 30 ninfas con la ayuda de un contador manual (PRETUL® CON-10M) y empleando un microscopio estereoscópico (SWIFT® 05001025). Cada unidad cuadrada se colocó en vasos desechables transparentes cilíndricos de 6x4 cm (diámetro y altura, respectivamente) (REYMA® No. 4A). Se establecieron 13 unidades experimentales por cada repetición.

2.4.3. Cultivo de hongos empleados

Se emplearon los siguientes aislamientos: *Beauveria bassiana* (GHA, Bb1), *Metarhizium anisopliae* (Ma129, Ma130) y *Lecanicillium lecanii* (974, 2009), todos cultivos monospóricos provenientes de la colección de hongos entomopatógenos del Laboratorio de Patología de Insectos del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados (Cuadro 3). La producción de conidios se realizó mediante el cultivo en superficie de medio sólido (Butt y Goettel, 2000) empleando Agar Dextrosa Sabouraud (BD Bioxon, México) en la siguiente proporción: Dextrosa 40 g, peptona de carne 5 g, peptona de caseína 5 g y agar 15 g. Este se esterilizó previamente, mediante autoclave, y se transfirió a cajas Petri de Poliestireno estériles (KLINICUS®) de 90x15 mm. Para la obtención de conidios se incubaron las cajas por espacio de tres semanas a una temperatura de 25 ± 1 °C con un fotoperiodo de 24 horas de oscuridad. La extracción de conidios se realizó por medio de raspado de la superficie y fueron suspendidos en solución Tween 80 al 0.03%. La cuantificación de conidios se realizó por medio de una cámara de Neubauer de acuerdo al método propuesto por Goettel y Douglas (1997).

Cuadro 3. Referencia de hongos empleados en la evaluación de patogenicidad contra *Dactylopius opuntiae*.

Especie	Clave	Insecto hospedante	Localidad
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb1	Hymenóptera	Jalisco, Mex.
<i>Beauveria bassiana</i>	GHA	Mycotrol®	EUA
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Ma 129	<i>Tetranychus urticae</i>	Tecomán, Colima, México
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Ma 130	<i>Tetranychus urticae</i>	Tecomán, Colima, México
<i>Lecanicillium lecanii</i>	*ARSEF 2009	<i>Toxoptera citricida</i>	Tucumán, Argentina
<i>Lecanicillium lecanii</i>	*ARSEF 974	Áfidos	Venezuela

*Aislamientos con el prefijo ARSEF, pertenecen a la colección de aislamientos de Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, EUA.

2.4.4. Evaluación de patogenicidad

Para evaluar la patogenicidad de las diferentes cepas sobre *D. opuntiae*, los cortes de nopal conteniendo insectos de segundo instar ninfal se colocaron dentro de vasos desechables transparentes, y se asperjaron con suspensiones de conidios de los seis aislamientos pertenecientes a tres especies de hongos entomopatógenos (GHA, Bb1, Ma129, Ma130, 974 y 2009). Se aplicó una sola dosis de 1×10^8 conidios mL^{-1} suspendidos en solución Tween 80 al 0.03%, más un control tratado solamente con solución Tween 80 al 0.03%. Las atomizaciones se realizaron en una torre de aspersión con las siguientes dimensiones: cilindro de acrílico de 30 cm de diámetro, y una altura de 50 cm, el cual presentó una inclinación de 45° a los 30 cm de altura. Todos los tratamientos se sometieron a una presión de 10 psi (Anexo 3). El uso de la torre de aspersión se realizó considerando el método empleado por Castillo (2016). Luego de

la aspersión, las unidades experimentales tratadas fueron colocadas en recipientes de plástico transparente (Baat, 2004) con una humedad relativa de 60% y un fotoperiodo 12:12 (Luz: oscuridad) a una temperatura de 26 ± 1 °C.

La mortalidad de las ninfas se evaluó durante 192 horas en intervalos de 24 horas después de la aspersión. Asimismo, cada 24 horas se realizó la extracción y cuantificación de insectos muertos y cada uno se colocó en una cámara húmeda para acelerar la esporulación del hongo y así poder confirmar la infección del insecto (Butt y Goettel, 2000). Los criterios empleados para determinar la mortalidad consistieron en evaluar su respuesta a estímulos mecánicos, considerando muertos aquellos insectos que no reaccionaban al estímulo (Pereira *et al.*, 2011); además, se consideró el cambio de coloración y la reducción en tamaño del insecto. De igual forma se realizó toma de fotografías de los insectos infectados por medio del software Leica Microsystems (Anexo 5).

2.4.5. Análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar, con seis tratamientos más un control, tres replicas en el tiempo y dos pseudo-replicas cada uno. En cada uno de los tratamientos se tuvieron dos repeticiones, teniendo así 12 unidades, más un control. Se realizó un análisis de varianza empleando el programa Statistical Analysis System (SAS Institute, 2012) y una comparación múltiple de medias de tratamientos mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los porcentajes de mortalidad de ninfas se transformaron por medio de $\arcsen(\sqrt{x/100})$ previo al análisis de varianza (Castillo, 2007).

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1. Patogenicidad

La eficiencia de tres especies de tres géneros distintos de hongos entomopatógenos fue evaluada sobre ninfas de segundo instar de la cochinilla del nopal (*D. opuntiae*), empleando dos aislamientos diferentes de cada especie de hongo. Muy pocas evaluaciones de hongos entomopatógenos se han realizado sobre insectos del género *Dactylopius*. Los resultados del estudio demostraron que la especie de hongo que presentó la mayor mortalidad general de

ninfas de segundo instar fue *Metarhizium anisopliae* con 41.39%, seguido por la especie *Lecanicillium lecanii* (Anexo 2) la cual de manera global mostró una mortalidad de 34.45%; por el contrario la especie que generó la mortalidad más baja fue *Beauveria bassiana* con solamente 19.72% (Figura 8). Al probar *M. anisopliae* y *B. bassiana* Silva *et al.* (s/f) observaron que este último registró los mejores resultados sobre ninfas de *D. opuntiae*, resaltando además que la combinación de ambas especies podría mejorar su respuesta. Al respecto, Liu (2012) menciona que las especies de hongos tienen numerosos aislamientos que difieren significativamente en virulencia y patogenicidad. En otros estudios relacionados se registró virulencia de *M. anisopliae* contra el piojo harinoso (*Pseudococcus viburni*) (Hemiptera: Pseudococcidae) y se determinó que la dosis letal media (DL₅₀) fue de 7.3×10^6 conidios mL⁻¹ en ninfas de segundo instar, en condiciones de laboratorio (Pereira *et al.*, 2011). Una dosis similar a la empleada en esta investigación, también se utilizó con *B. bassiana* para el control de *Matamasius spinoleae* otra plaga importante de *Opuntia* en México registrando valores de mortalidad de 85% (Tafuya *et al.*, 2004).

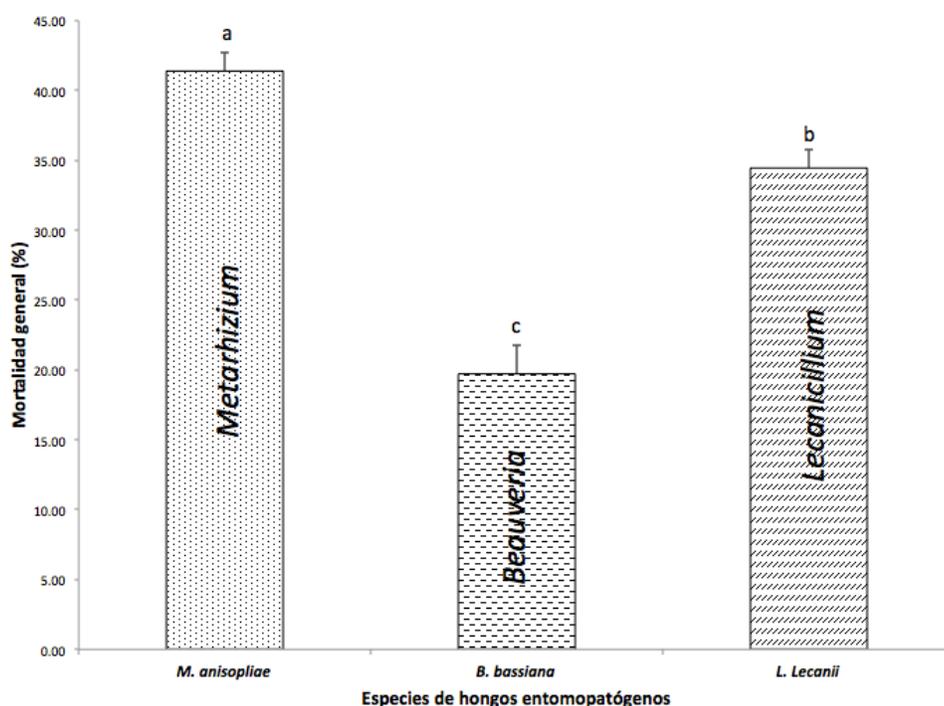


Figura 8. Mortalidad general por especie de hongos entomopatógenos sobre ninfas de segundo instar de *Dactylopius opuntiae*.

Cuando se evaluó la efectividad por cepa de cada hongo entomopatógeno en estudio, el tratamiento que obtuvo la mortalidad más alta fue la especie de *M. anisopliae* con el aislamiento Ma130, el cual registró una mortalidad de 51.12%, seguido por el aislamiento 974 del hongo *L. lecanii* con 38.85% de mortalidad. Los tratamientos Ma129 y 2009 pertenecientes a las especies *M. anisopliae* y *L. lecanii*, resultaron estadísticamente similares con 31.58 y 29.98%, respectivamente. Por otro lado, los tratamientos que presentaron menor efectividad fueron los pertenecientes a la especie *B. bassiana*, donde el aislamiento GHA generó una mortalidad de 22.69 % y la menor efectividad se registró en el aislamiento Bb1 con sólo 16.56 % de mortalidad (Cuadro 4). El experimento registró una mortalidad menor al 10% en el testigo, lo cual lo hace aceptable y manifiesta que el protocolo de inoculación de los hongos entomopatógenos resultó efectivo respecto a la inocuidad.

Cuadro 4. Mortalidad de ninfas de segundo instar de *Dactylopius opuntiae* tratadas con seis aislamientos de hongos entomopatógenos.

Especie	Cepas	Mortalidad (%) (EE*)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Ma 130	51.12 ± 2.04 ^a
<i>Lecanicillium lecanii</i>	974	38.85 ± 1.64 ^b
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Ma 129	31.58 ± 2.06 ^c
<i>Lecanicillium lecanii</i>	2009	29.98 ± 0.85 ^c
<i>Beauveria bassiana</i>	GHA	22.69 ± 1.33 ^{d**}
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb1	16.56 ± 1.21 ^e
Control	Control	8.81 ± 0.7 ^f

** Distintas letras indican diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey (P≤0.05).

EE: error estándar.

El análisis de los resultados de las seis cepas (GHA, Bb1, Ma 129, Ma130, 974 y 2009) tratadas a una sola concentración (1×10^8 conidios mL^{-1}) mostró que todos los aislamientos presentan patogenicidad contra la cochinilla del nopal *D. opuntiae*. Los datos muestran que existen diferencias estadísticamente diferentes incluso en aislamientos pertenecientes a la misma especie, ésta diferenciación puede deberse al tipo de factores de virulencia propia de cada aislamiento, así como a la influencia que ejerce el tipo de hospedante del cual fue obtenido previo a su aislamiento. Sin embargo, los hongos que mayor efectividad presentaron son *M. anisopliae* y *L. lecanii* en los seis aislamientos probados en el bioensayo.

El hongo más patogénico resultó *M. anisopliae* aislamiento Ma 130, tal resultado se puede atribuir a que ésta especie de hongo tiene la cualidad de infectar insectos y ácaros de cuerpo blando como *Tetranychus urticae* (Mugisho *et al.* 2015), además el tamaño del conidio del hongo respecto al cuerpo de la ninfa de *D. opuntiae* puede tener influencia en la mortalidad, puesto que el área de contacto con el insecto es mayor en *M. anisopliae*, ya que presenta conidios más grandes, en comparación con las especies de *B. bassiana* y *L. lecanii* (Humber, 1997).

Por su parte, Santos *et al.* (2011) al evaluar el efecto del hongo *B. bassiana* mezclado con agentes protectores sobre ninfas de primer instar de *D. opuntiae*, observaron que al incluir un protector solar (Oxybenzone[®]) en la formulación del hongo, se obtienen valores de mortalidad de 46.5%. Lo anterior difiere con lo registrado en el presente estudio donde la mortalidad por el hongo *B. bassiana* obtuvo una mortalidad máxima de 22.69 % con la cepa GHA. La tendencia anterior puede estar asociada al hecho de que el protector solar puede acentuar su efecto en la mortalidad, al ser combinado con el hongo. Vale la pena resaltar que de manera natural *D. opuntiae* presenta una alta tasa de mortalidad natural en el primer instar ninfal (Romero *et al.*, 2006) siendo esta fase la más susceptible, debido a la falta de protección que les proporciona la capa cerosa de la cual carecen (Méndez-Gallegos *et al.*, 1993). Por lo anterior, la mortalidad más alta obtenida por Santos *et al.* (2011) puede estar relacionada a que se realizaron los bioensayos con ninfas de primer instar, por lo que es posible que las aplicaciones tengan un mayor impacto; mientras que en ésta investigación se aplicaron en ninfas de mayor edad (ninfas de segundo instar), las cuales presentan una mayor cantidad de filamentos cerosos que las ninfas de primer instar, que interfieren en el contacto del hongo con

el cuerpo de la cochinilla. Al respecto, Vigueras *et al.* (2009) señala que al degradar la cubierta cerosa la mortalidad puede llegar hasta 35% en ninfas de primer instar. Una de las grandes ventajas que se tiene al emplear entomopatógenos es que se puede combinar con algunos extractos vegetales en las estrategias de manejo del insecto. Da Silva *et al.* (2016) observaron que cuando se combina *Fusarium incarnatum-equiseti* y extractos acuosos de *Ricinus communis* pueden llegar a causar hasta un 100% de mortalidad en *D. opuntiae*, aunque también los bioensayos fueron aplicados a ninfas y no adultos.

En bioensayos realizados sobre escamas *Phoenicococcus marlatti*, se ha observado que el hongo *B. bassiana* no llega a parasitar el insecto (Asensio *et al.*, 2005). Pocos patógenos se han registrado de forma natural para el caso de insectos escamas y probablemente los hongos de mayor importancia contra estos insectos sean los pertenecientes al género *Lecanicillium* (Liu *et al.*, 2009). En el caso del hongo *L. lecanii* se han realizado investigaciones de patogenicidad sobre insectos escama pertenecientes a la familia Matsucoccidae obteniendo mortalidades de 61.33% en ninfas de segundo instar ninfal a una concentración de 1×10^7 conidios mL⁻¹ (Liu *et al.*, 2014). En el presente estudio las mortalidades obtenidas con este hongo causaron valores de mortalidad entre 29.98 y 38.85% para los aislamientos 2009 y 974, respectivamente.

Por su parte, Jin-Hua *et al.* (2014) aislaron, identificaron y evaluaron la patogenicidad del hongo *Fusarium incarnatum-equiseti* que infecta de forma natural a la escama blanda *Coccus hesperidum* registrando el primer reporte del género *Fusarium* sobre este insecto, lo que infiere que este hongo podría presentar patogenicidad sobre otros insectos escama. Este potencial se ha probado recientemente con buenos resultados en estudios de laboratorio, en combinación con extractos vegetales, para el control de *D. opuntiae* en Brasil (Da Silva *et al.*, 2016).

La estrategia de control de la cochinilla del nopal puede ser una alternativa integrada por diversas opciones tales como el uso de enemigos naturales (Vanegas-Rico *et al.*, 2010), el empleo de extractos botánicos (Vigueras *et al.*, 2009) y aceites esenciales (Vázquez-García *et al.*, 2011), control cultural por medio de barrido mecánico de las colonias del insecto (Mena y Rosas, 2007) y control físico por medio de silicio orgánico e inorgánico (Mena, 2013); por lo que de acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación es posible que el uso de

hongos entomopatógenos pueda ser también considerado en un programa de manejo integrado de esta plaga.

2.6. CONCLUSIONES

- ✓ *M. anisopliae* aislamiento Ma 130 registró el mayor grado de mortalidad en condiciones de laboratorio.
- ✓ Se confirma que existen diferencias en la patogenicidad de las diferentes cepas probadas, aún dentro de una misma especie de hongo entomopatógeno.
- ✓ Los seis aislamientos de los hongos entomopatógenos evaluados en esta investigación presentaron patogenicidad a una concentración de 1×10^8 conidios mL^{-1} contra la cochinilla del nopal *D. opuntiae*.

2.7. RECOMENDACIÓN

Se sugiere generar más información respecto a otros productos que ayuden a degradar la capa cerosa de la cochinilla. También se recomienda generar más información relacionada con efectos sobre los depredadores, posibles métodos de aplicación y el empleo de protectores de los hongos contra factores ambientales, así como del empleo de surfactantes. Asimismo, es necesario realizar bioensayos en todas las etapas del insecto y enfatizar en la etapa adulta dado que es lo más habitual de encontrar en condiciones de campo.

2.8. LITERATURA CITADA

- Aldama, C., y C. Llanderal. 2003. Grana cochinilla: comparación de métodos de producción en penca cortada. *Agrociencia* 37: 11-19.
- Asensio, L., L. Lopez-Llorca and J. López-Jiménez. 2005. Use of light, scanning electron microscopy and bioassays to evaluate parasitism by entomopathogenic fungi of the red scale insect of palms (*Pheenicococcus marlatti* CKLL., 1899). *Micron*. 36:169-175.
- Baat, E. 2004. Quality control of the fungal products. MYCO-SPA WORKSHOP 2004. KOPPERT BIOLOGICAL SYSTEMS.
- Badii, M. H., and A. E. Flores. 2001. Prickly pear cacti pests and their control in México. *Florida Entomologist* 84(4):503-505.
- Butt, T. M. and M. S. Goettel. 2000. Bioassays of entomogenous fungi. *In*: A. Navon, and K. R. Ascher (eds). *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. Bet Dagan, Israel: CABI Publishing. pp: 141-195.
- Castillo M., L. E. 2007. Introducción al SAS para Windows. Texcoco: Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. pp:295.
- Castillo, O. 2016. Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos asociados a *Brevipalpus sp.* presente en arandano en Ciudad Guzmán, Jalisco. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, Parasitología Agrícola, Texcoco de Mora, Estado de México. pp: 21-22.
- Da Silva S. A.C., O. Soares R. L., A. F. Da Costa, T. P. Vieira and N.T. de Oliveira. 2016. Controlling *Dactylopius opuntiae* with *Fusarium incarnatum–equiseti* species complex and extracts of *Ricinus communis* and *Poincianella pyramidalis*. *J. Pest Sci.* 89(2): 539-547.
- Flores A., H. Olvera, S. Rodríguez and J. Barranco. 2013. Predation potential of *Chilocorus cacti* (Coleoptera: Coccinellidae) to the prickly pear cacti pest *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae). *Neotrop Entomol.* 42(4):407-411.

- García M., B. Denno, D. Miller, G. Miller, Y. Ben-Dov and N. Hardy. 2016. A literature-based model of scale insect biology and systematics. Recuperado de: Scalenet: <http://scalenet.info/catalogue/dactylopius%20opuntiae/> Consultado Marzo 12, 2016.
- Goettel, M. S., and G. Douglas. 1997. Fungi: Hyphomycetes. *In*: L. A. Lacey (ed). Manual of techniques in insect pathology. Wapato, USA: Academic Press. pp: 213-249.
- Hajek, A. E. and R. J. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39:293-322.
- Hajek, A. E. and I. Delalibera. 2010. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. *BioControl* 55(1):147-158.
- Humber, R. A. 1997. Fungi: Identification. *In*: Lacey L. A. (ed). Manual of Techniques in Insect Pathology. Wapato, Washington, USA: ACADEMIC PRESS. pp: 153-185.
- Jin-Hua, F., X. Ying-Ping, X. Jiao-Liang, Q. Xiong, J. Wei-Jia, Z. Yong-Jie, Zhu-Mei Ren. 2014. The strain HEB01 of *Fusarium sp.*, a new pathogen that infects brown soft scale. *Ann Microbiol.* 64(1):333-341.
- Liu, H. 2012. Microbial Control of Crop Pests using Entomopathogenic Fungi. *In*: D. P. Abrol and U. Shankar (eds). Integrated Pest management Middletown: CAB International. pp: 237-280.
- Liu W., Y. Xie , J. Dong, J. Xue, Y. Zhang, Y. Lu and J. Wu. 2014. Pathogenicity of three entomopathogenic fungi to *Matsucoccus matsumurae*. *PLOS ONE* 9:1-9.
- Liu W., Y. Xie, J. Xue, Y. Gao, Y. Zhang, X. Zhang and J. Tan. 2009. Histopathological changes of *Ceroplastes japonicus* infected by *Lecanicillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 101(2): 96-105.
- Mena C., J. 2013. Tecnologías de manejo integrado para los insectos plaga del nopal tunero en el Altiplano Mexicano. *In*: Gallegos C., S. J. Méndez y C. Mondragón (eds). Producción sustentable de la tuna en San Luis Potosí. Colegio de Postgraduados-Fundación Produce San Luis Potosí. pp: 127-161.
- Mena C., J. y S. Rosas G. 2007. Guía para el manejo integrado de las plagas del nopal tunero. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Zacatecas. México. Publicación especial 14:16-18.

- Méndez-Gallegos, S., J. Vera-Graziano, H. Bravo-Mojica and J. López-Collado. 1993. Tasas de supervivencia y reproducción de la grana cochinilla *Dactylopius coccus* (Homoptera: Dactylopiidae) a diferentes temperaturas. *Agrociencia* 4(1): 7-22.
- Mugisho B. D., M. Knapp, S. Ekesi, A. Chabi-Olaye, H. Iddi and N. Kalemba. 2015. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* in controlling the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* on common bean in screenhouse and field experiments. *Insect Science* 22: 121-128.
- Pereira, A., P. Casals, A. M. Salazar and M. Gerding. 2011. Virulence and pre-letal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* on *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Chilean Journal of Agricultural Research* 71(4):554-558.
- Rodríguez, L. C. y H. M. Niemeyer. 2000. Evidencias indirectas sobre el origen de la cochinilla *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopiidae). *Rev. Chilena Ent.* 27:85-89.
- Romero B., E., A. Flores, E. Santamaría, J. Salazar, M. Ramírez and A. Pedroza. 2006. Identificación, biología y adaptación de la cochinilla silvestre *Dactylopius opuntiae* (Homoptera: Dactylopiidae) a las condiciones ambientales de Bermejillo, Durango. *Revista Chapingo Zonas Aridas* 5: 41-48.
- Santos, P., M. da Silva, A. Monteiro and C. Gava. 2011. Improving photoprotection of *Beauveria bassiana* conidial for biological control of the cactus pest *Dactylopius opuntiae* in the semiarid region northeast of Brazil. *Biocontrol science and Technology. Biocontrol Science And Technology* 21(8):893-902.
- Senthil-Nathan, S. 2015. A review of biopesticides and their mode of action against insect pest. Thangavel, P. and G. Sridevi (eds). *Environmental Sustainability* pp:49-63.
- Shahid, A., A. Rao, A. Bakhsh and T. Husnain. 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. *Arch. Biol. Sci.* 64(1): 21-42.
- Silva, T., M. E. Leal, J. Paranhos, B. A. and G. C. A. Tuao. (s/f). Virulencia de fungos entomopatogénicos a *Dactylopius opuntiae* Cockerel (Hemiptera: Dactylopiidae) Praga da Palma Forrageira (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill) no Semiárido Nordeste. Recuperado de: http://www.cpatas.embrapa.br/public_eletronica/downloads/OPB2533.pdf. Consultado mayo 28, 2016.

- Statistical Analysis System (SAS) Inc. 2012. SAS Sistem Versión 9.1. Cary, North Carolina, USA.
- Tafoya, F., M. Zúñiga-Delgadillo, R. Alatorre, J. Cibrian-Tovar and D. Stanley. 2004. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) against the cactus weevil, *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions. Florida Entomologist 87(4):533-536.
- Tanada, Y. and H. K. Kaya. 1993. Insect Pathology. San Diego: Academic Press. pp: 68- 70.
- Vanegas-Rico, J. M., J. R. Lomeli, E. Rodríguez, G. Mora y J. M. Valdez. 2010. Enemigos naturales de *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) en *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller en el centro de México. Acta Zoológica Mexicana 26 (2): 415-433.
- Vázquez-García, M., S. Garabito-Espinoza, J. Tabares-Vega and G. Castillo-Herrera. 2011. Essential oils from aromatic plant species and insecticidal effects on *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Homoptera: Dactylopiidae) in mobile juveniles. Acta Hort. 894:215-223.
- Vigueras A. L., J. Cibrán and C. Pelayo. 2009. Use of botanicals extracts to control wild cochineal (*Dactylopius opuntiae* Cockerell) on cactus pear. Acta Horticulturae. 811:229-234.

CAPÍTULO III. VIRULENCIA DE *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium lecanii* SOBRE NINFAS DE SEGUNDO INSTAR DE *Dactylopius opuntiae* (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE) EN CONDICIONES DE LABORATORIO

3.1. Resumen

La principal plaga que limita la producción de nopal tunero y verdulero es la cochinilla silvestre del nopal *Dactylopius opuntiae*. Este insecto se alimenta de las plantas de nopal causando daños directos, tales como el desprendimiento de cladodios e incluso muerte de la planta, e indirectos manifestados en una merma de la calidad y estética de los productos. Los métodos de control de este insecto empleados actualmente, principalmente el químico y el cultural, no han resultado efectivos para reducir sus poblaciones y minimizar sus daños. Derivado de lo anterior, el uso de hongos entomopatógenos puede ser una alternativa que se puede integrar a una estrategia de manejo de este insecto. En la presente investigación se evaluaron tres aislamientos de hongos entomopatógenos, dos de ellos pertenecientes a la especie *Metarhizium anisopliae* (Ma 129 y Ma 130) y uno a la especie *Lecanicillium lecanii* (974) con cuatro diferentes concentraciones (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 conidios mL⁻¹) y se estimó la concentración letal media (CL₅₀) por medio de análisis probit para cada aislamiento. La virulencia se determinó comparando las CL₅₀ y se encontró que el aislamiento Ma 130 perteneciente a la especie *M. anisopliae* resultó más efectivo, seguido del aislamiento 974 de la especie *L. Lecanii*, los cuales presentaron una CL₅₀ de 6.63×10^7 y 2.07×10^8 conidios mL⁻¹, respectivamente.

Palabras clave: Cochinilla silvestre, concentración letal media, hongos entomopatógenos, control biológico.

3.2. Abstract

The main pest that limits production of cactus and greengrocer is the wild cochineal *Dactylopius opuntiae*. This insect feeds on cactus plants causing direct damages, such as cladodes detachment and even death of the plant, and indirectly manifested in a reduction of the quality and aesthetics of the products. The control methods of this insect currently employed, mainly chemical and cultural, have not been effective in reducing their populations and minimizing their damage. Derived from the above, the use of entomopathogenic fungi may be an alternative that can be integrated to a management strategy of this insect. In the present research, three isolates of entomopathogenic fungi, two belonging to the species *Metarhizium anisopliae* (Ma 129 and Ma 130) and one to the species *Lecanicillium lecanii* (974) were evaluated with four different concentrations (106, 107, 108, 109 Conidia mL⁻¹) and the mean lethal concentration (LC50) was estimated by means of probit analysis for each isolation. Virulence was determined by comparing the LC50 and it was found that the isolation Ma 130 belonging to the species *M. anisopliae* was more effective, followed by isolation 974 of the species *L. Lecanii*, which presented a LC50 of 6.63×10^7 and 2.07×10^8 conidia ML⁻¹, respectively.

Key words: Wild cochineal, prickly pear, average lethal concentration, entomopathogenic fungi, biological control.

3.3. INTRODUCCIÓN

El control biológico tiene como objetivo disminuir el daño causado por organismos plaga, empleando depredadores, parasitoides y patógenos (Hajek, 2002). El uso de patógenos en el control de insectos o control microbiológico se basa en la utilización de organismos como virus, bacterias, hongos, protozoarios y nematodos que tienen la capacidad de causar enfermedades en insectos (Tanada y Kaya, 1993).

Los hongos entomopatógenos son un conjunto de microorganismos que causan infección en varias clases de insectos y están presentes en la mayoría de los ambientes, desde zonas áridas hasta zonas tropicales, incluyendo hábitats terrestres y acuáticos y en climas fríos y calurosos (Skinner *et al.*, 2014). Actualmente, se conocen alrededor de 750 especies de hongos entomopatógenos asociados con artrópodos (Liu, 2012), de los cuales más de 500 son parásitos de insectos y en su mayoría pertenecen a los géneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Verticillium*, *Nomuraea*, *Entomophthora* y *Neozygites* (Shahid *et al.*, 2012).

Una de las ventajas de los hongos entomopatógenos en comparación con otros microorganismos es su modo de acción; mientras que virus, bacterias y protozoarios requieren ser ingeridos por los insectos para poder causar infección, los hongos entomopatógenos actúan directamente penetrando la cutícula del hospedero (Hajek y Delalibera, 2010). Lo anterior resulta de gran importancia como estrategia de control para aquellos insectos que presentan un aparato bucal chupador (Hajek y Leger, 1994) como es el caso de *D. opuntiae*

La efectividad de los hongos entomopatógenos es evaluada por medio de bioensayos en laboratorio, los cuales se enfocan a determinar el grado de habilidad de causar infección que presenta determinado aislamiento, dando como resultado medidas cuantitativas tales como “virulencia” (Vega *et al.*, 2012). La forma de medir la virulencia entre especies y aislamientos de hongos entomopatógenos es determinando la dosis letal media (DL_{50}), la concentración letal media (CL_{50}) y el tiempo letal medio (TL_{50}). Donde la DL_{50} es la dosis requerida del entomopatógeno para matar al 50% de la población del insecto, en un periodo determinado de tiempo. De igual manera la CL_{50} y el TL_{50} se definen como la concentración y el tiempo necesarios para matar al 50% de la población del insecto, respectivamente, en un periodo

determinado de tiempo. La concentración a su vez, se define como el número de conidios presentes por unidad de volumen en determinada suspensión (Ravensberg, 2011).

La cochinilla del nopal *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae) es una de las 11 especies perteneciente a la familia Dactylopiidae, comúnmente conocido como “cochinilla silvestre del nopal” (Spodek *et al.*, 2014). Este insecto se encuentra ampliamente distribuido a nivel internacional y en México se le encuentra en la mayoría de las zonas nopaleras. El daño ocasionado por este insecto es resultado de su hábito alimenticio, el cual consiste en la succión de la sabia del nopal, causando caída de frutos, debilidad y hasta muerte de la planta (Flores *et al.*, 2013). A nivel internacional existen registros donde este insecto ha causado un impacto de hasta 100% de mortalidad en plantaciones *Opuntia* en Brasil, lo cual ha generado graves pérdidas que repercuten en el sector pecuario, ya que depende del nopal como fuente de sustento para el ganado destinado a la producción de leche (Da Silva *et al.*, 2015). En México este insecto es considerado la principal plaga que limita la producción de nopal tunero y reduciendo los ingresos de los productores (Mena, 2013).

A pesar de que el control de esta plaga en México se ha basado en la aplicación de productos químicos (Badii y Flores, 2001) y prácticas culturales (Mena, 2013), se ha registrado la presencia de siete depredadores que de manera natural ejercen un control sobre las poblaciones de *D. opuntiae*, en la región central de México (Vanegas-Rico *et al.*, 2010). No obstante, los resultados han demostrado que tienen ciertas debilidades en el control del insecto, dado que bajo condiciones de laboratorio se observó que el coccinélido *Chilocorus cacti* solo es efectivo cuando hay baja densidad de la cochinilla (Flores *et al.*, 2013).

El uso de hongos entomopatógenos ha venido explorándose recientemente como un medio alternativo de control de *D. opuntiae* en Brasil (Da Silva *et al.*, 2015), aunque hasta la fecha son pocas las evaluaciones de hongos entomopatógenos realizadas sobre insectos del género *Dactylopius*. Derivado de lo anterior, el estudio tuvo como finalidad conocer el grado de virulencia de tres aislamientos de hongos entomopatógenos pertenecientes a las especies *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii*, mediante la concentración letal media (CL₅₀), sobre ninfas de segundo instar de *D. opuntiae*.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Patología de Insectos del *Campus* Montecillo, Colegio de Postgraduados, durante Enero a Abril de 2016.

3.4.1. Pie de cría

El pie de cría del insecto se obtuvo mediante la recolección de cladodios infestados de *D. opuntiae* durante el mes de Octubre de 2015, en una plantación comercial para la producción de tuna, ubicada en la comunidad de Cuautlacingo perteneciente al municipio de Otumba en el Estado de México. Los cladodios infestados con *D. opuntiae* se cortaron y se revisaron cuidadosamente, a fin de evitar de enemigos naturales, después se trasladaron y confinaron en un invernadero del Colegio de Postgraduados *Campus* Montecillo.

Los cladodios de nopal *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. utilizados como substrato alimenticio de la cochinilla presentaron las siguientes dimensiones: 20 cm largo, 15 cm ancho, 1.5 cm de grosor. Para obtener cohortes de ninfas de la misma edad de *D. opuntiae*, los cladodios infestados se mantuvieron en confinamiento en una unidad de cría, siguiendo la metodología propuesta por Aldama y Llanderal (2003). Para realizar la infestación de los cladodios, las hembras adultas se recolectaron cuidadosamente y se introdujeron en “nidos de tul” de acuerdo al método descrito por Aldama y Llanderal (2003). Posteriormente, los cladodios con los nidos se introdujeron en recipientes de plástico transparente cerrados, con las siguientes dimensiones 25x15x5cm (largo, ancho y altura, respectivamente); finalmente, se colocaron en una cámara bioclimática (Thermo SCIENTIFIC) a una temperatura de 25 ± 1 °C y un fotoperiodo de 24 h de obscuridad, donde permanecieron durante un periodo de 72 h para asegurar el establecimiento y fijación de la ninfa migrante. Una vez establecidas las ninfas se realizaron cortes cuadrados en los cladodios de 25 cm², en los que se seleccionaron un total de 30 ninfas con la ayuda de un contador manual (PRETUL® CON-10M) y empleando un microscopio estereoscópico (SWIFT® 05001025). Cada unidad se colocó en contenedores desechables transparentes cilíndricos de 6x4cm (diámetro y altura, respectivamente) (REYMA® No. 4A). Se establecieron 13 unidades experimentales por cada repetición.

3.4.2. Cultivo de hongos empleados

Se emplearon los aislamientos *Metarhizium anisopliae* (Ma129, Ma130) y *Lecanicillium lecanii* (974), todos considerados cultivos monospóricos provenientes de la colección de hongos entomopatógenos del Laboratorio de Patología de Insectos del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados (Cuadro 5). La producción de conidios se realizó mediante el cultivo en superficie de medio sólido (Butt y Goettel, 2000) empleando Agar Dextrosa Sabouraud (BD Bioxon, México) en la siguiente proporción: Dextrosa (40 g), peptona de carne (5 g), peptona de caseína (5 g) y agar (15 g). Este se esterilizó previamente mediante un autoclave y se transfirió a cajas Petri de Poliestireno estériles (KLINICUS®) de 90x15 mm. Para la obtención de conidios se incubaron las cajas por espacio de tres semanas a una temperatura de 25±1 °C con un fotoperiodo de 24 horas de oscuridad. La extracción de conidios se realizó por medio de raspado de la superficie y fueron suspendidos en solución Tween 80 al 0.05%. La cuantificación de conidios se realizó por medio de una cámara de Neubauer de acuerdo al método propuesto por Goettel y Douglas (1997).

Cuadro 5. Referencia de los hongos empleados en la evaluación de virulencia sobre ninfas de segundo instar de *Dactylopius opuntiae*.

Especie	Clave	Insecto hospedante	Localidad
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Ma 129	<i>Tetranychus urticae</i>	Tecomán, Colima, México
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Ma 130	<i>Tetranychus urticae</i>	Tecomán, Colima, México
<i>Lecanicillium lecanii</i>	ARSEF* 974	Áfidos	Venezuela

*Aislamientos con el prefijo ARSEF, pertenecen a la colección de aislamientos de Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi, EUA.

3.4.3. Evaluación de virulencia

Para evaluar la virulencia de las diferentes cepas sobre *D. opuntiae*, los cortes de nopal conteniendo insectos de segundo instar ninfal se colocaron dentro de vasos desechables transparentes y se asperjaron con suspensiones de conidios de los tres aislamientos (Ma130, Ma129, 974). Se aplicaron cuatro dosis de conidios para todos los aislamientos (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 conidios mL^{-1}) suspendidos en solución Tween 80 al 0.05% (Anexo 3), más un control tratado solamente con solución Tween 80 al 0.05%. Las atomizaciones se realizaron en una torre de aspersión con las siguientes dimensiones: cilindro de acrílico de 30 cm de diámetro y una altura de 50 cm, con una inclinación de 45° a los 30 cm de altura. Todos los tratamientos se sometieron a una presión de 10 psi. El uso de la torre de aspersión se realizó considerando el método empleado por Castillo (2016). Luego de la aspersión, las unidades experimentales tratadas se colocaron en recipientes de plástico transparente (Baat, 2004) los cuales se introdujeron a su vez en una cámara de cría con las siguientes condiciones: humedad relativa (60%), fotoperiodo (12:12) y a una temperatura de 26 ± 1 °C.

La mortalidad de las ninfas tratadas se evaluó durante 192 horas, en intervalos de 24 horas después de la aspersión. Asimismo, cada 24 horas se realizó la extracción y cuantificación de insectos muertos y cada uno se colocó en una cámara húmeda para acelerar la esporulación del hongo y así poder confirmar la infección del insecto (Butt y Goettel, 2000). Los criterios empleados para determinar la mortalidad consistió en evaluar su respuesta a estímulos mecánicos, considerando muertos, aquellos insectos que no reaccionaban al estímulo (Pereira *et al.*, 2011); además, se consideró el cambio de coloración y la reducción en tamaño del insecto. De igual forma se realizó toma de fotografías de los insectos infectados por medio del software Leica Microsystems (Anexo 5). El porcentaje de mortalidad se calculó de acuerdo a la fórmula de Abbott (1925):

$$= \frac{\% \text{ mortalidad en tratamiento} - \% \text{ mortalidad en control}}{100 - \% \text{ mortalidad en control}} \times 100$$

3.4.4. Análisis estadístico

El diseño del experimento fue completamente aleatorio, con 12 tratamientos más un control y se repitió cuatro veces en días distintos. Se efectuó una comparación múltiple de medias de las concentraciones mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) para cada aislamiento. Asimismo, se realizó un análisis Probit para estimar la CL_{50} y CL_{95} de cada aislamiento con 95% de límite de confianza empleando el programa Statistical Analysis System (SAS Institute, 2012).

3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron tres aislamientos de hongos entomopatógenos de dos especies (*Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii*) para determinar su virulencia contra ninfas de segundo instar de la cochinilla *D. opuntiae* en condiciones de laboratorio. La virulencia de cada aislamiento se determinó estimando la CL_{50} y CL_{95} expresada en conidios mL^{-1} , con base a la mortalidad obtenida al octavo día después de la inoculación de los hongos.

Los aislamientos en estudio ocasionaron mortalidad en *D. opuntiae*, siendo esta dependiente de la concentración (Figura 9). Se encontró que el aislamiento Ma 130 (*M. anisopliae*) presentó la mayor efectividad, seguido del aislamiento 974 (*L. lecanii*) y en tercer lugar el aislamiento Ma 129, con la menor efectividad de los tres aislamientos. En el Cuadro 6 se presenta el promedio de la mortalidad registrada y la mortalidad corregida conforme la fórmula de Abbott (1925).

Cuadro 6. Porcentajes de mortalidad observada (\pm E.E.) y corregida empleando la fórmula de Abbott.

Aislamientos - concentraciones	Mortalidad observada (%)	Mortalidad corregida (%)
Ma 130- 10 ⁹	87.50 \pm 4.59 ^a	86.36
Ma 130- 10 ⁸	53.33 \pm 4.91 ^b	49.09
Ma 130- 10 ⁷	31.67 \pm 3.47 ^c	25.46
Ma 130- 10 ⁶	17.50 \pm 3.70 ^{cd}	10.00
Ma 129- 10 ⁹	60.83 \pm 4.98 ^a	57.27
Ma 129- 10 ⁸	31.67 \pm 3.47 ^b	25.46
Ma 129- 10 ⁷	24.17 \pm 4.38 ^{bc}	17.28
Ma 129- 10 ⁶	12.50 \pm 3.94 ^c	4.55
974- 10 ⁹	72.50 \pm 4.98 ^a	70.00
974- 10 ⁸	41.67 \pm 2.15 ^b	36.37
974- 10 ⁷	27.50 \pm 2.85 ^c	20.91
974- 10 ⁶	17.50 \pm 2.85 ^{cd}	10.00
Control	8.33 \pm 0.96	-----

*Distintas letras indican diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

EE: error estándar.

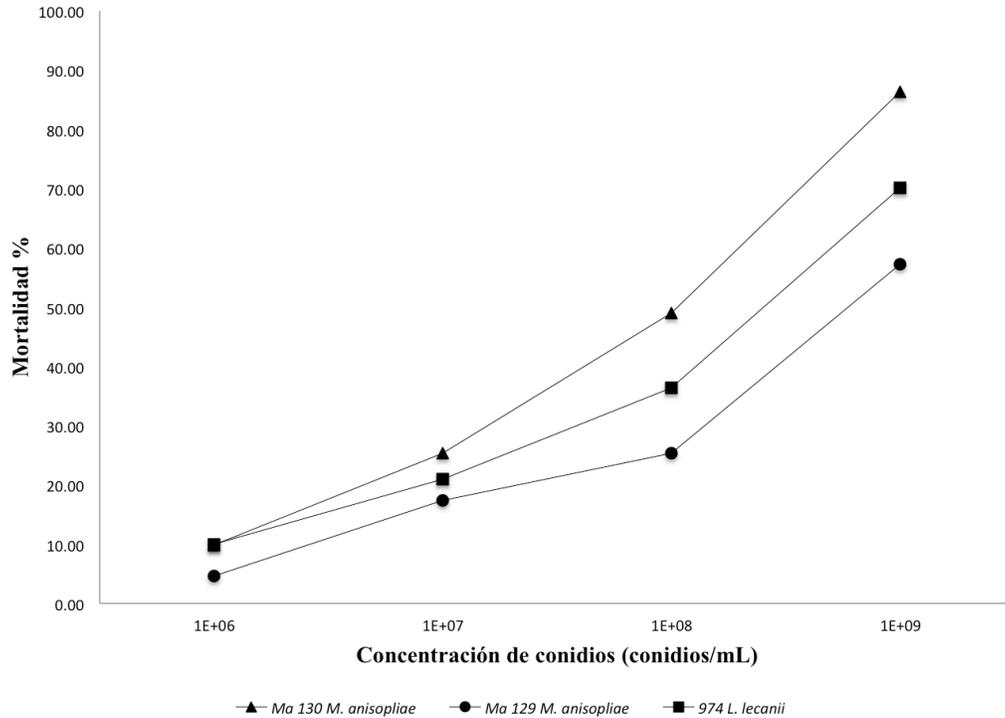


Figura 9. Porcentaje de mortalidad corregida de *Dactylopius opuntiae* a diferentes niveles de concentración de conidios de tres aislamientos evaluados.

El aislamiento Ma 130 de la especie *M. anisopliae* demostró una mayor patogenicidad en las concentraciones evaluadas, los valores medios de mortalidad variaron de 17.5% (1×10^6 conidios mL^{-1}) a 87.50% (1×10^9 conidios mL^{-1}). Asimismo, se encontró una relación positiva entre la concentración de los aislamientos aplicados y la mortalidad, de tal manera que a medida que la concentración aumenta existe un incremento en la mortalidad. Las tres concentraciones más elevadas presentaron diferencias significativas; sin embargo, la concentración más baja (1×10^6 conidios mL^{-1}) presentó una mortalidad promedio de 17.5% la cual no resultó diferente significativamente, respecto al control (8.33%).

El aislamiento que mostró mejor efectividad, después del aislamiento Ma 130, fue *L. lecanii* 974 ya que obtuvo valores de mortalidad de 72.50% a una concentración de 1×10^9 conidios mL^{-1} ; por el contrario la mortalidad más baja se observó en el tratamiento con la concentración de 1×10^6 conidios mL^{-1} , donde se registró una mortalidad de 17.50% la cual no difiere significativamente del control, cuyo valor fue de 8.33 %. Respecto al aislamiento

Ma 129 de *M. anisopliae*, éste presentó el menor porcentaje de mortalidad respecto a los otros dos aislamientos evaluados. El promedio de mortalidad más alto (60.83%) se obtuvo con la concentración más elevada (1×10^9 conidios mL^{-1}); por el contrario, el valor promedio de mortalidad más bajo que este aislamiento presentó (12.5 %) se obtuvo con la concentración de 1×10^6 conidios mL^{-1} , el cual no presenta diferencias significativas comparado con el control (8.33 %) (Figura 10).

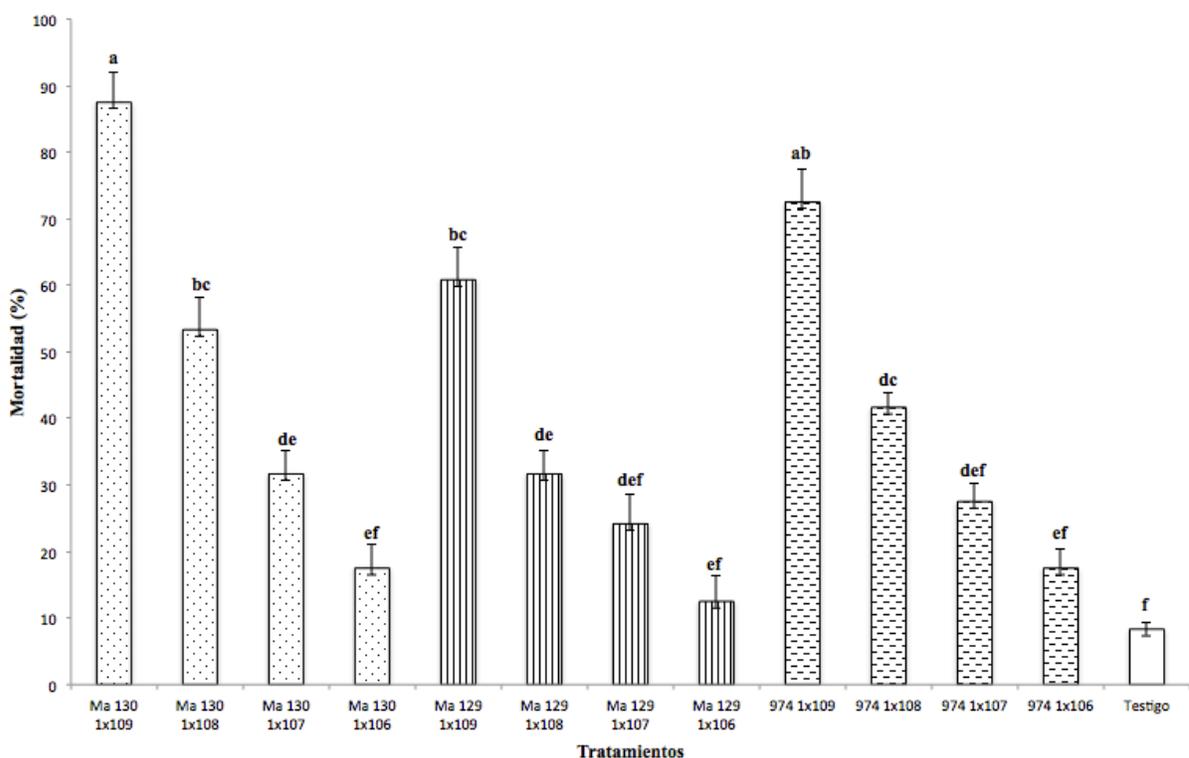


Figura 10. Porcentajes de mortalidad de ninfas de segundo instar de *Dactylopius opuntiae* obtenida a los ocho días después de la aplicación de los tres aislamientos de hongos entomopatógenos en las diferentes concentraciones.

En el Cuadro 7 se presentan los valores de CL_{50} y CL_{95} (incluyendo los límites de confianza) y las ecuaciones de regresión obtenidas a partir del análisis Probit. La concentración letal media (CL_{50}) estimada para el aislamiento Ma 130 (*M. anisopliae*) fue de 6.63×10^7 conidios mL^{-1} ; en el caso del aislamiento Ma 129 la CL_{50} obtuvo un valor de 6.56×10^8 conidios mL^{-1} ; y para el aislamiento 974 de la especie *L. lecanii* el valor estimado de la

CL₅₀ fue 2.07×10^8 conidios mL⁻¹. Con base a esta información es posible considerar que el aislamiento más efectivo de los tres evaluados es Ma 130, el cual muestra un menor requerimiento en la concentración para matar al 50 % de la población en estudio en un periodo de tiempo determinado. En orden decreciente de efectividad después del aislamiento Ma 130 le sigue la especie *L. Lecanii* (974) y finalmente el menos efectivo resultó ser el aislamiento Ma 129.

Cuadro 7. CL₅₀ y CL₉₅ de tres aislamientos de hongos entomopatógenos sobre ninfas de segundo instar de *Dactylopius opuntiae*.

Aislamiento	CL ₅₀ (95% LC)	CL ₉₅ (95% LC)	Ecuación de regresión Probit
Ma 130	6.63×10^7 (4.83×10^7 - 1.03×10^8)	8.45×10^9 (3.47×10^9 - 2.92×10^{10})	Y= -6.1119+0.7814 X
Ma 129	6.56×10^8 (3.36×10^8 - 1.67×10^9)	4.01×10^{11} (7.04×10^{10} - 6.60×10^{12})	Y= -5.2041+ 0.5902 X
974	2.07×10^8 (1.19×10^8 - 4.12×10^8)	1.10×10^{11} (2.59×10^{10} - 1.01×10^{12})	Y= -5.0167 + 0.6032 X

En el Cuadro 8 se presenta el promedio de conidios obtenidos después de la aplicación de cada tratamiento y sus respectivas concentraciones en la torre de aspersión; los valores se obtuvieron estimando un área de $144 \mu\text{m}^2$ empleando un microscopio compuesto con un ocular previsto de una cuadrícula de $12 \times 12 \mu\text{m}$, donde se observa que la proporción de éstos aumenta conforme la concentración se incrementa. La concentración tuvo una respuesta lineal positiva con la mortalidad, dado que a mayor concentración la mortalidad se incrementa. Esto puede estar relacionado a la cantidad de esporas viables que logran posicionarse sobre la

cutícula del insecto y que posteriormente germinarán, de esta manera pueden tener mayor oportunidad de infectar al insecto por la cantidad de esporas presentes.

Cuadro 8. Estimación de conidios por cada tratamiento aplicado.

Tratamiento	Promedio de conidios
Ma 130- 9	66.67
Ma 130- 8	25.00
Ma 130- 7	11.33
Ma 130- 6	3.67
Ma 129- 9	42.33
Ma 129- 8	19.00
Ma 129- 7	4.00
Ma 129- 6	1.33
974- 9	54.00
974- 8	44.33
974- 7	17.67
974- 6	11.67

La Figura 11 muestra el porcentaje de mortalidad acumulada registrada por los tres aislamientos evaluados a una concentración de 1×10^9 conidios mL^{-1} . Un aspecto importante de resaltar es que la mortalidad de las ninfas de *D. opuntiae* se inició a partir del primer día después de la aplicación de los hongos; sin embargo, durante las primeras horas se presentó

una mortalidad mínima. Entre el tercer y sexto día se observó la tasa de mortalidad más alta en los tres aislamientos. El aislamiento Ma 130 presentó una mayor efectividad de la mortalidad acumulada respecto al tiempo, sobre los otros dos aislamientos evaluados.

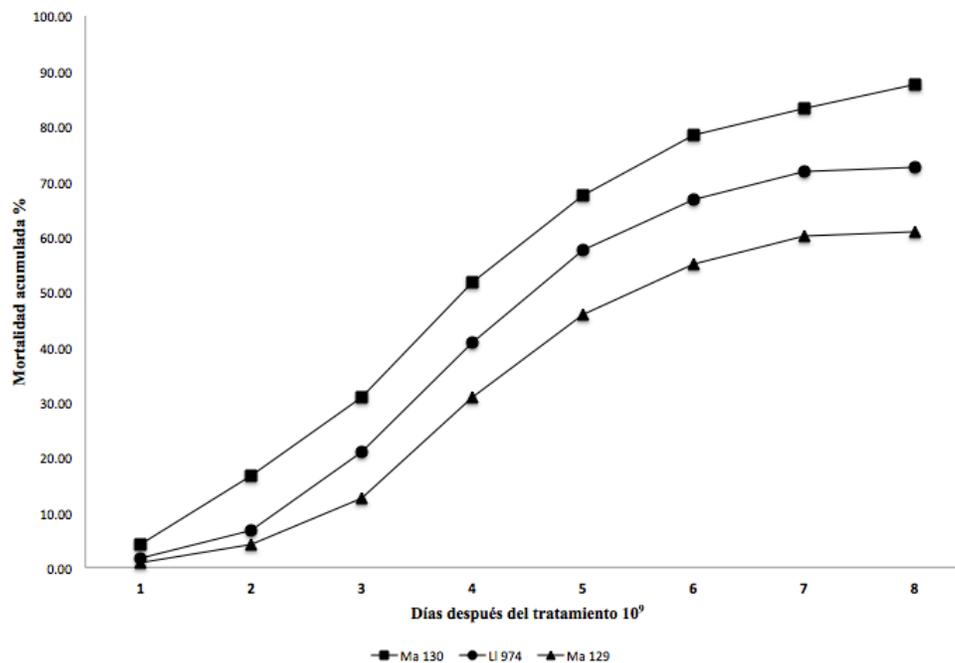


Figura 11. Porcentajes de mortalidad acumulada en el tiempo de tres aislamientos de hongos entomopatógenos sobre ninfas de segundo instar de *Dactylopius opuntiae* en condiciones de laboratorio.

Los tres aislamientos de hongos entomopatógenos evaluados, dos pertenecientes a la especie *M. anisopliae* y uno de la especie *L. lecanii*, presentan potencial de causar infección en ninfas de segundo instar de la cochinilla del nopal; sin embargo, cada uno presentó diferente grado de virulencia. Al respecto se ha observado que cada especie de hongo tiene numerosos aislamientos, los cuales difieren significativamente en virulencia y patogenicidad (Liu, 2012).

Los resultados del estudio mostraron que el hongo que presentó la mayor efectividad pertenece a la especie *M. anisopliae*, con el aislamiento Ma 130. Esta especie es el hongo entomopatógeno más empleado alrededor del mundo, dada su disponibilidad natural en el suelo y también por su amplio número de especies de insectos hospedantes (Senthil-Nathan, 2015). En esta investigación este aislamiento presentó una mayor efectividad en porcentaje de mortalidad, así como también la CL_{50} más baja (6.63×10^7 conidios mL^{-1}), en comparación con los otros dos aislamientos evaluados. Lo anterior puede estar relacionado a los factores de virulencia característicos del aislamiento, tales como la producción de enzimas (proteasas, quitinasas y lipasas), las cuales ayudan a la penetración de la cutícula del insecto y permiten llegar hasta el interior de éste (hemocele) (Schrank y Henning, 2010). El empleo de *M. anisopliae* contra insectos escama es poco empleado, debido a que este hongo está asociado de forma natural a miembros de otros ordenes como: coleópteros, isópteros u ortópteros (Shahid *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha demostrado la efectividad de este hongo contra piojos harinosos como *Pseudococcus viburni*. Al respecto, Pereira *et al.* (2011) observaron que la DL_{50} de *M. anisopliae* var. *anisopliae* registró un valor de 7.3×10^6 conidios mL^{-1} contra ninfas de segundo instar de este insecto.

En este estudio se evaluó el aislamiento Ma 129 también perteneciente a la especie *M. anisopliae*, el cual mostró una efectividad inferior respecto a los otros dos aislamientos. Los dos aislamientos de *M. anisopliae* evaluados en esta investigación alcanzaron su mortalidad máxima después del sexto día después de la aspersión. Oreste *et al.* (2016) analizaron el efecto de un aislamiento de *M. anisopliae* sobre mosca blanca registrando valores de mortalidad de 94.15 %, al séptimo día después de la aplicación de los hongos.

Respecto al aislamiento 974 perteneciente a la especie *L. lecanii* presentó una efectividad interesante en la evaluación de virulencia respecto a los otros dos aislamientos evaluados, obteniendo una estimación de la CL_{50} de 2.07×10^8 conidios mL^{-1} . Esta especie tiene también un alto número de insectos hospedantes; sin embargo, es patógeno principal de hemípteros como escamas, áfidos y mosca blanca (Sujeetha y Sahayaraj, 2014). Telli *et al.* (2014) evaluaron la mortalidad de la escama *Coccus hesperidum* L. mediante la inoculación del hongo *L. lecanii* bajo condiciones de laboratorio y obtuvieron un promedio de mortalidad de 47.54% a una concentración de 1×10^7 conidios mL^{-1} . Los autores concluyen que este

hongo tiene potencial de ser empleado en planes de manejo integrado de insectos fitófagos pertenecientes al orden Hemíptera. Por su parte, Liu *et al.* (2014) analizaron la virulencia de dos aislamientos del hongo *L. lecanii* contra la escama *Matsucoccus matsumurae* y obtuvieron valores de mortalidad que oscilaron entre 53.67 y 61.33 % para los aislamientos V3. 4504 y V34505, respectivamente, sobre ninfas de segundo instar; además, encontraron que los porcentajes más altos de mortalidad se presentaron después del sexto día de inoculación, lo cual coincide con la observado en esta investigación. Asimismo, Xie *et al.* (2010) investigaron como este hongo invade a los insectos escama y encontraron que los conidios atacan la cutícula y penetran el integumento por medio de una combinación de fuerzas mecánicas y enzimas degradadoras.

Algunas de las alternativas de control que se han evaluado en *D. opuntiae*, destacan el uso de extractos botánicos, aceites esenciales, jabones y entomopatógenos. Al respecto Da Silva *et al.* (2015) evaluaron la patogenicidad del hongo *Fusarium incarnatum-equiseti* mezclado con extractos de *Ricinus communis* y *Poincianella pyramidalis* contra *D. opuntiae* encontrando valores de mortalidad que oscilaron entre 63.23 hasta 100 %. Por su parte, Borges *et al.* (2013) analizaron el uso de productos biodegradables contra *D. opuntiae*, tomando como parámetro de evaluación el grado de infestación de plantas de nopal después de 40 días de iniciado el tratamiento bajo condiciones de invernadero; se registró que el extracto de neem fue el más efectivo, seguido del tratamiento conformado por una solución de detergente neutro al 5% y finalmente el tratamiento constituido por aceite mineral. En este mismo sentido, Vázquez-García *et al.* (2011) evaluaron la efectividad de cuatro aceites esenciales contra ninfas de primer instar de *D. opuntiae*, obteniendo las CL_{50} de cada tratamiento y encontrando que el más efectivo resultó el aceite de menta, el cual presentó la CL_{50} más baja (0.8 mL/100 mL de solvente), seguido de los tratamientos de aceite de albahaca, orégano y citronella con CL_{50} de 2.4, 5.2 y 6.6 mL/100 mL de solvente, respectivamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación se destaca que el control de *D. opuntiae* mediante hongos entomopatógenos puede resultar alternativa viable, tomando como referencia la mortalidad obtenida en condiciones de laboratorio. No obstante, es necesario considerar que la efectividad de los entomopatógenos en condiciones de campo es

inferior a lo encontrado en condiciones de laboratorio; sin embargo, la efectividad en campo de los entomopatógenos puede incrementarse mediante el empleo de buenas prácticas de manejo en cada una de las etapas de producción de los hongos, desde asegurar la calidad del producto que se va aplicar, las dosis correctas, métodos y tiempo de aplicación y monitoreo, entre otros factores.

3.6. CONCLUSIONES

- ✓ Los tres aislamientos de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii* mostraron diferente grado de virulencia contra ninfas de segundo instar de *D. opuntiae*.
- ✓ El aislamiento Ma 130 perteneciente a la especie *M. anisopliae* resultó ser el más efectivo contra las ninfas de segundo instar de *D. opuntiae*
- ✓ La tasa de mortalidad más alta de las ninfas de segundo instar de la cochinilla silvestre del nopal, *D. opuntiae* se presenta entre los 3 y 6 días después de ser infectadas con los hongos *M. anisopliae* y *L. lecanii*.

3.7. LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economy Entomology* 18: 265-267.
- Aldama, C. y C. Llanderal. 2003. Grana cochinilla: comparación de métodos de producción en penca cortada. *Agrociencia* 37: 11-19.
- Baat, E. 2004. Quality control of the fungal products. Myco-Spa Workshop. Koppert Biological Systems.
- Badii, M. H. and A. E. Flores. 2001. Prickly pear cacti pests and their control in México. *Florida Entomologist* 84(4):503-505.
- Borges L. R., D. C. Santos, E. W. Gomes, V. A. Cavalcanti, I. M. Silva and H. M. Falcao. 2013. Use of biodegradable products for the control of *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) in cactus pear. 7th International Congress on Cactus Pear and Cochineal. *Acta Horticulture* pp: 379-386.
- Butt, T. M. and M. S. Goettel. 2000. Bioassays of entomogenous fungi. *In*: A. Navon and K. R. Ascher (eds). *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. Bet Dagan, Israel: CABI Publishing pp: 141-195.
- Castillo, O. 2016. Aislamiento e identificación de hongos entomopatógenos asociados a *Brevipalpus sp.* presente en arandano en Ciudad Guzmán, Jalisco. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola, Texcoco Estado de México. pp: 21-22.
- Da Silva S. A.C., O. Soares R. L., A. F. Da Costa, T. P. Vieira and N.T. de Oliveira. 2015. Controlling *Dactylopius opuntiae* with *Fusarium incarnatum–equiseti* species complex and extracts of *Ricinus communis* and *Poincianella pyramidalis*. *J. Pest Sci.* 89(2): 539-547.
- Flores A., H. Olvera, S. Rodríguez and J. Barranco. 2013. Predation potential of *Chilocorus cacti* (Coleoptera: Coccinellidae) to the prickly pear cacti pest *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae). *Neotrop Entomol.* 42(4):407-411.

- Goettel, M. S. and G. Douglas. 1997. Fungi: Hyphomycetes. *In*: L. A. Lacey (ed). Manual of techniques in insect pathology. Wapato, USA: Academic Press. pp: 213-249.
- Hajek, A. E. 2002. Biological control of insects and mites. *In*: Dekker M. (ed) Encyclopedia of pest management. Ithaca, New York, USA. 1: 57-60.
- Hajek, A. E. and R. J. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39:293-322.
- Hajek, A. E. and I. Delalibera. 2010. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. *BioControl* 55(1):147-158.
- Liu, H. 2012. Microbial control of crop pests using entomopathogenic fungi. *In*: Abrol, D. P. and U. Shankar (eds). Integrated Pest management Middletown: CAB International pp: 237-280.
- Liu W., Y. Xie, J. Dong, J. Xue, Y. Zhang, Y. Lu and J. Wu. 2014. Pathogenicity of three entomopathogenic fungi to *Matsucoccus matsumurae*. *PLOS ONE* 9:1-9.
- Mena C., J. 2013. Tecnologías de manejo integrado para los insectos plaga del nopal tunero en el Altiplano Mexicano. *In*: Gallegos, C., S. J. Méndez and C. Mondragón (eds.). Producción sustentable de la tuna en San Luis Potosí. Colegio de Postgraduados, Fundación Produce San Luis Potosí. pp: 127-161.
- Oreste M., G. Bibici, M. Polisenio and E. Tarasco. 2016. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the *Trialeurodes vaporariorum*-*Encarsia formosa* system. *J. Pest Sci.* 89:153-160.
- Pereira, A., P. Casals, A. M. Salazar and M. Gerding. 2011. Virulence and pre-lethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* on *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Chilean Journal of Agricultural Research* 71(4):554-558.
- Ravensberg, W. J. 2011. Selection of a microbial pest control agent. *In*: Ravensberg, W. J. (ed) roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods. Springer+Business Media pp: 23-57.
- Schrank, A. and M. Henning V. 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon.* 56: 1267-1274.
- Senthil-Nathan, S. 2015. A review of biopesticides and their mode of action against insect pest. Thangavel, P. and G. Sridevi (eds). *Environmental Sustainability* pp:49-63.

- Shahid, A., A. Rao, A. Bakhsh and T. Husnain. 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. *Arch. Biol. Sci.* 64(1):21-42.
- Skinner M., B. L. Parker and J. Su. 2014. Role of entomopathogenic fungi in Integrate Pest Management. *In: Abrol, D. P. (ed). Integrated Pest Management. Elsevier Inc. pp: 169-191.*
- Spodek, M., Y. Ben-Dov, A. Protasov, C. Carvalho and Z. Mendel. 2014. First record of *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera:Coccoidea:Dactylopiidae) from israel. *Phytoparasitica* 42: 377-379.
- Statistical Analysis System (SAS) Inc. 2012. SAS Sistem Versión 9.1. Cary, North Carolina, USA.
- Sujeetha, A. and K. Sahayaraj. 2014. Role of entomopathogenic fungus in pest management. *In: Sahayaraj, K. (ed). Basic and applied aspects of biopesticides. India. 3: 31-46.*
- Tanada, Y. and H. K. Kaya. 1993. *Insect Pathology*. San Diego: Academic Press. pp: 318-387.
- Telli S., S. Dervis and A. Yigit. 2014. Effect of entomopathogenic fungus, *Lecanicillium lecanii* (Sordariomycetes: Hypocreales) on some phytophagous Hemiptera species. *Türk. Entomol. Derg.* 38 (3): 351-362.
- Vanegas-Rico J. M., J. R. Lomeli, E. Rodríguez, G. Mora y J. M. Valdez. 2010. Enemigos naturales de *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) en *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller en el centro de México. *Acta Zoológica Mexicana* 26 (2): 415-433.
- Vázquez-García, M., S. Garabito-Espinoza, J. Tabares-Vega and G. Castillo-Herrera. 2011. Essential oils from aromatic plant species and insecticidal effects on *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Homoptera: Dactylopiidae) in mobile juveniles. *Acta Hortic.* 894: 215-219.
- Vega F. E., N. V. Meyling, J., J. Luangsa-ard and M. Blackwell. 2012. Fungal Entomopathogens. *In: Vega E. F. and H. K. Kaya (eds). Insect Pathology. Elsevier Inc. pp: 171-220.*
- Xie Y., W. Liu, J. Xue, G. Peng, Z. Han and Y. Zhang. 2010. Integument of soft scale insects and the invasion of the pathogenic fungus *Lecanicillium lecanii*. *Entomologia Hellenica* 19: 66-75.

DISCUSIÓN GENERAL

En México existen al menos cinco especies diferentes de cochinillas, aunque el número real de especies de este monogénero de insectos, depende del autor que se tome como referencia. Estos insectos están ampliamente distribuidos a lo largo del país; sin embargo, se han diferenciado zonas donde se encuentran presentes determinadas especies. Esta investigación se focalizó en *Dactylopius opuntiae*, insecto presente en estados como Zacatecas, San Luis Potosí, Morelos, Estado de México, considerados importantes productores de nopal verdura y tuna. Sus hábitos alimenticios causan una serie de daños en la planta, los cuales incluyen desde inapreciables cambios de coloración hasta daños drásticos como la muerte de la planta.

Como cualquier fitófago la prioridad es su manejo; es decir, como eliminar o tratar de reducir las pérdidas económicas que implica su presencia. Actualmente en México, el combate de este insecto es efectuado, comúnmente, por medio de productos químicos particularmente organofosforados, algunos incluso ya prohibidos. Una limitante importante que se tiene con los insecticidas para ser empleados en el control de *D. opuntiae* es su modo de acción, ya que las características morfológicas y fisiológicas del nopal, que dificultan su absorción, impiden el uso generalizado de productos químicos que normalmente se emplean para otras especies. Otro aspecto a considerar es que la cochinilla, desarrolla una cubierta protectora de filamentos cerosos que le proporcionan protección contra factores ambientales adversos tales como la radiación solar, precipitación, bajas o altas temperaturas y defensa ante la presencia de depredadores y por consecuencia también representa una barrera ante cualquier insecticida químico o biológico. Sin embargo, el obstáculo más importante es que de acuerdo con COFEPRIS solo existen cuatro productos autorizados para ser empleados en nopal.

Otra forma de control que se ha utilizado en el manejo de este insecto es la eliminación manual de la población de cochinillas; es decir, ayudándose de algún objeto para tratar de eliminar mecánicamente las colonias presentes en los cladodios y plantas del nopal. También

se tiene referencia del uso de minerales como silicio orgánico e inorgánico empleados en forma de aspersión con una combinación de detergente y agua, método que se menciona tiene efectos positivos en el control de la fase adulta del insecto, fase en la que la capa cerosa cubre total y casi impenetrablemente a la hembra de la cochinilla. Otros métodos de control alternativos al uso de insecticidas que se han investigado en condiciones controladas, ya sea en laboratorio o invernadero, son el empleo de depredadores, extractos vegetales, aceites esenciales o minerales y entomopatógenos. No obstante, a pesar de las variadas opciones empleadas, ningún método ha resultado del todo exitoso, lo que ha ocasionado la explosión poblacional del insecto y su dispersión por todas las zonas nopaleras de México y a nivel internacional.

Un factor esencial de la adopción y uso de las diferentes alternativas, respecto al control químico, es la reducción del impacto ambiental que éstas generan. Es ampliamente conocido que el empleo de insecticidas químicos tiene consecuencias ambientales que se ven reflejadas en la salud pública, a pesar de que actualmente existe una tendencia de formular productos calificados como amigables con el ambiente. Como resultado de estas consideraciones se llega al eje central de la presente investigación: El control biológico. Entendido como el empleo de enemigos naturales con la finalidad de disminuir el daño causado por los insectos plaga. Este tipo de control no pretende eliminar totalmente las plagas, sino que busca una reducción de las poblaciones, hasta el punto en que la presencia del organismo no cause un daño de importancia económica en la producción o los bienes. El control biológico se sustenta en tres vertientes principales: depredadores, parasitoides y patógenos.

En este contexto el enfoque de esta investigación se direccionó hacia aquellos organismos denominados “patógenos”. Un patógeno es estrictamente un microorganismo como virus, bacterias, hongos o protozoarios que puede ocasionar una infección a un hospedante; los microorganismos que causan infección a insectos se les llama “entomopatógenos”, el uso de estos microorganismos en el combate de insectos plaga se denomina “control microbiológico”, y a su vez a la formulación de productos a base de estos microorganismos se les conoce como “bioinsecticidas”. Un factor clave en la elección de emplear hongos entomopatógenos contra la cochinilla fue su modo de acción. La mayoría de los entomopatógenos como virus, bacterias y protozoarios actúan estrictamente a través del

tracto digestivo del insecto; es decir, para que puedan causar infección necesariamente deben de ser ingeridos por el insecto, lo cual sería prácticamente muy complicado lograr para el caso de la cochinilla del nopal, debido a la forma del aparato bucal del cual está provisto este insecto. Morfológicamente hablando la cochinilla posee un aparato bucal chupador no retráctil en forma de estilete, el cual inserta en el cladodio para alimentarse; una vez introducido el estilete, generalmente queda fijo, dicho estilete es muy largo y se puede extender en busca de alimento pero siempre dentro de la penca. Por ello, resulta sumamente complicado lograr que este insecto pudiera ingerir los patógenos antes mencionados. Sin embargo, los hongos entomopatógenos actúan mediante contacto, a través de la cutícula del insecto.

Cuando se busca realizar un control efectivo mediante entomopatógenos la primera fase incluye evaluar el efecto de patógenos que se encuentren infectando o parasitando insectos de forma natural, para lo cual al inicio de la investigación se realizaron recorridos de campo con la finalidad de encontrar microorganismos que estuvieran infectando a la cochinilla de forma natural; sin embargo, no se tuvo éxito en lo anterior. Por tal motivo se buscaron hongos que tuvieran antecedentes de ser patógenos a insectos con características semejantes a los del género *Dactylopius* y que también se encontrarán disponibles para su empleo. Con base a lo anterior, se decidió evaluar tres de las principales especies de hongos entomopatógenos, las especies consideradas fueron: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii*. La evaluación de estos hongos se dividió en dos etapas principales.

Una vez seleccionados los hongos en una primera etapa se propuso determinar la patogenicidad de dos aislamientos diferentes de cada especie de *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *L. lecanii* sobre ninfas de segundo instar de *Dactylopius opuntiae*, a fin de confirmar si las especies de hongos antes mencionadas tenían la capacidad de infectar *in vitro* a la cochinilla del nopal (Anexo 2). Esta etapa permitió conocer cuáles fueron los aislamientos que podrían tener un mayor impacto en el combate de la cochinilla; todos los aislamientos mostraron tener la capacidad de infectar a nivel laboratorio a ninfas de segundo instar, con marcadas diferencias en relación a los valores de mortalidad obtenidos en los bioensayos. De los seis aislamientos evaluados se seleccionaron tres de ellos, en función de la mortalidad, en una subsecuente etapa de la investigación. En esta segunda fase se estudió la virulencia de tres aislamientos de hongos entomopatógenos sobre ninfas de segundo instar de la cochinilla del

nopal *D. opuntiae* en condiciones de laboratorio, obteniendo como mejor resultado el aislamiento Ma 130 perteneciente a la especie *M. anisopliae* con una CL_{50} de 6.63×10^7 conidios mL^{-1} .

Se recomienda la continuación de la búsqueda de hongos entomopatógenos que se encuentren infectando a la cochinilla en forma natural. Existen mayores oportunidades de que este proceso sea más común en temporada de lluvia o poco después de éstas, ya que es cuando en el ambiente existen las condiciones de humedad necesarias para que los hongos logren expresarse en su fase de esporulación que es la etapa del hongo en que es visible. Asimismo, hay que considerar que al llevar a cabo evaluaciones con entomopatógenos, es necesario considerar las buenas prácticas de laboratorio, apegándose a los protocolos básicos de microbiología.

Otra recomendación es realizar la evaluación de bioinsecticidas en las ninfas de primer instar y los adultos, puesto que en la presente investigación sólo se evaluó la efectividad de los hongos en la etapa de ninfa segundo instar. Una de las observaciones interesantes que se obtuvieron en la investigación fue que los filamentos cerosos tienen la propiedad de atraer, tal vez por fuerzas electrostáticas, las gotas de las aspersiones acuosas, lo cual impide que lleguen al cuerpo del insecto; por lo que una gota fina tiene mayores posibilidades de posicionarse sobre la cutícula de la cochinilla, lo anterior se puede lograr disminuyendo la presión en los equipos de aspersión de los hongos y por medio de aditivos como surfactantes o dispersantes, que tienen como finalidad eliminar las tensiones superficiales en soluciones acuosas.

CONCLUSIONES GENERALES

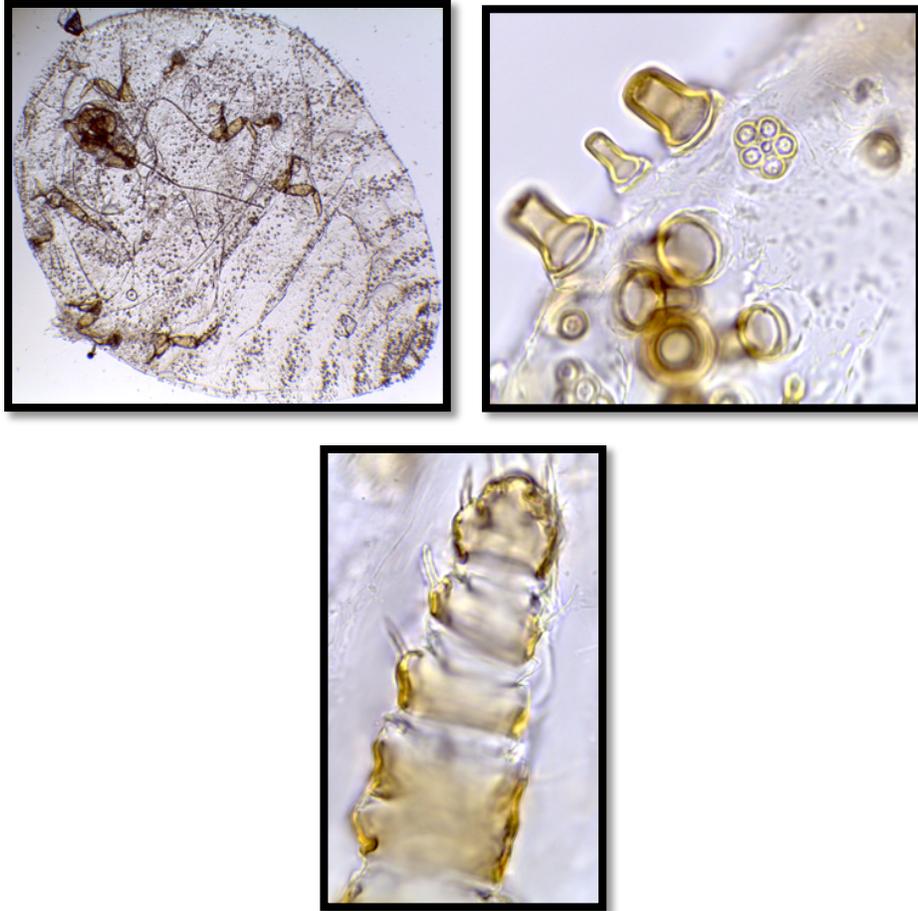
- *M. anisopliae* aislamiento Ma 130 registró el mayor grado de mortalidad en condiciones de laboratorio.
- Hay diferencias en la patogenicidad de las diferentes cepas probadas, aún dentro de una misma especie de hongo entomopatógeno.

- Los tres aislamientos de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii* mostraron diferente grado de virulencia contra ninfas de segundo instar de la cochinilla silvestre del nopal *Dactylopius opuntiae*.
- La mayor tasa de mortalidad de las ninfas de segundo instar de la cochinilla silvestre del nopal, *D. opuntiae* ocurre entre los 3 y 6 días después de ser infectadas con los hongos *M. anisopliae* y *L. lecanii*.

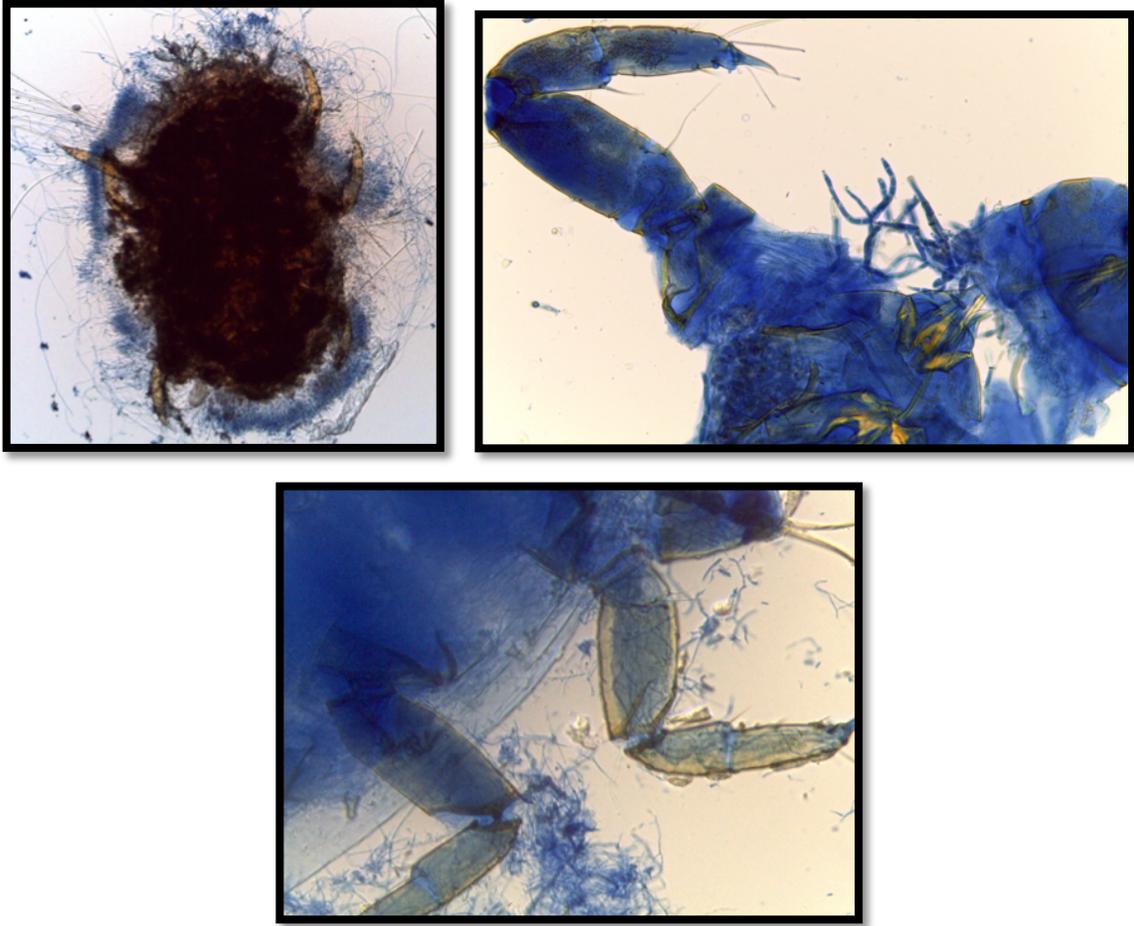
RECOMENDACIÓN

La presente investigación se realizó sólo en su etapa de laboratorio, por lo tanto es posible que los resultados obtenidos están sujetos a las condiciones propias que se dispusieron en los bioensayos. Dichas condiciones difieren por mucho a las presentes en campo, por lo tanto es necesario realizar evaluaciones en esas condiciones y probar la funcionalidad de estas cepas interactuando con factores bióticos y abióticos.

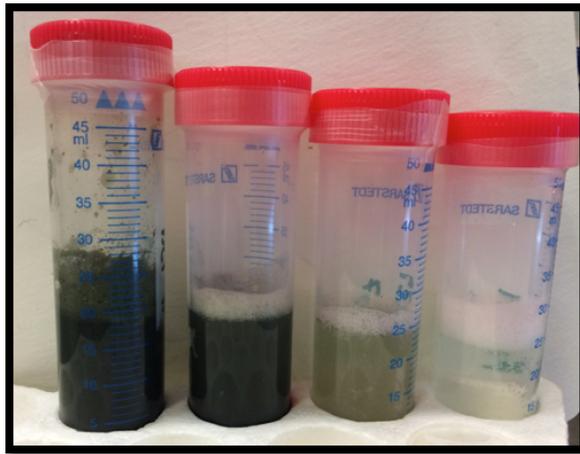
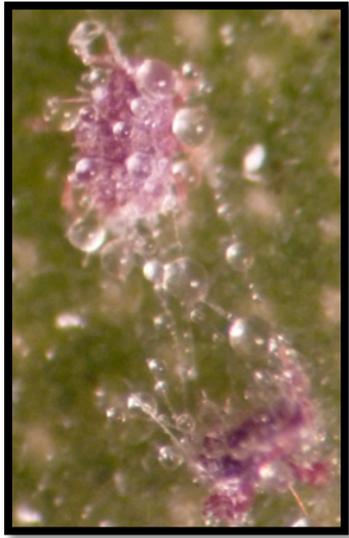
ANEXOS



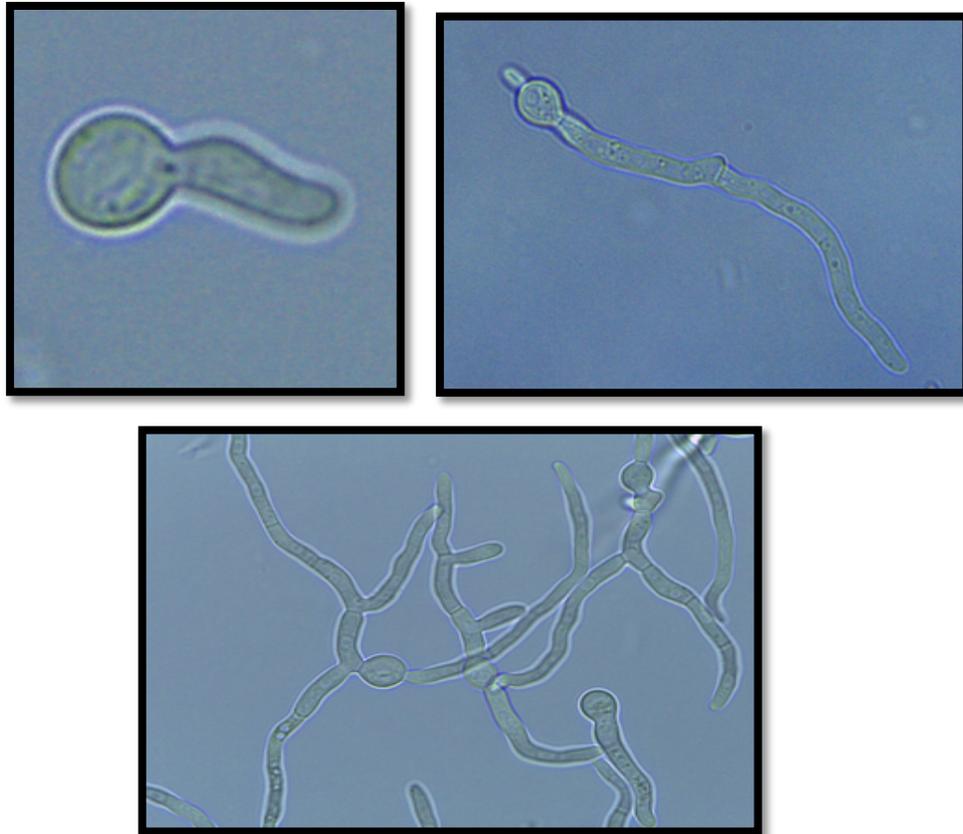
Anexo 1. Cochinilla silvestre montada en laminillas para identificación. De izquierda a derecha arriba: Cochinilla completa decolorada. Setas y anillos. Abajo: Apéndice cefálico (antena).



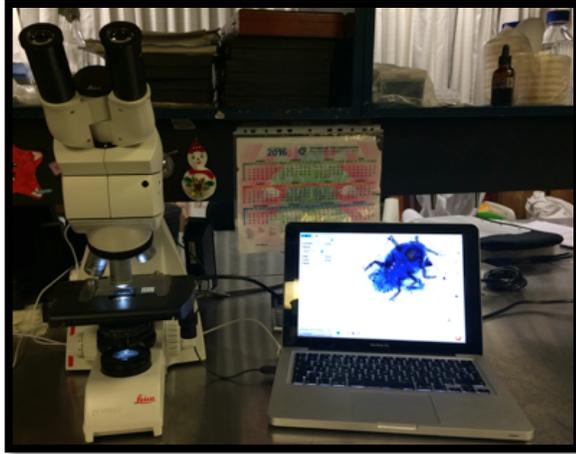
Anexo 2. Diferentes etapas de infección de los hongos entomopatógenos en la cochinilla del nopal.



Anexo 3. De izquierda a derecha arriba: Prueba de aspersión para encontrar la presión adecuada para el bioensayo. Hongos atrapados por la capa cerosa de la cochinilla en su etapa adulta. Abajo: Diferentes concentraciones del hongo *M. anisopliae* antes de la aspersión.



Anexo 4. Prueba de germinación de los hongos empleados. De izquierda a derecha arriba: Espora germinando a las 4 horas de sembrado. Espora emitiendo tubo germinativo 12 horas después de sembrada. Abajo: Formación de micelio después de 18 horas de haber sembrado la espora.



Anexo 5. Toma de fotografías microscópicas de la cochinilla infectada por medio del software Leica Microsystems.



Anexo 6. Arriba: Cría en condiciones de invernadero dispuestas para la presente investigación. Abajo: Reconocimiento en campo de la infestación del insecto en plantaciones de nopal.