

Cuernavaca, Morelos a 14 de diciembre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Guadalupe Peña Chora (director de tesis CIB-UAEM)
Dr. Iván Arenas Sosa (IBT-UNAM)
Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB-UAEM)
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB-UAEM)
Dr. Fernando Zúñiga Navarrete (IVSAS)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (CEIB-UAEM)
Dr. Erubiel Toledo Hernández (UAGRO)

Tesis: Caracterización de aislados bacterianos patógenos a *Dactylopius opuntiae* (Hemíptera: Dactylopiidae) cochinilla silvestre del nopal en el Estado de Morelos.

Alumno que lo presenta a revisión: HÉCTOR HERNÁNDEZ GUERRA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. GUADALUPE PEÑA CHORA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GUADALUPE PEÑA CHORA | Fecha:2021-11-04 19:46:33 | Firmante

KyH5tAptQXN8VBP5PNILuSp3dMojFhyGblYOUQ2+Ct1fbHK2w39brOWywoQ528NvB0FzW+BYWtJp8/SEgE8w7yR5+WLBkRkaXdMsLJnAs988Q/QZ6fWT1ZdKIAam+3EgGx0E4XIWAAMTDGoTK28MLF9wBW5KgHA6DWGpa1s1JblZBUqNmFL7r7sziYeiAx/ukQXxy4KzC45goEUaKidgdZD09AeJ8g0xjeHGVvpeJYaNEQiFTyOsghn6nnusWewwEyZrc34jN9jawg8Tw9PDrRwBRx5JvY/i7HHBvr3cRxmMsmYJqS1LC/clrC2eHKb99vBk2Kor6IdExIAZOhXnrBQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[tihm4bWdY](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/shGG1iXqw3uah3UqsNoXZfB0gTn63AoK>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 14 de diciembre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Guadalupe Peña Chora (director de tesis CIB-UAEM)

Dr. Iván Arenas Sosa (IBT-UNAM)

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB-UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB-UAEM)

Dr. Fernando Zúñiga Navarrete (IVSAS)

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (CEIB-UAEM)

Dr. Erubiel Toledo Hernández (UAGRO)

Tesis: Caracterización de aislados bacterianos patógenos a *Dactylopius opuntiae* (Hemíptera: Dactylopiidae) cochinilla silvestre del nopal en el Estado de Morelos.

Alumno que lo presenta a revisión: HÉCTOR HERNÁNDEZ GUERRA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. IVÁN ARENAS SOSA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

IVÁN ARENAS SOSA | Fecha:2021-11-23 13:07:31 | Firmante

walhLuqWcGkq1ljzPw2Qyvrgq5PA8AByp5Y2wnrzSpTC6lZWw5TINZVxbQteOHkSt7XC5nqP42WuBILDGXefO2+3V7U/smLKy5Pn2nJtqubWQPOv70G47fa/L1MzjbzGI+8bS/lgzeq1lZ6rfCzx1Sn3bgwOpcMj3IT1YYvWMw+I70feieTyzhnXm74VE4T/KkCkG6YT2mgbbAJ1A1j6nxDOguBK7Q2xNRg5BdlmKSEPzU56TiDnTNU2rktx5uCUtVWGC5ly42ZkgVMPepty8x+oPdIbifpw/Sy9L0BC4MWxoZPvIUdxIER9RPQnF0iIUJNJqNOtu8U1/gxc75w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[sbSh8VLir](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/fQjgJwJANgx0wcKlqnF3cPoFkTkfpFHY>



Cuernavaca, Morelos a 14 de diciembre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Guadalupe Peña Chora (director de tesis CIB-UAEM)
Dr. Iván Arenas Sosa (IBT-UNAM)
Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB-UAEM)
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB-UAEM)
Dr. Fernando Zúñiga Navarrete (IVSAS)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (CEIB-UAEM)
Dr. Erubiel Toledo Hernández (UAGRO)

Tesis: Caracterización de aislados bacterianos patógenos a *Dactylopius opuntiae* (Hemíptera: Dactylopiidae) cochinilla silvestre del nopal en el Estado de Morelos.

Alumno que lo presenta a revisión: HÉCTOR HERNÁNDEZ GUERRA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE



DR. FERNANDO MARTÍNEZ MORALES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 14 de diciembre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Guadalupe Peña Chora (director de tesis CIB-UAEM)

Dr. Iván Arenas Sosa (IBT-UNAM)

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB-UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB-UAEM)

Dr. Fernando Zúñiga Navarrete (IVSAS)

Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (CEIB-UAEM)

Dr. Erubiel Toledo Hernández (UAGRO)

Tesis: Caracterización de aislados bacterianos patógenos a *Dactylopius opuntiae* (Hemíptera: Dactylopiidae) cochinilla silvestre del nopal en el Estado de Morelos.

Alumno que lo presenta a revisión: HÉCTOR HERNÁNDEZ GUERRA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2021-02-24 15:52:54 | Firmante

eoiAj8i7S/zhHVIQladqr2qV13RVUkBOV1HVf6ZlInyFRbG2m7rMkLCOOEIOx45hed6xGcK7MArchB5wtw7a3+9gqEUwdptqoclDYT0sFc+8V8xoQa6evYHRExToLCZSzaq1HBiTP
BLqoqq/0wkK6xNI1Aout6IkRiu0MOV3aqkxyx6v5520Xj4TyTKK2LKCm32igkW7656na/vacOiW8jAIG9zWpn1zSpaKfe58dXsBvK521RYdjRStXQWUFXxQ7P7HuAI3d5XsIFgzRwb
SWmbFKOIJjKfGH07WD4raBs7S3xi8DN+z9yCv/5AtN+vWZFWaS/6oON7Arnmc/ZKjbyvw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[Xydpl](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/r94iUys520UjziM0HdPFcKc1he5WjHcj>





Cuernavaca, Morelos a 14 de diciembre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Guadalupe Peña Chora (director de tesis CIB-UAEM)
Dr. Iván Arenas Sosa (IBT-UNAM)
Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB-UAEM)
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB-UAEM)
Dr. Fernando Zúñiga Navarrete (IVSAS)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (CEIB-UAEM)
Dr. Erubiel Toledo Hernández (UAGRO)

Tesis: Caracterización de aislados bacterianos patógenos a *Dactylopius opuntiae* (Hemíptera: Dactylopiidae) cochinilla silvestre del nopal en el Estado de Morelos.

Alumno que lo presenta a revisión: HÉCTOR HERNÁNDEZ GUERRA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE



DR. FERNANDO ZÚÑIGA NAVARRETE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO ZÚÑIGA NAVARRETE | Fecha:2021-11-09 15:04:27 | Firmante

CM+ewpYbZaUvMUu6w6ccFscyF31D7NKW+2aNSc7lOrdphLww6Hn3KSyUqNLC6Hw2aOBRBYusIRZY7xWkNar2G0MGqqNGmqGBKcdVRe8wpYc/xyV4SRa3kdTxNYC7Behgw3Yv9Mcl5qKBv/SIJZdqTT0vc3OW13TDNtBfLE7ywJU95X6BW9yu8/RdKjCrQhE7Es02n3DJSz6Szs3OOd/8PebIgyK34xOLhgfK43uo1jc063LxL5UAsmt9eZ69BVBRzT/vlna99SDexYITboJpV+ONFcFMawoebWRwabFYP3JQ+auXSTuBeg//CzHZRLMOQsdzLsC0I6OfUlbgnlOZMg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[c07uFUtrw](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/86ovK6XHkCehA3KqeTdfQWpyZ1I09Ame>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 14 de diciembre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Guadalupe Peña Chora (director de tesis CIB-UAEM)
Dr. Iván Arenas Sosa (IBT-UNAM)
Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB-UAEM)
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB-UAEM)
Dr. Fernando Zúñiga Navarrete (IVSAS)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (CEIB-UAEM)
Dr. Erubiel Toledo Hernández (UAGRO)

Tesis: Caracterización de aislados bacterianos patógenos a *Dactylopius opuntiae* (Hemíptera: Dactylopiidae) cochinilla silvestre del nopal en el Estado de Morelos.

Alumno que lo presenta a revisión: HÉCTOR HERNÁNDEZ GUERRA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. VÍCTOR MANUEL HERNÁNDEZ VELÁZQUEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ | Fecha:2021-11-22 14:43:41 | Firmante

blmvEb1wUn9N3OWtV7/pHc2umCiEwxcNkM6ZMX15x9z554nQV8Mt85WYQguLw26OtiqZysEiNN2uBMPFzp4Vp/mCTilbm4UuChw0FsulEreIY28xHo09xcYABA9KpHsdcq78
YnZ4dSHt05UX732ooWPJEzjmORxZ+j6UE/PfD91671m3Kqto0+HCPRB+5gXPGtgV1x1g5ZghT71PQ6NzLAXmhlRaL3wrm7H3bMtZOclYFHKBaM1xHmqAkm+YQb17wE1+kk
ZzMyCV6peG39xtADzmJ6rZDs1XtUhDBi43gM8Aq9qaw06zDPLXaBMy6YAHEYY+vnaFG5K+Ec++rTYhA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



V0ChYO3xz

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/c6htG09mK5pwhPMkF4i3JzQeyLHbG9Y0>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 14 de diciembre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Guadalupe Peña Chora (director de tesis CIB-UAEM)
Dr. Iván Arenas Sosa (IBT-UNAM)
Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB-UAEM)
Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB-UAEM)
Dr. Fernando Zúñiga Navarrete (IVSAS)
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez (CEIB-UAEM)
Dr. Erubiel Toledo Hernández (UAGRO)

Tesis: Caracterización de aislados bacterianos patógenos a *Dactylopius opuntiae* (Hemíptera: Dactylopiidae) cochinilla silvestre del nopal en el Estado de Morelos.

Alumno que lo presenta a revisión: HÉCTOR HERNÁNDEZ GUERRA

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. ERUBIEL TOLEDO HERNÁNDEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ERUBIEL TOLEDO HERNÁNDEZ | Fecha:2021-03-03 13:20:12 | Firmante

XCfLhOuzPUeS+uBohiJU0dYnR9jUzU/XSrFjBi0uWnVHGfZ0X9dB4ypdDHJCeTlfoGfadRLVePHqv0/Fe7FB0i9uwnQQV2u7illb/SpplTopTA44va2PpPdE+DTVraQoGkpXarNL7AZEchoBVoXKBQx7YxKsyZbMR7AObgpvOBuDys/Yh9u+0LHdrrzGNCrwdoyaRDrmS2JKEtjRmgYA9oNKqczV2CD6gzE+XNABTXIEhDlwQCJOPXXOIn3edkP/fNRz2i6qt+zgDVbJqMwYHzPmwRLZ2xPioWpPgVMOBqdd2QFp09osCpgmex2uE94kFfo3tTgerVcJAqdzLJnw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[Cgve6L](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/QOPtWaiyPJkyWWTjquYebiPnQIDHNZr>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS PATÓGENOS A
Dactylopius opuntiae (HEMÍPTERA: DACTYLOPIIDAE) COCHINILLA
SILVESTRE DEL NOPAL EN EL ESTADO DE MORELOS.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES:
LÍNEA TERMINAL EN BIOTECNOLOGÍA
P R E S E N T A
HÉCTOR HERNÁNDEZ GUERRA

Director:
Dr. Guadalupe Peña Chora.
Codirector:
Dr. Víctor Manuel Hernández Velázquez.

Cuernavaca, Morelos

Diciembre del 2021



**CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS BACTERIANOS PATÓGENOS A
Dactylopius opuntiae (HEMÍPTERA: DACTYLOPIIDAE) COCHINILLA
SILVESTRE DEL NOPAL EN EL ESTADO DE MORELOS.**

Índice

	Pág.
Resumen	1
Abstract	2
Capítulo I.....	3
1. Introducción.....	3
Capítulo II.....	5
2. Antecedentes.....	5
2.1. <i>Opuntia ficus-indica</i> generalidades.....	5
2.1.1. Clasificación taxonómica, centro de origen y características morfológicas.....	5
2.1.2. Localización, importancia y principales usos.....	6
2.1.3. El nopal verdura en México y su problemática en la comercialización	6
2.1.4. Principales plagas y enfermedades en el cultivo del nopal.....	7
2.2. <i>Dactylopius opuntiae</i> “cochinilla silvestre del nopal”.....	8
2.2.1. Taxonomía de <i>D. opuntiae</i> (De Lotto,1974).....	8
2.2.2. Ciclo de vida y características morfológicas.....	9
2.2.3. Daños.....	11

2.2.4. Mecanismos de resistencia de la cochinilla a depredadores y ataque de microorganismos.....	12
2.2.4.1. Filamentos cerosos y antraquinonas	12
2.2.5. Manejo de <i>D. opuntiae</i>	12
2.2.5.1. Uso de productos para remoción de capa cerosa.....	13
2.2.5.2. Estrategias de manejo: cultural, mecánico, químico, biológicos y otros	14
2.3. Bacterias entomopatógenas.....	17
2.3.1. Virulencia y patogenicidad de las bacterias.....	17
2.3.2. Aislamiento de bacterias entomopatógenas de cadáveres de insectos.....	18
2.4. Postulados de Köch.....	19
2.5 <i>Bacillus thuringiensis</i>	20
2.5.1 Mecanismo de acción de <i>B. thuringiensis</i>	22
2.5.2 Factores de virulencia	24
2.6. Biosurfactantes producidos por bacterias	25
2.7. Justificación	29
Capítulo III.....	30
3. Hipótesis.....	30
3.1. Objetivo general	30
3.2. Objetivos específicos	30
Capítulo IV.....	31
4. Materiales y métodos	31

4.1. Colecta de cadáveres de <i>D. opuntiae</i> en cultivos de nopal verdura del Estado de Morelos, México.....	31
4.2. Aislamiento de bacterias patógenas	31
4.3. Establecimiento del pie cría de <i>D. opuntiae</i>	32
4.4. Bioensayos de patogenicidad y determinación de la virulencia de los aislados patógenos a <i>D. opuntiae</i>	33
4.4.1. Producción del complejo espora-cristal.....	33
4.4.2 Selección de aislados bacterianos patógenos a <i>D. opuntiae</i>	34
4.4.3. Bioensayos de patogenicidad.....	34
4.4.4. Determinación de la virulencia (CL ₅₀).....	36
4.5. Bioensayo de bioseguridad de las cepas HH10 y HH41 contra <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae).....	36
4.6. Análisis estadístico.....	37
4.7. Postulados de Köch.....	38
4.8. Identificación molecular de los aislados patógenos a <i>D. opuntiae</i>	39
4.8.1. Extracción de ADN de los aislados	39
4.8.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa para amplificación de los genes marcadores 16S ARNr y <i>gyrB</i> de las cepas HH10 y HH41.....	39
4.8.3 Identificación de los aislados patógenos a <i>D. opuntiae</i> y realización de árbol filogenético.....	40
4.9. Determinación de la producción de biosurfactantes.....	42
4.9.1. Preparación del inóculo y medio de cultivo utilizado para producción de biosurfactantes.....	42
4.9.2. Tensión superficial.....	43
4.9.3. Actividad hemolítica	45

Capítulo V	46
5. Resultados	46
5.1. Colecta de cadáveres de <i>D. opuntiae</i> en cultivos de nopal verdura en el Estado de Morelos, México.....	46
5.2. Aislamiento de bacterias.....	49
5.3. Bioensayos de patogenicidad	50
5.3.1. Selección de los aislados bacterianos.....	51
5.3.2. Bioensayos de patogenicidad las cepas HH10 y HH41	51
5.3.2. Bioensayo de bioseguridad contra <i>A. mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae)	53
5.3.4 Postulados de Köch de los aislados HH10 y HH41.....	53
5.4. Características morfológicas e identificación molecular de los aislados patógenos a <i>D. opuntiae</i>	57
5.5. Amplificación de gen 16S ARNr y <i>gyrB</i> de las cepas HH10 y HH41.....	58
5.5.1. Análisis BLAST de la secuencia de nucleótidos del gen 16S ARNr y <i>gyrB</i> de las cepas HH10 y HH41 y elaboración de árboles filogenéticos.	61
5.6. Evaluación de la Tensión superficial de los sobrenadantes de las cepas HH10 y HH41.....	66
5.7. Actividad Hemolítica de las cepas HH10 y HH41	68
Capítulo VI	69
6. Discusión	69
Capítulo VII	76
7. Conclusiones	76

Perspectivas.....	77
Capítulo VIII	78
8. Literatura.....	78

Índice de Figuras

Figura 1. Estadios de <i>D. opuntiae</i> con dimorfismo sexual en adultos.....	10
Figura 2. Cladodios infestados por hembras adultas de <i>D. opuntiae</i> en la localidad de San Agustín, Amatlipac, Tayacapan, Morelos.....	11
Figura 3. Aspecto de la aplicación de tensoactivos contra ninfas II de <i>D. opuntiae</i> . A) Inex-A al 0.5 %, B) Aplicación de terpenos de cítrico (Mass Derribe) al 0.025 %.....	13
Figura 4. Fases de esporulación de <i>B. thuringiensis</i> propuesto por Gebeshuber <i>et al.</i> , 2010.....	14
Figura 5. Ciclo propuesto por Guillen y Porcar (2012) integra plantas, excremento y suelo como subciclos de un ciclo principal centrado en insectos.....	22
Figura 6. Infestación de nopales crecidos en maceta dentro del invernadero del CIB-UAEM.....	33
Figura 7. A) Vasito que contiene el trozo de nopal infestado de cochinillas. B) Ninfas II agrupadas sobre corte de nopal para realizar los bioensayos de patogenicidad.....	
Figura 8. Sistema de alimentación en el que se realizaron los bioensayos de patogenicidad contra adultos de <i>A. mellifera</i>	34
Figura 9. Medida de la tensión superficial: 1. El líquido se pone en contacto con la placa: 2. Fuerza vertical ejercida sobre la placa: 3. Se forma la curva de interface: 4. Se produce el arranque.....	43
Figura 10. Método de placa-balance de fuerzas	44
Figura 11. Mapa de la zona Norte del Estado de Morelos donde se realizó la colecta de cadáveres de <i>D. opuntiae</i> , los puntos amarillos marcan las localidades de la toma de muestras (tomado de Google Maps).....	48

Figura 12. A) Aislado 26. B) Aislado 22. Ambos aislados presentan células en forma de bacilo con esporas observadas en microscopio compuesto a 100X.....	49
Figura 13. Bacterias aisladas de cadáveres de <i>D. opuntiae</i> , vistas de forma macroscópica con diferente tipo de crecimiento, borde, superficie, elevación y color.	50
Figura 14. Perfil proteico de cepas bacterianas aisladas de <i>D. opuntiae</i> . Carril 1. Peso Molecular: Carril 2. Cepa HH1: Carril 2. Cepa HH5: Carril 3. Cepa HH6: Carril 4. Cepa HH7: Carril 5. Cepa HH10: Carril 6. Cepa HH22: Carril 7. Cepa HH30.....	51
Figura 15. Porcentaje de mortalidad de <i>D. opuntiae</i> evaluada a las 96 h a diferentes concentraciones de proteína total del aislado HH10. Letras diferentes en los tratamientos indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (P<0.05).....	54
Figura 16. Porcentaje de Mortalidad de <i>D. opuntiae</i> evaluada a las 96 h a diferentes concentraciones de proteína total del aislado HH41. Letras diferentes en los tratamientos indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey (P<0.05).....	53
Figura 17. A) Ninfas II muertas en el tratamiento con la cepa HH10 con el complejo spora-cristal a una concentración de 450 µg/mL, coloración oscura de los insectos. B) Ninfa II muerta con la cepa HH41 a una concentración de 100 µg/mL, se observó una coloración anormal y aspecto deshidratado. C) Ninfa II con coloración normal rojiza del control. Ninfas tomadas de los bioensayos de patogenicidad.	54
Figura 18. A) Perfiles proteicos de las bacterias antes de ser aplicadas a ninfas de <i>D. opuntiae</i> . B) Perfiles de las bacterias recuperadas de los cadáveres en los bioensayos de patogenicidad. PM (Peso Molecular).....	55
Figura 19. Sistema digestivo de <i>D. opuntiae</i> observado bajo microscopio estereoscópico	56

Figura 20. Perfiles proteicos de los aislados HH10 Y HH41 obtenidos del sistema digestivo de ninfas II muertas en los bioensayos de patogenicidad. PM (Peso molecular).....	56
Figura 21. Características morfológicas de las cepas patógenas a <i>D. opuntiae</i> . A) Cepa HH10 con crecimiento redondo de color blanquecino, borde ondular y superficie áspera. B) Cepa HH41 con crecimiento redondo, borde ondular, color crema y superficie suave.....	57
Figura 22. Células bacterianas observadas en microscopio óptico a 100X. A) Cepa HH10 células vegetativas con forma de bastón con esporas y cristales proteicos. B) Cepa HH41 células vegetativas con presencia de esporas y cristal proteico.....	58
Figura 23. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio; amplicón del gen 16S ARNr con un tamaño de aproximadamente 1400 pb del aislado HH10 y aislado HH41.....	59
Figura 24. Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Green. Amplicón del gen <i>gyrB</i> con tamaño de alrededor de 1260 pb de la cepa HH10 y HH41. Control (-) sin ADN.....	60
Figura 25. Árbol filogenético de los aislados HH10 y HH41 determinada por el gen 16S ARNr.....	64
Figura 26. Árbol filogenético de los aislados HH10 y HH41 determinada por el gen <i>gyrB</i>	65
Figura 27. Disminución de la tensión superficial de las cepas HH10 y HH41 cultivadas en medio PGas hasta las 96 h. Diferentes letras en los tratamientos indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Tratamiento de agua fue tomada como control.....	67
Figura 28. a) Formación de halos en medio agar-sangre a causa de la aplicación del sobrenadante de las cepas HH10 y HH41 cultivadas hasta	68

las 48 h. b) Medio agar-sangre sin formación de halo por la aplicación de
medio de cultivo PGas.....

Índice de cuadros	Pág.
Cuadro 1. Biosurfactantes producidos por bacterias patógenas a insectos	27
Cuadro 2. Iniciadores y condiciones utilizadas en la PCR para la amplificación de los genes 16S ARNr y <i>gyrB</i>	40
Cuadro 3. Sitios de muestreo realizados de marzo a julio del 2016 en diferentes localidades del Estado de Morelos.....	47
Cuadro 4. Identificación molecular del aislado HH10 y HH41 mediante el marcador molecular 16S ARNr.	62
Cuadro 5. Identificación molecular del aislado HH10 y HH41 mediante el marcador molecular <i>gyrB</i> .	63

Glosario de términos y Abreviaciones

ADN (ácido desoxirribonucleico). Compuesto polimérico de desoxirribonucleótidos, estos nucleótidos constan de una base orgánica (adenina, timina, guanina o citosina), una molécula de azúcar (desoxirribosa) y un ácido fosfórico. La información genética está codificada por la secuencia de las diferentes bases.

Amplificación. Aumento en el número de copias de un gen o plásmido en una célula.

ARNr= ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal.

BLAST = Programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas.

BS = Biosurfactante

Bt = *Bacillus thuringiensis*

CL₅₀ = Concentración Letal Cincuenta ($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, ng/mL, ng/ μL)

Control biológico. Algunos autores consideran que es parte del control natural y usan el término para referirse a la acción de parásitos, depredadores o patógenos sobre una población de hospedadores o presas que produce una posición de equilibrio más baja. Además, implica el uso de microorganismos y se suele llamarlo "control microbiano".

Entomopatógeno. Es un microbio que afecta a los insectos (en general a artrópodos terrestres, incluidos los arácnidos), que suele causar mortalidad en el huésped (a diferencia de aquellos que mantienen una relación benigna).

EPA U.S = Agencia de Protección Ambiental

FAO = Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

GRAS = Generalmente reconocida como segura designada por FDA

Inoculación. El acto de introducir un microorganismo (en particular, un microorganismo patógeno) o virus sobre un organismo o sustrato. Cuando se trabaja con organismos, este término cubre todas las vías de administración, incluidas la inyección y la microalimentación.

PCR= Reacción en Cadena de la Polimerasa

rpm= Revoluciones por minuto

SENASICA = Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria

SIAP = Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

Resumen

El objetivo de este estudio fue aislar y seleccionar cepas bacterianas patógenas a *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae), una plaga de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae) comúnmente conocida como “cochinilla silvestre del nopal” para proponer agentes alternativos de control ecológico contra el insecto. Cuarenta y una cepas de bacterias formadoras de esporas fueron aisladas de cadáveres de adultos y ninfas de *D. opuntiae* colectados en cuatro localidades diferentes del estado de Morelos, México. Los bioensayos de patogenicidad y virulencia se realizaron mediante la aplicación directa del complejo espora-cristal formados en la fase estacionaria alcanzada a las 72 horas en el medio de cultivo HCT. En los bioensayos de patogenicidad, la cepa HH41 causó 30.78% de mortalidad en ninfas del segundo estadio a las 96 horas a una concentración de 100 µg/mL de proteína total, mientras que la cepa HH10 mostró una mortalidad del 62.52% a 450 µg/mL bajo las mismas condiciones. La virulencia se obtuvo solo de la cepa HH10, que muestra un valor de CL₅₀ de 403.293 µg/mL de proteína total. Los postulados de Köch se llevaron a cabo para corroborar que las cepas bacterianas eran los agentes patógenos de *D. opuntiae*. Las cepas HH10 y HH41 fueron identificadas molecularmente como *Bacillus thuringiensis* amplificando el gen 16S rRNA y *gyrB*. Se determinó, mediante la prueba de reducción de la tensión superficial y prueba de hemólisis, que las cepas HH10 y HH41 producen un biosurfactante (BS) los BS son moléculas anfifílicas que han sido reportadas con actividad insecticida. Para medir la tensión superficial se realizaron bioensayos (TS) con los sobrenadantes, lo que redujo el TS del agua de 72 mD /m a 55.3 para la cepa HH10 y a 53.2 para la cepa HH41. Finalmente, se realizaron pruebas de hemólisis para ambas cepas bacterianas, que fueron positivas.

Abstract

The objective of this study was to isolate and select pathogenic bacterial strains to propose an ecological alternative to control the insect *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae), a pest of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae) commonly known as “wild cochineal of the nopal”. Forty-one spore-forming bacterial strains were isolated from corpses of adults and nymphs of *D. opuntiae* collected in four different locations in the state of Morelos, Mexico. The bioassays were performed by direct application of the spore-crystal complex formed in the stationary phase reached after 72 hours, the strains were cultivated in HCT medium. In the pathogenicity bioassays, the HH41 strain showed a mortality of 30.78 % for seconds instar nymphs after 96 hours at 100 µg / mL of total protein, while the HH10 strain showed a mortality of 62.52% at 450 µg / mL under the same conditions. Virulence was obtained only the HH10 strain, which showed an LC₅₀ value of 403.293 µg / mL of total protein. Köch's postulates were carried out to corroborate that the bacterial strains applied were pathogenic to *D. opuntiae*. Strains HH10 and HH41 were molecularly identified to species level by amplification of the by 16S rRNA and *gyrB* genes as *Bacillus thuringiensis*. The production of a surfactant by the HH10 and HH41 strains was determined by a surface tension reduction test and hemolysis test, the BS are amphiphilic molecules that have been reported with insecticidal activity. Bioassays using the cell free, wasted culture media (CFM) were carried out in order to measure the effect on water surface tension (TS). HH10 and HH41 CFMS reduced the water from 72 to 55.3 mD/m and 72 to 53.2 mD/m respectively. The two strains showed positive hemolitical activity in tests performed using erythrocytes.

Capítulo I

1. Introducción

D. opuntiae es una plaga que está presente en más de 30 países de los cinco continentes: América, Europa, Asia, África y Australia, donde se cultiva el nopal *Opuntia spp.* (Ochoa y Barbera, 2017). México es el principal productor de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* Mill) con una producción de 853,495.22 toneladas en 12,428.35 hectáreas cosechadas con un rendimiento promedio de 68.67 ton/ha, siendo la variedad Milpa Alta la más comúnmente cultivada (SIAP-SAGARPA, 2018,).

El nopal se encuentra dentro de los productos agrícolas más importantes del Estado de Morelos y ocupa el primer lugar a nivel nacional con 4,141.00 ha cultivadas. El área de este cultivo se encuentra localizada en los municipios de Tepoztlán, Tlalnepantla, Tlayacapan y Totolapan, principalmente. La producción total de estos municipios en el año 2018 fue de 326,330 ton representando el 46.5 % de la producción nacional de nopal verdura (SIAP-SAGARPA, 2018).

En Morelos el 70 % de la producción de nopal tiene como destino el mercado nacional e internacional datos proporcionados por la Secretaria de Desarrollo Agropecuario del Estado de Morelos (SEDAGRO, 2015). El 30 % del producto se comercializa en el mercado local (Central de Abasto de Cuautla). El principal destino de las exportaciones de nopal verdura son varias ciudades de los Estados Unidos de Norteamérica: Houston, McAllen, Atlanta, New Jersey, Dallas y Los Ángeles (Maki-Díaz, 2014; SEDAGRO, 2019). En Morelos existen empresas como Nopalitos de Morelos SPR que exportan un tráiler semanal (20 toneladas) a Houston, Texas. En 2014 del total de las exportaciones de frutas y vegetales de México a Estados Unidos, el 26 % de las alertas de los embarques debido a la presencia de residuos de agroquímicos correspondieron al nopal verdura (SENASICA, 2015).

La producción de nopal verdura en México y en el mundo se ve afectada por diversas plagas siendo la cochinilla silvestre (*Dactylopius opuntiae*) la más importante por los daños que causa y a su amplia distribución en el continente americano. Debido a esta situación, el uso de agentes de biocontrol retoma un fuerte auge, ya que los plaguicidas de uso común como organosforados, carbamatos y piretroides, por mencionar algunos han causado efectos adversos en el ambiente y de residuos, además, de que actualmente no hay insecticidas químicos autorizados en México ni a nivel internacional que controlen *D. opuntiae* (Badii y Flores, 2001).

Dentro de los principales agentes de biocontrol de insectos plaga encontramos a las bacterias entomopatógenas, siendo el género *Bacillus* el más común, sin embargo, hasta la fecha la mayoría de los aislados de este género de bacterias han sido evaluados en contra de lepidópteros, coleópteros y dípteros (Palma *et al.*, 2014), estos insectos presentan una metamorfosis holometábola (completa) y la fase en la cual es aplicada el complejo espora-cristal es en el estado larval. Por el contrario, los estudios de bacterias que afectan a hemípteros (hemimetábolos) son muy escasos. La poca investigación en patógenos que afecten a esta plaga fue la razón para caracterizar aislados bacterianos patógenos a *D. opuntiae*.

Capítulo II

2. Antecedentes

2.1. *Opuntia ficus-indica* generalidades

2.1.1 Clasificación taxonómica, centro de origen y características morfológicas

El nopal verdura (*O. ficus-indica*) es miembro de la familia Cactaceae, las especies de esta familia son endémicas del continente americano y se desarrolla en regiones áridas y semiáridas. El centro de origen de diferenciación de estas cactáceas se dio en el Golfo de México y el Caribe (Griffith, 2004).

El nopal es una planta arbustiva que puede medir hasta 1.7 m de altura, su sistema radical es muy extenso y superficial que puede extenderse varios metros de forma horizontal, con muchas raíces finas absorbentes y superficiales. Presenta un tallo lignificado de color verde, gris o castaño oscuro, de forma cilíndrica con un ancho de 20 cm y un largo de 45 cm desde su base y posteriormente, se ramifica en cladodios de forma elíptica, circular, ovada o rómbica por lo general de color verde, con o sin espinas dependiendo de la variedad. En ambas caras del cladodio hay yemas, denominadas “aréolas” que poseen la capacidad para desarrollar cladodios, flores y raíces.

En las cavidades de las aréolas presentan dos tipos de espinas: unas pequeñas y agrupadas en gran número llamadas “gloquidios”, y otras grandes que son hojas modificadas (Reyes-Agüero, 2005). Las estomas de los cladodios permanecen cerradas durante el día para evitar la deshidratación.

2.1.2. Localización, importancia y principales usos

El género *Opuntia* es el más importante con 350 especies, de las cuales 100 se encuentran en México. Este género se distribuye desde Canadá hasta Argentina (Bravo, 1978). El nopal *O. ficus-indica* tiene diversos usos tales como: forrajero, medicinal y como fruta. En México tiene una importancia en el aspecto social, económico y cultural, principalmente como nopal verdura también llamado “nopalito”. La producción de nopalitos se da bajo tres sistemas que son: nopaleras silvestres, huertos familiares y plantaciones comerciales, de ahí que México es el principal productor y consumidor de nopal a nivel mundial, además de poseer el mayor número de variedades (Flores-Valdez, 1995).

2.1.3 El nopal verdura en México y problemática en su comercialización

En México el nopal verdura está ubicado dentro de las 15 hortalizas más importantes y es el principal productor a nivel mundial. Los principales productores son la Ciudad de México, Morelos, Puebla, Tamaulipas, Zacatecas, Aguascalientes, y Jalisco, entre otros y cabe mencionar que Morelos aporta cerca del 40% de la producción total nacional (SIAP-SAGARPA, 2018).

El nopal de exportación al igual que todas las frutas y verduras necesita cumplir con leyes que exigen cada país que importa, los cuales mediante sus leyes de sanidad prohíben primordialmente la importación de alimentos que contengan sustancias tóxicas, o que representen un potencial de riesgo a la salud humana. En México el Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria establece los límites máximos permitidos de agroquímicos presentes en los alimentos (SENASICA, 2015).

SENASICA reportó en 2007 la presencia de residuos de Ometoato, Paratión Metílico y Metamidofós, en nopal verdura de la Central de Abastos de Cuautla, Morelos. Posteriormente en abril del 2014, la Food and Drug Administration (FDA) reportó una alerta en la importación debido a la presencia de residuos del plaguicida Monocrotofós en nopal verdura procedente de Tlayacapan y Tlalnepantla, Mor., ordenando por primera vez el retiro de nopales en fresco de supermercados de Estados Unidos por presentar residuos de estos plaguicidas (FDA, 2014).

En general la utilización de los agroquímicos en el control de la cochinilla ha provocado consecuencias desfavorables a productores y consumidores, además de incrementar los costos de producción (Palacios-Mendoza *et al.*, 2004; Viguera, 2008).

2.1.4 Principales plagas en el cultivo del nopal.

Dentro de las diversas plagas insectiles que ocasionan pérdidas económicas se encuentran aquellas que afectan directamente a los cladodios provocando una disminución en la producción: dentro de ellas está el picudo del nopal (*Metamasius spinolae*) considerada una plaga primaria. En su estado larvario construye galerías en los cladodios, causando la caída de estos, pérdida de vigor, o bien propicia la entrada de microorganismos fitopatógenos que pudren la planta, la pupa se resguarda en el tallo ahuecado de la planta, que proporciona un ambiente protegido para la hibernación de la pupa. En su estado adulto se alimenta de los bordes de los cladodios maduros y nopales tiernos o en crecimiento, lo cual demerita su calidad (Hernández, 1993; Delgadillo *et al.*, 2008), los adultos se pueden encontrar de mayo a septiembre; son insectos relativamente grandes de 23 a 36 mm de longitud (Granados y Castañeda, 1991).

También es atacada por el barrenador de la unión de las pencas (*Metapleura potosí*) en su estado larval barrena los cladodios haciendo túneles, a veces se

pueden encontrar hasta 15-20 larvas en un solo cladodio, induciendo la pudrición parcial o, puede causar que el cladodio caiga al suelo; sin embargo, en la mayoría de los casos, el daño no es significativo (Inglese *et al.*, 2018). Otra plaga más es la chinche roja del nopal (*Hesperolabops nigriceps*) que en su estado ninfal y adulto succionan la savia ocasionando secciones secas en la planta, además, de interferir con la fotosíntesis de la planta su síntoma se conoce como "cacarizo del nopal" (Palomares-Pérez *et al.*, 2010).

2.2 *Dactylopius opuntiae* “cochinilla silvestre del nopal”

Dactylopius opuntiae (Cockerell) es una plaga primaria en México, Brasil, España, Turquía, Israel y Marruecos (Githure *et al.*, 1999; Portillo y Viguera, 2006; Vanegas-Rico *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2013; Spodek *et al.*, 2014). La cochinilla silvestre del nopal es considerada como la plaga más común e importante en la producción del nopal verdura en el estado de Morelos (COLPOS, 2005; Vanegas-Rico *et al.*, 2010). Ocasiona grandes pérdidas económicas en la producción de nopal, tuna y carmín (Nierto y Llanderal, 1996), esta plaga se encuentra prácticamente todo el año en las plantaciones de nopal.

2.2.1 Taxonomía de *D. opuntiae* (De Lotto, 1974)

Reino: Animal

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Sub Orden: Stenorrhyncha

Superfamilia: Coccoideae

Familia: Dactylopiidae

Género: *Dactylopius*

Especie: *D. opuntiae* (Cockerell)

2.2.2 Ciclo de vida y características morfológicas

El ciclo de vida de *D. opuntiae* se encuentra dividido en tres estadios de desarrollo que son huevo, ninfa y adulto (**Figura 1**). La duración de cada estadio depende del sexo del insecto.

Cada hembra oviposita un promedio de 131 huevecillos y el tiempo que tardan en eclosionar es de una semana, posteriormente, pasa al estado ninfal que comprende dos instares, cada uno de ellos tiene una duración aproximada de 18 a 20 días. Algunos autores mencionan que el insecto macho presenta un estado de prepupa que en realidad no corresponde a una metamorfosis hemimetabola, porque es un estado en donde el adulto macho se envuelve con los filamentos cerosos formando un tipo de capullo. La hembra adulta vive durante 38.4 días, mientras que el macho adulto 4.2 días. El promedio del ciclo biológico para la hembra es de 77 días y para el macho de 43.3 días (Romero-López *et al.*, 2006).

Dactylopius opuntiae es una plaga que se encuentra presente durante todo el año causando daños al cultivo del nopal. La dispersión de las hembras se da solo en su estado ninfal I por medio de las corrientes de viento, es en esta etapa cuando machos y hembras son móviles y suben a la parte más alta de los cladodios para aprovechar los vientos (Pérez, 1991), las hembras llegan a dispersarse hasta cuatro o cinco metros de distancia por esta vía, sin embargo, los machos son alados en su estado adulto y no requieren ser dispersados por este mecanismo (Romero-López *et al.*, 2006).

Descripción de los estadios:

Huevos. Son de forma ovalada, con un corion delgado y transparente, no presenta ornamentaciones, su longitud es de 672 μm y un ancho de 330 μm (Montiel *et al.*, 1998).

Ninfa I y Ninfa II. La ninfa I es de color rojo claro y muy activas (móviles), después de una semana de haber emergido comienza a secretar una sustancia blanquecina de color blanco, parecido al talco. La ninfa II permanece fija al cladodio aumentando ligeramente su tamaño y es un poco más oscuro, la secreción filamentosa se torna más densa cubriendo totalmente el cuerpo (Romero- López *et al.*, 2006).

Hembra. Son de cuerpo oval, ápteras, con antenas cortas formada por siete segmentos, patas cortas, poseen un aparato bucal de tipo chupador.

Machos. Son alados (un solo par de alas con poca venación) miden aproximadamente un milímetro (Rodríguez *et al.*, 2005).

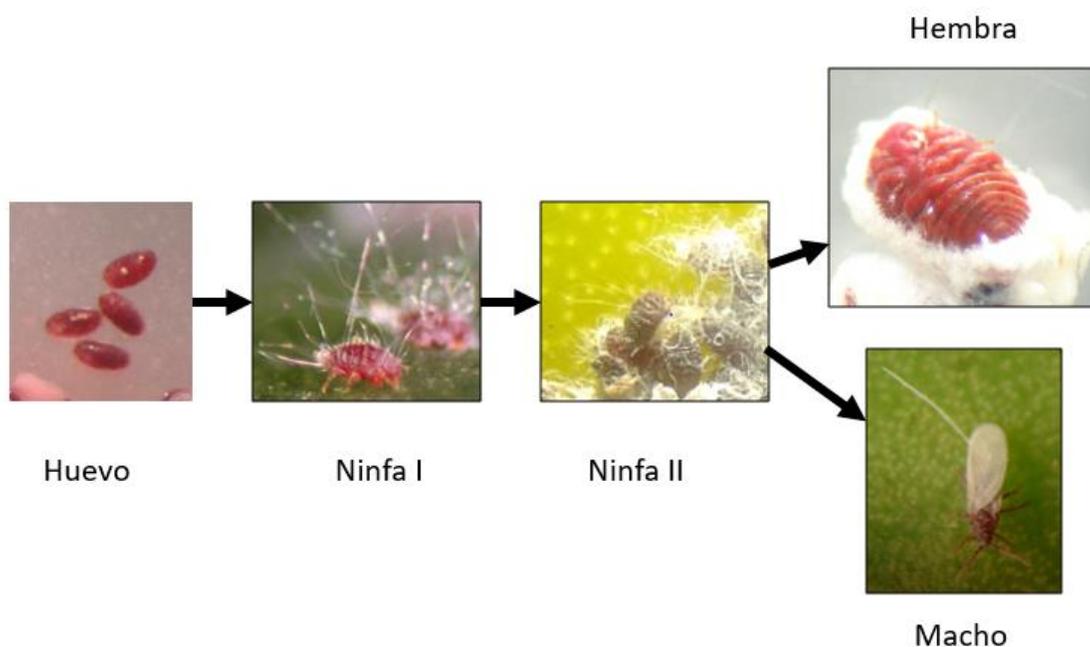


Figura 1. Estadios de *D. opuntiae* con dimorfismo sexual en adultos

2.2.3 Daños

La cochinilla causa un daño directo al succionar la savia, provocando clorosis en los cladodios. Esto favorece la entrada de agentes patógenos como hongos y puede causar la caída prematura de los cladodios (**Figura 2**), disminuyendo el rendimiento de nopal; una infestación de este insecto mayor al 75 % en la superficie de los cladodios causa la muerte de la planta (Mann, 1969; Vanegas-Rico *et al.*, 2010).

En algunos casos se ha documentado que la alta densidad de esta plaga puede causar la muerte de la planta en solo 6 meses en plantaciones de un año (Pérez y Becerra, 2001). En algunos otros casos compite con la grana cochinilla (*Dactylopius coccus*) afectando la producción de ácido carmínico que es utilizado como colorante natural (Castillo, 1993).

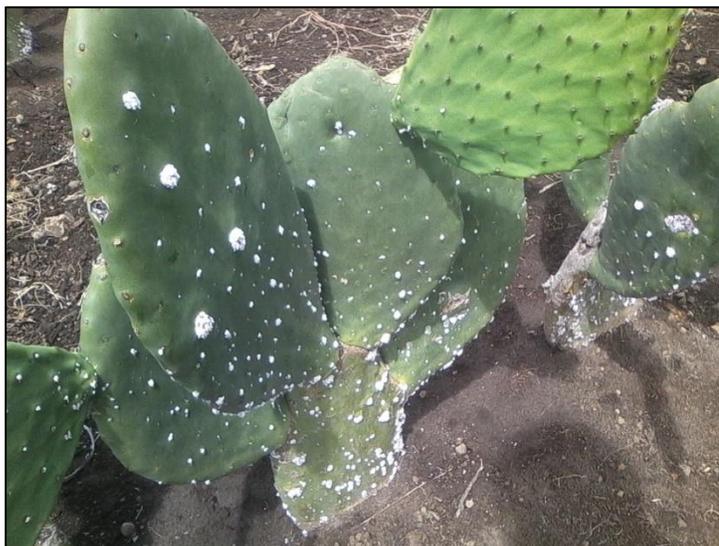


Figura 2. Cladodios infestados por hembras adultas de *D. opuntiae* en la localidad de San Agustín, Amatlipac, Tayacapan, Morelos.

2.2.4 Mecanismos de resistencia de *D. opuntiae* a depredadores y ataque de microorganismos

2.2.4.1 Filamentos cerosos y antraquinonas

Los filamentos cerosos o polvo blanquecino que cubren el cuerpo del insecto son secreciones que se forman desde la ninfa I hasta su estado adulto, además de una capa cerosa llamada Coccicerina secretada por glándulas pequeñas ubicadas en el integumento. Los filamentos también llamado revestimiento de hilos o láminas finas son un mecanismo de defensa de la cochinilla contra sus enemigos o depredadores naturales o bien para protegerse de factores climatológicos adversos (Méndez, 1992).

El ácido carmínico se encuentra presente en la hemolinfa, tejido muscular de embriones, huevos, ninfas y hembras grávidas (Eisner *et al.*, 1980). Químicamente, este ácido está compuesto por una metil-antraquinona hidroxilada unida a una glucosa mediante enlaces carbono-carbono (Hernández-Hernández, 2005). Este ácido se encuentra en todas las especies de *Dactylopius* y le sirve como defensa de los depredadores (Mann, 1969). La antraquinona es usada por los insectos como antibiótico contra microorganismos patógenos (Kunze *et al.*, 1996).

2.2.5 Manejo de *D. opuntiae*

Diversos métodos de manejo se han implementado para controlar a esta plaga, sin embargo, no se ha tenido un efecto satisfactorio. El cuerpo del insecto se recubre de una cera que lo protege contra factores ambientales, insectos depredadores e incluso de plaguicidas (Tulloch, 1970). La mejor opción para iniciar el control de este insecto es en etapa joven que corresponde a ninfa I antes de que desarrollen la capa algodonosa protectora (Mena, 2008).

2.2.5.1 Uso de productos para remoción de la capa cerosa

En la actualidad se han utilizado algunos productos químicos que ayudan a mejorar la actividad de los insecticidas como lo son productos que actúan como adherentes, surfactantes, dispersantes y humectantes. Los surfactantes mejoran el contacto con las capas cerosas y protectoras de quitina de los insectos (Richards, 1951). Para la remoción de capas cerosas se aplican alcoholes etoxilados, terpenos de cítricos, glicol de óxido de etileno, entre otros. Algunos de estos ya están a la venta de forma comercial como el Inex-A surfactante no iónico con un amplio poder de humectación, penetración y dispersión, que sirve como coadyuvante en las aplicaciones de agroquímicos en general (Vera-Nuñez *et al.*, 2010).

El producto comercial llamado Mass Derribe es considerado un insecticida de origen natural a base de terpenos de cítricos, que mejora la humectación, dispersión y penetración, además de acelerar el tiempo de respuesta de insecticidas y fungicidas (**Figura 3**) distribuido por la Empresa Insumos Orgánicos de Puebla. Es un producto potencializador en aplicaciones al follaje en todos los cultivos, ayuda en el control de insectos de cuerpo blando como: larvas, grana cochinilla, huevecillo de mosca blanca, pulgón y araña roja entre otros.



Figura 3. Aspecto de la aplicación de tensoactivos contra ninfas II de *D. opuntiae*. a) Ninfas sanas del tratamiento control, aplicación solo de agua. b) Inex-A al 0.5 %, filamentos serosos disueltos. c) Aplicación de terpenos de cítrico (Mass Derribe) al 0.025 % ninfas deshidratadas.

2.2.5.2 Estrategias de manejo: cultural, mecánico, químico, biológico y otros.

Para el manejo de esta cochinilla en campo, se han utilizado diversos métodos de control entre los cuales encontramos al **cultural** que está basado en la selección para la siembra de cladodios o pencas libres de insectos (Delgadillo *et al.*, 2008).

En el **control mecánico** se recomienda cortar los cladodios altamente infestados, esta práctica es llamada “despenque”, estas pencas deben ser incorporadas en el centro de los surcos con la ayuda de un motocultor (implemento utilizado para moler los cladodios desechados), de no realizar esta labor se tiene el inconveniente de mantener un foco de infestación. Otra actividad que se realiza en los huertos comerciales es el cepillado de los cladodios con escoba, cuando las infestaciones son bajas (Palacios-Mendoza *et al.*, 2004).

El método de control más utilizado por los productores es el **químico**, actualmente existen algunos ingredientes activos autorizados en México para el control de diversas plagas que afectan al nopal; tales como flupyradifurone, carbarilo, sales potásicas de ácidos grasos, aceite vegetal de maíz, extracto de canela, extracto de aceite de neem, argemonina+berberina+ricinina+a-terthienil (COFEPRIS, 2019). Sin embargo, estos ingredientes no son comúnmente utilizados en campo y, por el contrario, son los insecticidas no autorizados pertenecientes al grupo de organofosforados y piretroides los más usados en los campos morelenses. Entre los organofosforados encontramos a los siguientes: malation, chlorpirifos, ometoato, dimetoato, monocrotofos, metidation. Entre los piretroides: cipermetrina, permetrina, lambda cialotrina.

El control biológico se da por la acción de los enemigos naturales, como son los depredadores que se alimentan de la cochinilla o también por microorganismos llamados entomopatógenos, como lo son los hongos y bacterias que provocan infecciones llevando a la muerte del insecto plaga.

Tanto en nopal verdura y nopal tunero, la cochinilla tiene diversos enemigos naturales y han sido reportados en estudios realizados en la parte centro del país, particularmente en Tlalnepantla, Mor. y Teotihuacán, Estado de México reportándose seis especies, entre ellos coccinélidos, piralidos y neurópteros (Vanegas *et al.*, 2010; Cruz-Rodríguez *et al.*, 2016).

El depredador más abundante que se ha reportado es *Chilocorus cacti* (L), junto con *Hyperaspis trifurcata*, ambos coleópteros de la familia Coccinellidae. Dentro de los dípteros ese encuentran *Leucopsis bellula* y *Salpingogaster cochenillivorus*. Del orden Lepidóptera se reporta a *Laetillia coccidivora*, entre los neurópteros están dos especies que son *Symphorobius angustus* y *S. barberi* (Cruz-Rodríguez *et al.*, 2016).

Los entomopatógenos reportados contra *D. opuntiae* son *Beauveria bassiana* con una mortalidad arriba del 60 % en ninfas I a una concentración de 10^8 conidios por mililitro (Santos *et al.*, 2011) y *Fusarium incarnatum-equisetum* a una concentración de 106 esporas por mililitro más extracto de *Ricinus cumunis* y *Poincianella pyrmidalis* provocó la muerte del 61.233 al 100 % de mortalidad de hembras adultas, sin embargo, el hongo no fue evaluado de forma individual (Da Silva *et al.*, 2016)

Fusarium incarnatum-equisetum pertenece a un complejo de especies en donde, algunos de ellos suponen una amenaza para la salud pública por provocar infecciones superficiales como queratitis en piel y uñas, infecciones profundamente invasivas y diseminadas de forma hematológica pudiendo causar una alta mortalidad. Los miembros de este complejo de especies son ubicuos, principalmente saprobios, patógenos o invasores secundarios de hábitats ambientales, plantas, humanos y animales (Desjardins, 2006).

Se han evaluado otras alternativas de control contra la cochinilla, como el uso de aceites vegetales comestibles reciclados para el control de ninfas y hembras adultas, estos aceites fueron aplicados a una dosis de 4 ml de aceite y 0.4 g detergente en 125 ml de agua mediante pulverizadores manuales, teniendo como resultado que el aceite de oliva sin reciclar produjo una reducción del 89.6 %, seguido del aceite de oliva reciclado con una reducción poblacional del 82.1 %; aceite de canola en un 78.5 % y maíz reciclado en un 77.3 % en ninfas. Además, la densidad poblacional de las hembras adultas registrada con aceite de oliva nuevo fue de 3.7 %, aceite de oliva reciclado 6.6 %, canola reciclado 8.2 % y soya reciclado 8.4 %, comparados con el testigo que presentó 10.2 %. (Cuevas-Salgado, 2015). Sin embargo, el uso de estos aceites afecta la cutícula de los cladodios ya que las altas temperaturas llegan a provocar quemaduras.

2.3 Bacterias entomopatógenas

Las bacterias entomopatógenas son aquellas capaces de causar enfermedad a insectos que se encuentran bajo condiciones normales de resistencia del hospedero y rara vez llegan a vivir en asociación con él sin llegar a causarle una enfermedad (Onstad *et al.*, 2006).

Las bacterias pueden ser clasificadas en oportunistas, potenciales y facultativas. Las oportunistas son aquellas que no ordinariamente pueden llegar a causar la enfermedad, pero bajo ciertas condiciones logran causar la enfermedad, mientras que las potenciales son aquellas que no tienen un método para invadir o infectar al huésped, pero puede causar una enfermedad si estas llegan a entrar, por ejemplo, a través de una herida, además de que no son muy específicas. Por último, las facultativas se definen como las que pueden infectar y multiplicarse en su hospedero y también son capaces de hacerlo en el ambiente y en medios de cultivo *in vitro* (Onstad *et al.*, 2006).

Entre los géneros de bacterias entomopatógenas más utilizados en el manejo de diversas plagas insectiles se encuentran: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lysinibacillus*, *Serratia* y *Chromobacterium* (Sharma, 2012; Lacey, 2017).

2.3.1 Virulencia y patogenicidad de las bacterias

En las diversas áreas de la patología se define a la patogenicidad como un término amplio, y que implica a la virulencia como la gravedad de la manifestación de la enfermedad que solo es medida en los individuos infectados, mientras que la patogenicidad se define como la calidad o estado de ser patógeno, con el potencial o capacidad de producir una enfermedad, es decir, que la patogenicidad es cualitativa mientras que la virulencia es cuantitativa, la patogenicidad solo es un

concepto de todo o nada. La virulencia es el poder que tiene un microorganismo para causar una enfermedad, es decir, indica el grado con el que mata, la virulencia es estimada en base a bioensayos de dosis-respuesta llamada CL_{50} que se refiere a la concentración necesaria para matar al 50% de los individuos expuestos a los tratamientos (Stephen y Elkinton, 2004).

2.3.2 Aislamiento de bacterias entomopatógenas de cadáveres de insectos

La mayoría de los insectos son comúnmente expuestos a microorganismos patógenos y parásitos, sin embargo, pocas bacterias son capaces de provocar la patogenicidad. Diversos patógenos que causan enfermedades en los insectos, incluidos virus, hongos, bacterias, protistas y nematodos, en su mayor parte son específicos de los insectos y no tienen ningún efecto sobre otros organismos (Vega y Kaya 2012).

Bacillus thuringiensis se ha aislado en todo el mundo en una gran diversidad de ecosistemas, incluidos el suelo, el agua, insectos muertos, polvo de silos, hojas de árboles de hoja caduca y diversas coníferas. *Bacillus thuringiensis* fue aislado por primera vez de larvas muertas de *Bombix mori* (Aizawa, 2001).

El primer intento de utilizar una bacteria para controlar insectos se le atribuye a Felix d'Herelle (d'Herelle, 1911), quien aisló una bacteria de saltamontes mexicanos a la que nombro *Coccobacillus acridorum* y la aplicó en varios países latinoamericanos, sin embargo, otros investigadores la intentaron usar para controlar a esta plaga y no pudieron confirmar que era una gente de control biológico, para 1959 Gordon Bucher obtuvo un cultivo de *C. acridorum* y la identifico como un saprofito común del saltamontes (Bucher, 1959), mostrando la importancia de llevar a cabo los Postulados de Koch.

2.4 Postulados de Köch

Uno de los principios básicos de la patología es la aplicación de los postulados de Köch que tiene como objetivo conocer el agente etiológico que causa una enfermedad a microorganismos de una especie. Robert Köch (1843-1910), médico alemán considerado uno de los fundadores de la microbiología, realizó brillantes descubrimientos sobre los agentes causales del ántrax, la tuberculosis y el cólera a través de la aplicación de los postulados que llevan su nombre.

En patología de insectos los postulados de Köch según lo expresado por Tanada y Kaya (1993) son:

1. Un organismo patógeno específico debe ser observado en todos los casos de una enfermedad.
2. Este organismo debe ser aislado en un medio de cultivo puro.
3. El organismo debe reproducir la enfermedad en los animales de experimentación.
4. El mismo organismo debe ser recuperado del animal experimental.

Aunque no siempre es posible cumplir los postulados de Koch debido a que uno o más pasos no se puede llevar a cabo, por ejemplo, en algunos casos los organismos no crecen en medio de cultivo puro ya que necesitan tejidos vivos (parásitos obligados). Por otro lado, algunos organismos son difíciles de detectar y aunque el microscopio electrónico ha hecho posible visualizar organismos submicroscópicos como virus, rickettsias y mollicutes en insectos infectados, esto no demuestra que sean los agentes causales de la enfermedad. Además, diferentes patógenos pueden producir signos, síntomas y síndromes similares que pueden conducir erróneamente a designar el organismo equivocado como el agente etiológico (Vega y Kaya, 2012).

2.5 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es un patógeno facultativo que puede infectar y multiplicarse en animales hospedadores e insectos, pero también es capaz de multiplicarse en el medio ambiente, generalmente puede ser cultivado de manera *in vitro* (Onstad *et al.*, 2006). Esta bacteria sintetiza inclusiones cristalinas paraesporales con una alta especificidad hacia sus hospederos y han ganado una amplia importancia alrededor del mundo como una alternativa a los insecticidas químicos. Es seguro para los seres humanos y es el bioplaguicida compatible con el medio ambiente más utilizado en todo el mundo. Además, se han incorporado genes de proteínas insecticidas en varios cultivos importantes, haciéndolos resistentes a los insectos y proporcionando así un modelo para la ingeniería genética en la agricultura (Lacey *et al.*, 2001).

El ciclo de vida de *B. thuringiensis* se caracteriza por dos fases que incluyen la división celular vegetativa y el desarrollo de esporas, también conocido como ciclo de esporulación. La célula vegetativa tiene forma de bastoncillo (2-5 μm de largo y alrededor de 1.0 μm de ancho) y se divide en dos células hijas uniformes mediante la formación de un tabique de división iniciado en la mitad de la membrana plasmática. La esporulación, por otro lado, implica una división celular asimétrica y se caracteriza por siete etapas que incluyen (etapa I) formación de filamentos axiales; formación del tabique de esporas (etapa II); engrosamiento (etapa III); primera aparición de cristales paraesporales y formación preesporas, formación de exosporium (estadios IV a VI); pared celular primordial, corteza y capas de esporas acompañadas de transformación del nucleóide de esporas y (estadio VII) maduración de esporas y lisis de esporangios (Ibrahim *et al.*, 2010), todas estas etapas se muestran en la **Figura 4**.

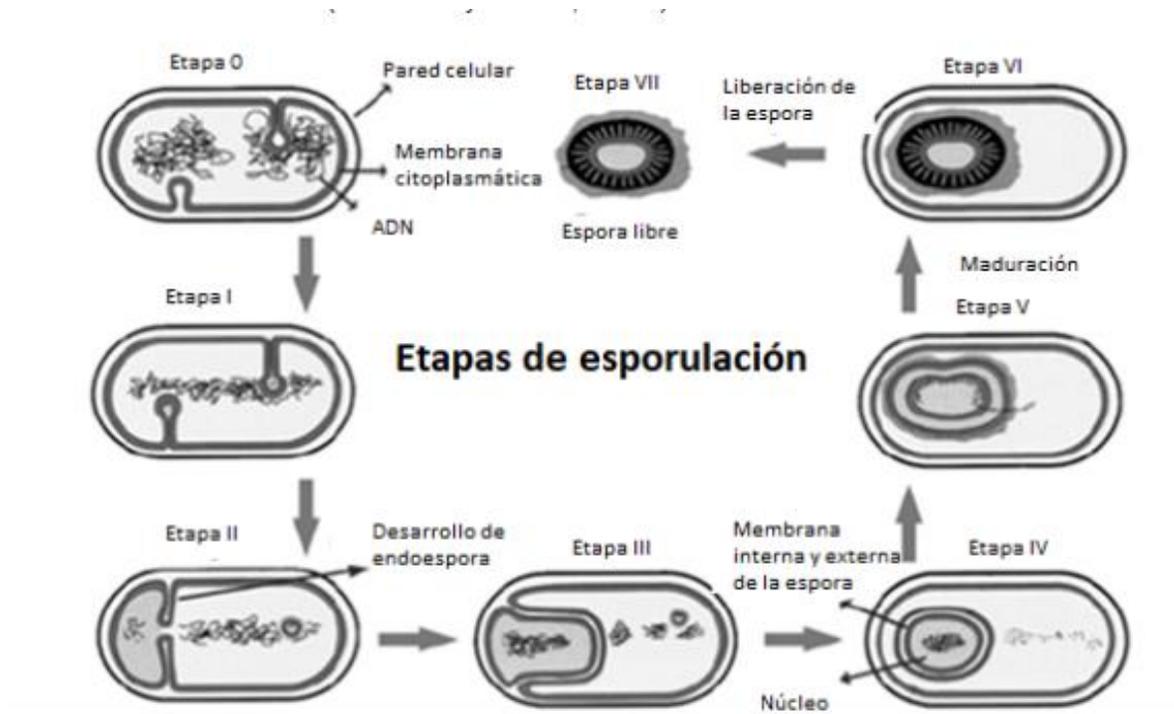


Figura 4. Fases de esporulación de *Bacillus thuringiensis* propuesto por Gebeshuber *et al.* (2010).

La forma del cristal es variable dependiendo de las toxinas presentes en el cristal y las condiciones de crecimiento. Entre los aislamientos naturales, las morfologías más comunes son bipiramidales y circulares o redondas (Martin y Travers, 1989; Bernhard *et al.*, 1997).

Bacillus thuringiensis es una bacteria ubicua y algunos autores como Guillen y Porcar (2012) proponen que sus hábitats están centrados en insectos como se muestra en la **Figura 5**.

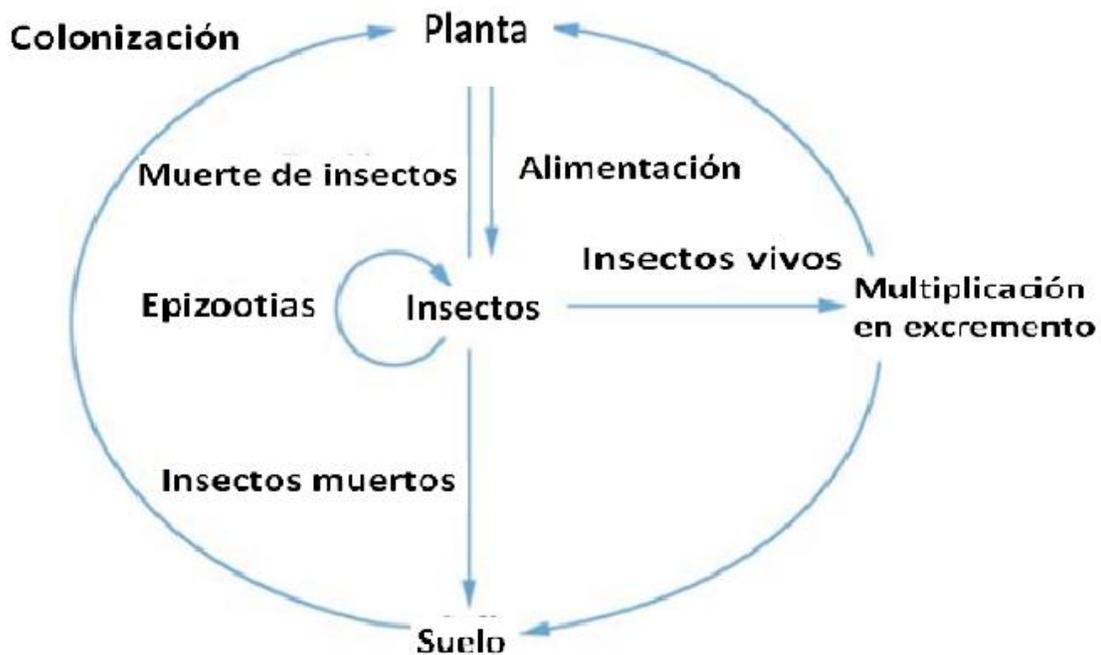


Figura 5. Ciclo propuesto por Guillen y Porcar (2012) integra plantas, excremento y suelo como subciclos de un ciclo principal centrado en insectos.

2.5.1 Mecanismo de acción de *Bacillus thuringiensis*

El primer modelo nos habla de la formación de un poro lítico, las protoxinas son ingeridas por las larvas y se solubilizan debido a un pH alcalino en condiciones reductoras del intestino. Las protoxinas son divididas por proteasas dando como resultado la formación de fragmentos resistentes a proteólisis con un tamaño de 60 kDa. (Pardo-López *et al.*, 2013). La toxina activada primero se une con baja afinidad a aminopeptidasa (APN) y fosfatasa alcalina (ALP) proteínas abundantes en la membrana, esta interacción coloca a la toxina cerca de las microvellosidades de la

membrana en donde se encuentra el receptor caderina, la interacción con esta proteína desencadena una ruptura de la región amino terminal de la toxina, incluyendo la hélice alfa-1 y parte de la hélice alfa-2a. Un cambio en la conformacional que resulta en la oligomerización de la toxina (Gómez *et al.* 2002; Pardo-López *et al.*, 2013).

La estructura del oligómero de la toxina es aún desconocida, pero se propone que se forme mediante el ensamblaje de tres a cuatro moléculas, se sabe que la hélice alfa-3 es importante en la oligomereización de las toxinas, ya que cuando se le realizan mutaciones a esta zona, pierde su toxicidad, pero aún puede unirse a receptores de toxinas con afinidad similar como caderina (Jiménez-Juárez *et al.*, 2007).

El oligómero de la toxina muestra una mayor afinidad por los receptores de APN y ALP (Pacheco *et al.*, 2009; Arenas *et al.*, 2010) y se propuso que esta interacción es necesaria para ayudar en la inserción de la toxina oligomérica en la membrana para formar el poro que mata las células del intestino medio del insecto, además, las hélices alfa-4 y alfa-5 se insertan en la membrana durante la formación de poros (Girard *et al.*, 2008; Zavala *et al.*, 2011; Pardo-López *et al.*, 2013).

El segundo modelo está basado en una cascada de señalización en donde muchos organismos patogénicos y sus toxinas tienen como objetivo atacar a los receptores celulares de los hospederos, la consecuencia de esto es alterar eventos de señalización que conduzcan una actividad aberrante o muerte de células. Sin embargo, existe poca información sobre los mecanismos celulares y moleculares asociados a la acción insecticida. Recientemente se ha reportado que la toxina Cy1Ab producida por *B. thuringiensis* mata las células del insecto por la activación de un evento citotóxico dependiente de Mg²⁺, bajo la unión de la toxina a sus receptores BT-R1, esta unión provoca la muerte de las células por activación de una

vía de señalización aun no descrita, involucrando a la estimulación de la proteína G y la adenil ciclasa, que incrementan los niveles de cAMP y la activación de la proteína kinasa A. Esta inducción se ve manifestada por cambios citológicos secuenciales que incluye ampollas membranales, aparentes núcleos fantasmas, inflamación celular y lisis (Zhang *et al.*, 2006).

2.5.2 Factores de virulencia

La producción de algunos factores de virulencia esta correlacionado con la patogenicidad y muchos de ellos están regulados por el regulon PlcR (Gohar *et al.*, 2008), los factores de virulencia incluyen la velocidad de replicación dentro de un insecto, producción de enzimas y metabolitos tóxicos (Hukuhara, 1987). La patogenicidad bacteriana es un proceso complejo que involucra una amplia gama de componentes extracelulares y de la pared celular, que se expresan de manera coordinada durante las diferentes etapas de la infección, alterando el equilibrio entre las bacterias y el huésped. Se reconocen siete factores de virulencia que han sido ampliamente estudiados los cuales son: la detección de quórum, biopelículas bacterianas, motilidad bacteriana, toxinas bacterianas, pigmentos bacterianos, enzimas y surfactantes bacterianos o biosurfactantes (Silva *et al.*, 2016).

La característica entomopatógena de *B. thuringiensis* depende de la expresión de los factores de virulencia incluyendo, toxinas, quitinasas, proteasas, fosfolipasas (Heimpel, 1967). Además de esos factores, las proteínas S-layer se encuentran en la superficie de muchas bacterias como estructuras cristalinas proteicas. Las proteínas S-layer cumplen diversas funciones, pudiéndose encontrar como soporte estructural de membrana (exoesqueleto), pueden estar involucradas en el transporte de iones o macromoléculas, en el reconocimiento de otras células y pueden participar como factor de virulencia en algunas bacterias patógenas, o

proteínas tóxicas en algunas cepas (Engelhardt, 2007; Peña *et al.*, 2006; Sara y Sleytr, 2000).

2.6 Biosurfactantes producidos por bacterias

Hay pocos reportes de biosurfactantes contra plagas, la forma en que actúan estas moléculas anfifílicas es que interactúan con la membrana celular de las larvas y también puede tener un efecto al perturbar las propiedades físicas de la membrana (Jang *et al.*, 2013).

Los biosurfactantes son tensoactivos que de manera natural son producidos por bacterias, hongos e incluso algunas especies de plantas (Kosaric y Vardar-Sukan, 2015). Estas moléculas anfifílicas de origen natural, con propiedades similares a los surfactantes sintéticos, tienen la capacidad de reducir la tensión superficial del agua en la interfaz y llegan a formar estructuras agregadas denominadas micelas (Toribio *et al.*, 2014). En 2013 se aisló un metabolito producido por *Bacillus amyloliquefaciens* G1 y se examinó su actividad contra el pulgón verde del melocotón (*Myzus persicae*). Mediante cromatografía en columna seguida de análisis instrumental utilizando un espectrómetro de masas, se identificó una surfactina como metabolito principal, mostrando un valor de CL₅₀ de 35.82 µg / mL. Este es el primer reporte de surfactina como un metabolito insecticida contra *M. persicae* (Yun *et al.*, 2013).

La surfactina es un biosurfactante producido por *Bacillus subtilis* esta inhibe el crecimiento de algunas bacterias, un gran número de estudios sobre la surfactina han sido realizados sobre el control de fitopatógenos (Bais *et al.*, 2004), pero pocos estudios han sido llevados hasta el control de insectos plaga. Este metabolito también es producido por algunas cepas de *B. thuringiensis* y ha sido utilizado para el control de *Fusarium oxysporium* (Deepak y Jayapradha, 2014).

En el caso de las surfactinas producidas por *B. subtilis* se menciona que cuando son ingeridas por las larvas, causan cambios histopatológicos en el intestino medio de la larva de *Spodoptera littoralis*, además, de una vacuolización, necrosis de células epiteliales y destrucción de células a sus alrededores, estas vacuolas pueden ser el resultado del alargamiento celular o como resultado del exceso de gotas de grasa que se disuelven durante el proceso de fijación y deshidratación (Salkeld, 1951).

En el control de áfidos se han reportado el uso de surfactinas, ramnolípidos y orfamida que provocan una disrupción en la cutícula (Kim *et al.*, 2011; Jang *et al.*, 2013). El daño a la cutícula de los áfidos es por una deshidratación significativa a la membrana cuticular que llega a causar la muerte del insecto. El efecto de las surfactinas es similar a ramnolípidos y orfamida A. La surfactina puede interactuar con las moléculas lipídicas de la cutícula, por lo que puede ser utilizada como agente de biocontrol en los programas de manejo integrado de plagas, otras bacterias como *Pseudomonas* spp. también producen biosurfactantes que matan a pulgón *M. persicae* (Kim *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2017), se han reportado diversos biosurfactantes con efecto insecticida como se muestra en el **Cuadro 1**.

Cuadro 1. Biosurfactantes producidos por bacterias patógenas a insectos

Microorganismo	Tipo de biosurfactante	Plaga insectil	Autores
<i>Bacillus subtilis</i> SPB1	Surfactina	<i>Spodoptera littoris</i>	Ghribi <i>et al.</i> , 2012
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> G1	Surfactina	<i>Myzus persicae</i>	Yun D.C <i>et al.</i> , 2013
<i>Bacillus subtilis</i> isolate, Y9	Surfactina	<i>Myzus persicae</i>	Yan <i>et al.</i> , 2016
<i>Pseudomonas</i> sp. DJ15	Xantolisinas	<i>M. persicae</i>	Lim D.J <i>et al.</i> , 2017
<i>Pseudomonas</i> sp. EP-3	Rhamnolipidos	<i>M. Persicae</i>	Kim S.K <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomonas protegens</i> F6	Orfamida A	<i>M. persicae</i>	Jang J.Y <i>et al.</i> , 2013
<i>Bacillus clausii</i> BS02	Surfactina	<i>Callosobruchus chinensis</i> , <i>Maconellicoccus hirsutus</i>	Hazra C. <i>et al.</i> , 2015

En el caso de los pulgones, el biosurfactante Orfamida A producida por *Pseudomonas protegens* F6 es un biosurfactante que consta de 10 aminoácidos cíclicos y un fragmento largo de ácido graso, que afecta las membranas de la cutícula del insecto que está compuesta por mezclas de alcanos, ácidos grasos y fosfolípidos, estos interactúan con los grupos lipofílicos e hifrofílico de la orfamida A, provocando una perturbación en la endocutícula del pulgón *Myzus persicae* (Jang *et al.*, 2013).

2.7 Justificación

México ocupa el primer lugar a nivel mundial en producción de nopal verdura o “nopalitos”. No obstante, este cultivo se ve afectado por diversas plagas, de las cuales, la más importante es *Dactylopius opuntiae* que está presente todo el año. Debido a los daños severos y a las pérdidas económicas que ocasiona, se sabe que plantaciones en donde no se realiza ningún tipo de control llega a causar la muerte de la planta en tan solo seis meses o tiempos menores en plantaciones iniciales. Motivo por el cual es necesario buscar alternativas de control de *D. opuntiae*, que sean inocuos a los organismos no blanco, ambiente y hombre, como podrían ser las bacterias entomopatógenas formadoras de esporas y cristales. Actualmente existen varias especies de bacterias reportadas como entomopatógenas, algunas aisladas del mismo insecto plaga. Sin embargo, hasta la fecha no hay reportes de bacterias patógenas a *D. opuntiae*. En el presente trabajo se propone el aislamiento de bacterias de cadáveres de *D. opuntiae*, colectados en plantas cultivadas y silvestres de nopal verdura en el Estado de Morelos, las cuales serán evaluadas y se seleccionará la cepa más patógena a *D. opuntiae* para el desarrollo de un bioinsecticida que pueda en un futuro ser una opción dentro del manejo integrado de esta plaga.

Capítulo III

3. Hipótesis

Algunos de los aislados de bacterias obtenidos de cadáveres de *Dactylopius opuntiae* (Hemíptera: Dactylopiidae) presentarán patogenicidad contra este insecto.

3.1 Objetivo general

Caracterizar los aislados bacterianos obtenidos de cadáveres de *Dactylopius opuntiae*

3.2 Objetivos particulares

1. Obtener aislados bacterianos a partir de cadáveres de *D. opuntiae* colectados en cultivos de nopal verdura en el Estado de Morelos.
3. Determinar las cepas que presentan patogenicidad a *D. opuntiae* mediante bioensayos y corroborar su patogenicidad mediante los postulados de Köch.
4. Calcular la virulencia de las cepas patógenas a *D. opuntiae*.
5. Identificar molecularmente la especie de los aislados patógenos a *D. opuntiae*
6. Demostrar la presencia de un biosurfactante producido de las bacterias patógenas a *D. opuntiae*

Capítulo IV

4. Materiales y Métodos

4.1 Colecta de cadáveres de *D. opuntiae* en cultivos de nopal verdura del Estado de Morelos, México

Se realizaron colectas en las principales zonas productoras de nopal verdura, en el estado de Morelos: Tlalnepantla, Totolapan, Tlayacapan y Tepoztlán, los muestreos se realizaron con la técnica de 5 de oros, que consiste en tomar los cuatro puntos de las esquinas y uno en el centro del terreno, para la toma de las muestras se seleccionaron plantas con alta infestación de insectos de *D. opuntiae*. Se tomaron datos de colecta como: localidad, nombre del predio, altitud, entre otros. Los insectos fueron observados con una lupa, se seleccionaron los cadáveres de ninfas del primer y segundo instar de *D. opuntiae* que presentaran aparentemente síntomas causados por enfermedades bacterianas como son cambios de coloración, flacidez, mucosidad, los insectos fueron trasladados de forma individual en recipientes de plástico al laboratorio de Parasitología Vegetal del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIB/UAEM).

4.2 Aislamiento de bacterias patógenas

En el laboratorio las muestras de insectos se colocaron individualmente en microtubos estériles de 1.5 mL, a los cuales se les adicionó 1 mL de medio líquido Luria-Bertani (LB), los cadáveres se maceraron con la ayuda de una punta estéril, cada tubo fue enumerado consecutivamente, en la bitácora se anotó el número correspondiente y datos de colecta. Los tubos se incubaron durante 72 h a 28 °C,

posteriormente se tomó una asada de cada tubo y se realizó el estriado en una caja de Petri con medio LB sólido para obtener colonias únicas.

Las cajas se incubaron a 28 °C y a las 24 o 48 h, de cada caja de Petri, se seleccionaron las colonias morfológicamente diferentes y se sembraron individualmente en una caja de Petri con LB, se incubaron y a las 72 h se observó al microscopio compuesto de la marca Nikon (objetivo 100X) para determinar si eran bacterias formadoras de esporas y cristales, y si eran cultivos puros. Cada colonia se cultivó individualmente hasta la esporulación, se recuperó la biomasa y se colocó en microtubos con glicerol al 60% para finalmente mantenerlas en congelación a una temperatura de -30 °C hasta su uso.

4.3 Establecimiento del pie de cría de *D. opuntiae*

La cría de las ninfas y adultos se estableció en el invernadero del laboratorio de Parasitología Vegetal CIB/UAEM, cladodios de 10 cm de largo fueron colectados en plantaciones comerciales y se plantaron en macetas de plástico del número 10. Estos cladodios estuvieron libres de residuos de agroquímicos, una vez que las pencas llegaron a ser plantas adultas de 8 meses se infestaron con hembras adultas sanas (**Figura 6**) para obtener el número suficiente de estos insectos para realizar los bioensayos.



Figura 6. Infestación de nopales crecidos en maceta dentro del invernadero del laboratorio de Parasitología Vegetal CIB-UAEM.

4.4 Bioensayos de patogenicidad y determinación de la virulencia de los aislados patógenos a *D. opuntiae*

4.4.1 Producción del complejo espora-cristal.

Los aislados bacterianos se crecieron en medio HCT que contiene: KH_2PO_4 (3.4 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.0123 g/L); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.69×10^{-4} g/L); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.4×10^{-3} g/L); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.02 g/L); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.147 g/L); Glucosa (3 g/L); Triptona (4.5 g/L); Casaminoácidos (1.79 g/L). Para evitar precipitación de sales, este medio se preparó en 5 soluciones distintas, todas las sales se esterizaron por separado a 121 °C durante 15 minutos y se mezclaron en campana de flujo laminar (Lecadet *et al.*, 1980).

4.4.2 Selección de aislados bacterianos patógenos a *D. opuntiae*

Las bacterias que fueron seleccionadas para realizar los bioensayos fueron crecidas en medio de cultivo HCT hasta las 72 h y se observaron en el microscopio compuesto a 100X. Posteriormente, antes de realizar los bioensayos de patogenicidad se obtuvieron los perfiles proteicos de los 41 aislados bacterianos que presentaban endospora y algunos de ellos un cuerpo parasporal similar a la especie de *B. thuringiensis*.

4.4.3 Bioensayos de patogenicidad

Debido a que no existen sistemas de alimentación de este insecto, se realizaron cortes de nopales infestados con ninfas II directamente de la cría en el invernadero, el corte que se realizó fue de 2x2 cm con grosor de 4mm, y se colocaron 40 ninfas por vasito (**Figura 7**).

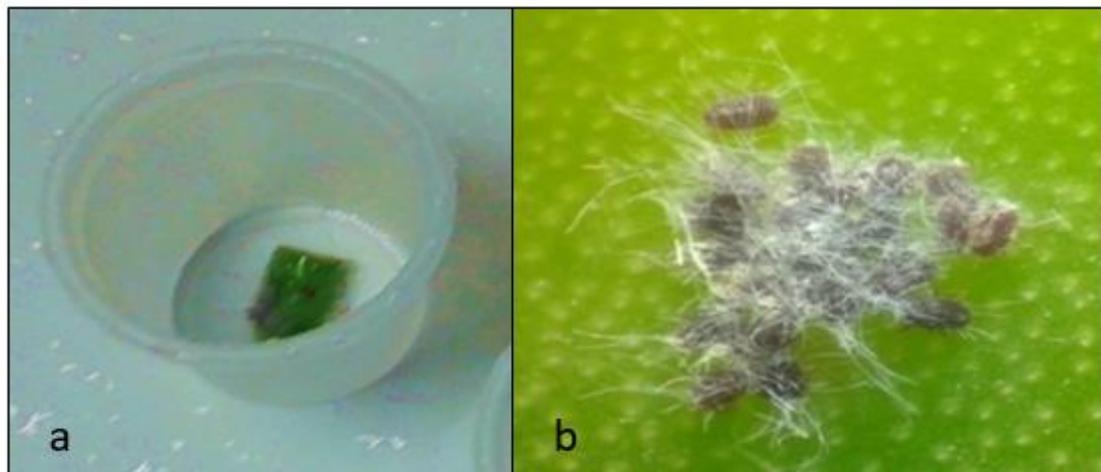


Figura 7. a) Vasito que contiene el trozo de nopal infestado de cochinillas. b) Ninfas II agrupadas sobre corte de nopal para realizar los bioensayos de patogenicidad.

Las cepas bacterianas se cultivaron en HCT sólido durante 72 h y luego se recuperaron en agua estéril. El contenido de proteína total se cuantificó mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976) a una absorbancia a 595 nm.

La aplicación de los tratamientos se realizó con ayuda de una micropipeta de 1000 μ L, colocando un total de 4 mililitros con el complejo espora-cristal sobre las ninfas II. Al testigo sólo se le aplicó agua destilada. La temperatura para llevar a cabo los bioensayos fue de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$. La mortalidad se cuantificó a las 24, 48, 72 y 96 h, con la ayuda de un microscopio estereoscópico, ya que el tamaño de las ninfas es de 1 mm.

El porcentaje de mortalidad se determinó mediante la fórmula de Abbott corregida:

$$\% \text{ de mortalidad} = 1 - \frac{\text{individuos vivos} - \text{individuos muertos}}{\text{individuos vivos}} \cdot 100$$

Formula de Abbott corregida

$$\% \text{ de mortalidad} = \frac{\% \text{ de mortalidad muestra} - \% \text{ de mortalidad testigo}}{100 - \% \text{ de mortalidad testigo}} \cdot 100$$

Los datos registrados en porcentajes fueron transformados mediante la ecuación del arcoseno. La transformación normaliza la distribución de los datos y estabiliza las varianzas. Estos son dos supuestos importantes al utilizar análisis estadísticos como el ANOVA.

4.4.4 Determinación de la virulencia (CL₅₀)

La virulencia fue calculada para la bacteria que mostró la mayor mortalidad de acuerdo a los bioensayos de patogenicidad, mediante la obtención de la concentración letal 50 (CL₅₀), ésta se calculó utilizando cinco concentraciones de proteína total que varían de 150 a 450 µg/mL, a partir de la concentración de 300 µg/mL que mostraron una mortalidad del 41.81 % en los bioensayos de patogeneidad.

Se tomó como unidad experimental un vaso de plástico de 5 cm de diámetro con un total de 80 ninfas del segundo estadio de *D. opuntiae* en trozos de nopal de 2x2cm con un grosor de 4 mm, y se evaluó la mortalidad cada 24 h hasta las 96 h después del tratamiento. El control consistió en agua sin bacterias. Las unidades experimentales se mantuvieron a una temperatura de 28 °C., de cada concentración se hicieron tres repeticiones y el experimento fue repetido tres veces.

4.5 Bioensayo de bioseguridad de las cepas HH10 y HH41 contra *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

Se realizó el bioensayo de especificidad de los dos aislados patógenos a *D. opuntiae* contra *Apis mellifera*. Estos fueron realizados en un sistema de alimentación reportado por Evans *et al.* (2009) (**Figura 8**). En la parte superior del sistema se colocaron 5 mL de una solución de sacarosa al 50% en la que se agregó las concentraciones de los aislados de las bacterias, el control constó de la dieta. En la parte inferior se colocaron 10 adultos de *A. mellifera*, recién emergidas, el bioensayo se mantuvo a 30 °C en incubadora y fue revisado cada 24 h durante cuatro días, el experimento se realizó con 2 réplicas con 4 repeticiones cada una.



Figura 8. Sistema de alimentación en el que se realizaron los bioensayos de patogenicidad contra adultos de *A. mellifera*.

4.6 Análisis estadístico

Para determinar las diferencias entre los tratamientos en los bioensayos de patogenicidad y tensión superficial de las bacterias patógenas a *D. opuntiae* se realizaron diseños completamente al azar. Se realizó una prueba de normalidad Shapiro y Wilks, al observar que se presentó una distribución normal, se implementó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una prueba de Tukey en el programa SAS System 9.0.

La CL_{50} de la cepa patógena de *D. opuntiae*, fue calculada a partir de los bioensayos de patogenicidad usando un análisis Probit, con el programa estadístico Polo Plus 2003 versión 1.0 (Robertson *et al.*, 2003).

4.7 Postulados de Köch

Las ninfas muertas por los tratamientos fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2.5% durante 2 minutos, después fueron lavadas con agua destilada estéril, posteriormente se colocaron en microtubos de 1.5 mL al cual se le añadió medio LB líquido y se maceraron con una punta estéril, posteriormente, se dejaron incubar durante 24 horas. A continuación, se tomó una asada del medio y se estrió para obtener colonias individuales en medio de cultivo LB sólido, estas se dejaron incubar nuevamente durante 24 h y cada colonia fue separada, para ser observadas en el microscopio compuesto con un objetivo 100X a las 72 h. Además, se realizó la extracción del sistema digestivo de los cadáveres para obtener nuevamente las cepas.

Para demostrar que el agente causal de la mortalidad de las ninfas II de *D. opuntiae* en los tratamientos se trataban de los mismos aislados inoculados se realizó la comparación del perfil proteico. Para ello, se llevó a cabo la cuantificación de proteína total y preparación de las muestras para el análisis mediante Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes o SDS-PAGE.

Los aislados bacterianos se cultivaron en HCT sólido durante 72 h y luego se recuperó la biomasa en microtubos de 1.5 mL con agua estéril. Posteriormente, los tubos se agitaron en un vortex durante 1 minuto. Luego se tomaron 10 muestras por tubo para realizar el cálculo de proteína total, en donde, se tomaron 2 μ L de la muestra, enseguida se colocaron 798 μ L de H₂O y 200 μ L de reactivo Bradford y, se agitó en un vortex por 2 minutos y se finalizó midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro a 595 nm. Los datos obtenidos se extrapolaron en una curva estándar de albumina de suero de bovino, en un rango de 2.5 a 20 μ g.

La preparación de las muestras para realizar el SDS-PAGE, se llevó a cabo de la siguiente manera: De un microtubo 1.5 mL que contenía la biomasa total

recuperada de la bacteria crecida hasta las 72 h se tomó una muestra de 10 µg de cultivo bacteriano, esta se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se recuperó, teniendo entonces dos fracciones la biomasa y el sobrenadante. A la biomasa, se le agregó 24 µL de agua destilada y 6 µL del buffer desnaturante, ésta mezcla se calentó a 98 °C durante 10 minutos, se almacenó a -2°C para separar las proteínas en un gel de acrilamida al 10 % en condiciones desnaturantes.

4.8 Identificación molecular de los aislados patógenos a *D. opuntiae*

4.8.1 Extracción de ADN de los aislados

La preparación del ADN total se realizó inoculando los aislados bacterianos en una placa de Petri con medio LB sólido y se incubaron a 28 ± 2 °C durante una noche (overnight). Luego, se colocó de 50 a 100 mg de biomasa bacteriana en tubos de 1,5 mL y se extrajo el ADN con el kit de extracción de ADN genómico total del fabricante (Easy-DNA™ de invitrogen, Ref. 45-0424). La purificación del ADN se realizó con el Kit Zymoclean™ Gel ADN Recovery.

4.8.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa para amplificación de los genes marcadores 16S ARNr y *gyrB* de las cepas HH10 y HH41

La amplificación del gen 16S ARNr se llevó a cabo utilizando los cebadores específicos para bacterias reportados por López *et al.*, (2003), avance Pro K63 (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') (Marchesi *et al.*, 1998) y reversa L1401 (5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC -3') (Nubel *et al.*, 1996). Por otro lado, se eligió al gen *gyrB* como marcador molecular ya que ha sido reportado como confiable en la

diferenciación de especies pertenecientes al grupo de *Bacillus subtilis* (Yamamoto y Harayama, 1995). Para la amplificación del gen *gyrB* se utilizaron los cebadores avance UP1-F 5'-GAA GTC ATC ATG ACC GTT CTG CAY GCN GGN GGN AAR TTY GA-3' y reversa UP2-R 5'-AGC AGG GTA CGG ATG TGC GAG CCR TCN ACR TCN GCR TCN GTC AT-3' (Yamamoto y Harayama, 1995). Las condiciones usadas y tamaño de producto se muestran en la **Cuadro 2**.

Cuadro 2. Iniciadores y condiciones utilizadas en el PCR para la amplificación de los genes 16S ARNr y *gyrB*.

Par de Iniciadores	Gen	Condiciones de PCR					Tamaño producto (pb)	Referencia
		1 ciclo Final	34 ciclos					
Pro K63 L1041	16S rARN	95 °C 3 min	95 °C 50 seg	54°C 45 seg	72 °C 1:30 min	72°C 5 min	1400	Lopez et al., 2003
UP-1 UP-2r	<i>gyrB</i>	95°C 3 min	95°C 50 seg	58°C 40 seg	72°C 1:20 min	72°C 5 min	1260	Yamamoto y Harayama, 1995

4.8.3 Identificación de los aislados patógenos a *D. opuntiae* y realización de árbol filogenético

Los productos de PCR del gen 16S ARNr y *gyrB* fueron secuenciados en Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ubicado en el Campus Cuernavaca, Morelos, con el secuenciador Applied

Biosystems, modelo 3130xl. Las secuencias obtenidas estas fueron editadas en el programa bioinformático BioEdit.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas de los genes 16S ARNr y *gyrB* se compararon con la base de datos GenBank mediante la herramienta de algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990), servicio es ofrecido por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

Las secuencias de las cepas HH10 y HH41 se alinearon y compararon con el software de bioinformática Mega 7.0 y se elaboró un árbol filogenético con base en la matriz Neighbor Joining (Saitou y Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 1.51144500. El porcentaje de árboles fueron replicados en los taxones asociados agrupados en la prueba de bootstrap (1000 réplicas). El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima probabilidad compuesta (Tamura *et al.*, 2004) y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 10 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1^a + 2^a + 3^a + sin codificación. Se eliminaron todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes. Hubo un total de 481 posiciones en el conjunto de datos final.

4.9 Determinación de la producción de biosurfactantes

4.9.1 Preparación del inóculo y medio de cultivo utilizado para producción de biosurfactantes

Los aislados bacterianos HH10 y HH41 se crecieron en placas de Petri con medio HCT sólido durante 12 h para obtener células vegetativas. Posteriormente, se recuperó la biomasa en microtubos de 1.5 mL con agua destilada estéril y se hicieron diluciones hasta obtener una absorbancia de 0.05 medida en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 495 nm, esto se realizó tomando una muestra de 10 μ L y se realizó un recuento celular en la cámara de Neubauer y con ayuda del microscopio compuesto en el objetivo 40X, con base al recuento se obtuvo una densidad de 6.03×10^6 células por mililitro como preinóculo.

Para la producción de los biosurfactantes, se inocularon cinco matraces de 250 mL conteniendo 90 mL de medio de cultivo líquido PGas (1.07 g de NH_4Cl_2 , 1.5 g de KCl, 18.91 g de Tris-HCl, 0.19 g de MgSO_4 , 0.5% de glucosa y 1% de peptona por litro) y se le añadió 9 mL con aproximadamente 5.427×10^7 células y se incubaron durante 72 h a 30 °C con una agitación de 200 rpm.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el medio de cultivo bacteriano se vertió en tubos Falcon de 25 mL, con cinco repeticiones, y se sometió a centrifugación a 3500 rpm a una temperatura de 5°C durante 15 min, repitiéndose este paso tres veces, al final se recuperó el sobrenadante, como controles se puso agua y el tensoactivo Tween80.

4.9.2 Tensión superficial

La tensión superficial se midió con el tensiómetro Kruss K20 por el método de Placa de Wilhelmy, para ello se utiliza una pequeña placa de geometría rectangular suspendida verticalmente sobre una balanza de precisión (**Figura 9**). El lado inferior de la placa debe ponerse en contacto de manera horizontal con la superficie del líquido hasta mojarse (1). Posteriormente, se debe ejercer una fuerza vertical sobre la placa para elevarla (2). La placa se levanta suavemente formando una interfase curva (3); por último, se levanta la placa hasta que se produzca el arranque (4).

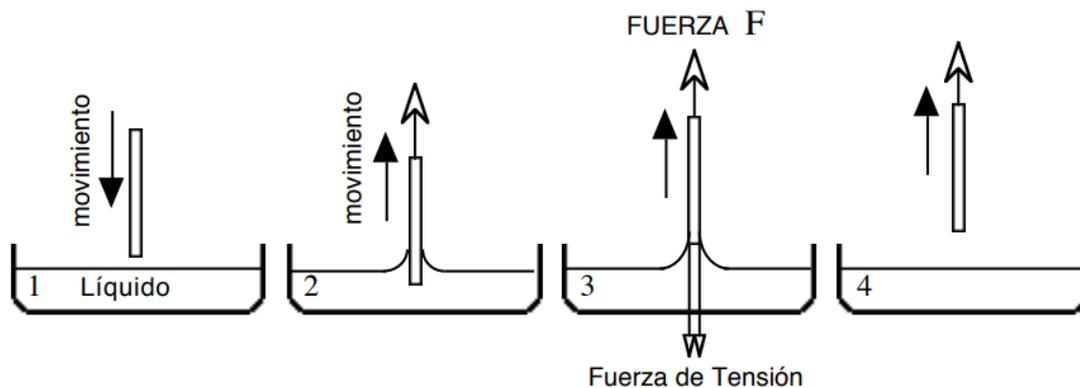


Figura 9. Medida de la tensión superficial: 1. El líquido se pone en contacto con la placa: 2. Fuerza vertical ejercida sobre la placa: 3. Se forma la curva de interface: 4. Se produce el arranque.

En el punto justo antes del arranque se calcula el equilibrio de fuerzas entre la fuerza de tensión que se aplica por parte de la placa y la fuerza de levantamiento F (**Figura 10**). La placa es de platino ligeramente rugoso, de forma que el ángulo de contacto debe ser lo más pequeño posible. La placa mide típicamente 29.9 mm de largo (L) y 0.1 mm de espesor. La balanza es una de torsión que el usuario maniobra

con una palanca, la toma de datos se realiza al momento de choque de la placa y el líquido, este instrumento cuenta con un sensor de fuerza, los resultados están dados en mD/m.

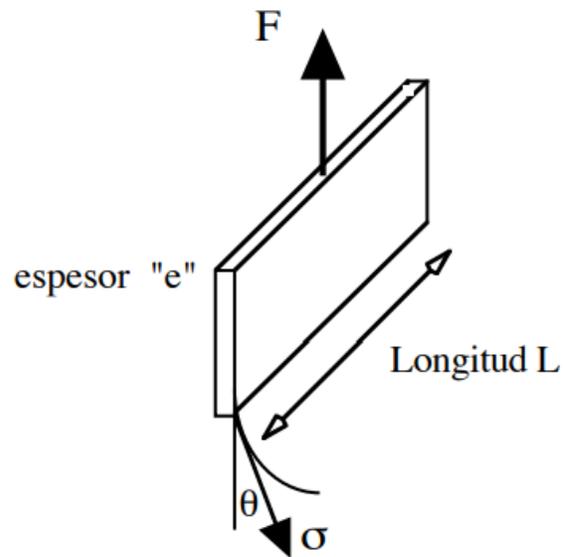


Figura 10. Método de la placa - Balance de fuerzas

Para realizar los experimentos se utilizó como referencia la tensión superficial del agua, medio de cultivo PGas, Tween+agua, sobrenadantes de HH10 y HH41. Se realizaron cinco repeticiones de cada tratamiento y se realizaron tres réplicas del experimento.

4.9.3 Actividad hemolítica

Los aislados bacterianos fueron incubados en medio PGas en tubos Falcón de 25 mL durante 72 h a 30 °C en constante agitación de 200 rpm para inducir la producción de un biosurfactante. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 3500 rpm a 5 °C por 15 minutos. El sobrenadante se recupero y se desechó la biomasa bacteriana. Posteriormente se colocaron 5 µL sobre placas de agar sangre solido (5% a 10% de sangre por litro, 23.0 g de peptona, 1.0 g de almidón, 5.0 g de cloruro de sodio y 10.0 g de agar a un pH final de 7.3 ± 0.2) durante 48 h a 37 °C. La actividad hemolítica se detectó por la presencia de una zona clara alrededor de donde se colocó la muestra.

Capítulo V

5. Resultados

5.1 Colecta de cadáveres de *D. opuntiae* en cultivos de nopal verdura en el Estado de Morelos, México

La mayor parte de superficie sembrada de nopal verdura en el estado de Morelos se encuentra concentrada en cuatro municipios, fue durante el primer semestre en el periodo de marzo a julio del 2016 que se realizó el muestreo en cultivos comerciales en las principales localidades productoras (**Figura 11**). El mayor número de aislados bacterianos se obtuvo de las muestras colectadas en la localidad de San Agustín, Amatlipac en el predio “La Ika” perteneciente al municipio de Tlayacapan (**Cuadro 3**), esta región pertenece a la parte alta del estado de Morelos con clima templado subhúmedo y con una altitud que va de los 1,677 hasta los 2,273 msnm.

Cuadro 3. Sitios de muestreo realizados de marzo a julio del 2016 en diferentes localidades del estado de Morelos

Sitio de muestreo	Localidad	Nombre del predio	Altitud (msnm)	Coordenadas	# de Aislados	Clima
Tlayacapan	San Agustín	La Parada	1,714	18°57'54.07"N 98°57'59.31"O	4	Templado subhúmedo
	Amatlipac	La Ika	1,677	18°57'26.36"N 98°57'54.60"O	12	Templado subhúmedo
Tepoztlán	San Miguel	El Vivero	1,852	18°59'25.08"N 99° 6'59.66"O	6	Templado subhúmedo
		El Vigía	2,046	19° 0'20.25"N 98°58'3.93"O	10	Templado-subhúmedo
Tlalnepantla	El Vigía	El Monte	2,273	19° 1'0.75"N 98°56'21.95"O	4	Templado-subhúmedo
Totolapan	La Cañada	San Sebastián	1,803	18°59'12.21"N 98°58'0.74"O	4	Subtropical húmedo

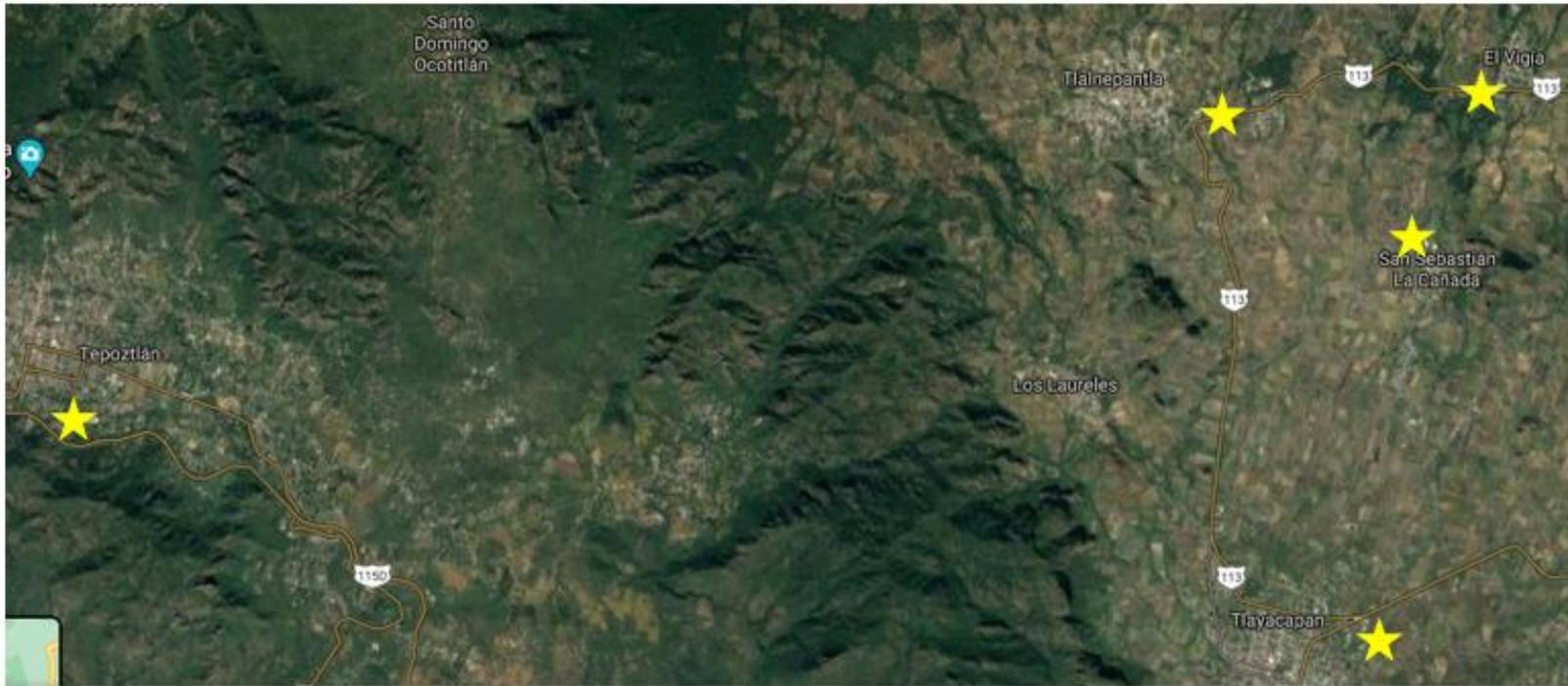


Figura 11. Mapa de la zona Norte del estado de Morelos donde se realizó la colecta de cadáveres de *D. opuntiae*, las estrellas amarillas marcan las localidades de la toma de muestras (tomado de Google Maps).

5.2 Aislamiento de bacterias

De cada uno de los muestreos se procesaron 40 cadáveres, y se obtuvo un total de 160 aislados, al ser observadas al microscopio se seleccionaron 41 cepas que presentaban forma de bacilo y formación de esporas, descartándose aquellas no formadoras (**Figura 12**) para seleccionar las cepas patógenas a *D. opuntiae*.

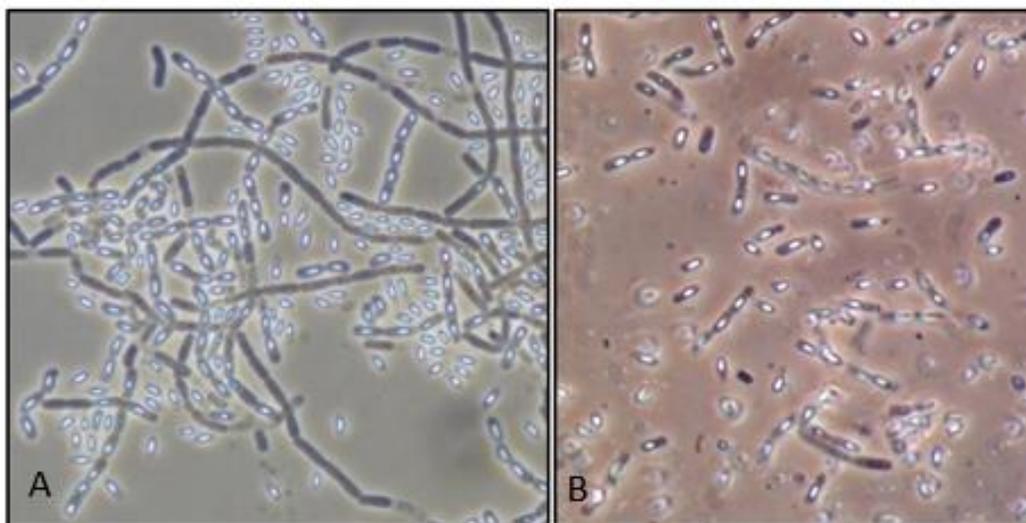


Figura 12. A) Aislado 26. B) Aislado 22. Ambos aislados presentan células en forma de bacilo con esporas observadas en microscopio compuesto a 100X.

A nivel macroscópico los aislados bacterianos presentaron características morfológicas diferentes como se muestra en la **Figura 13**.

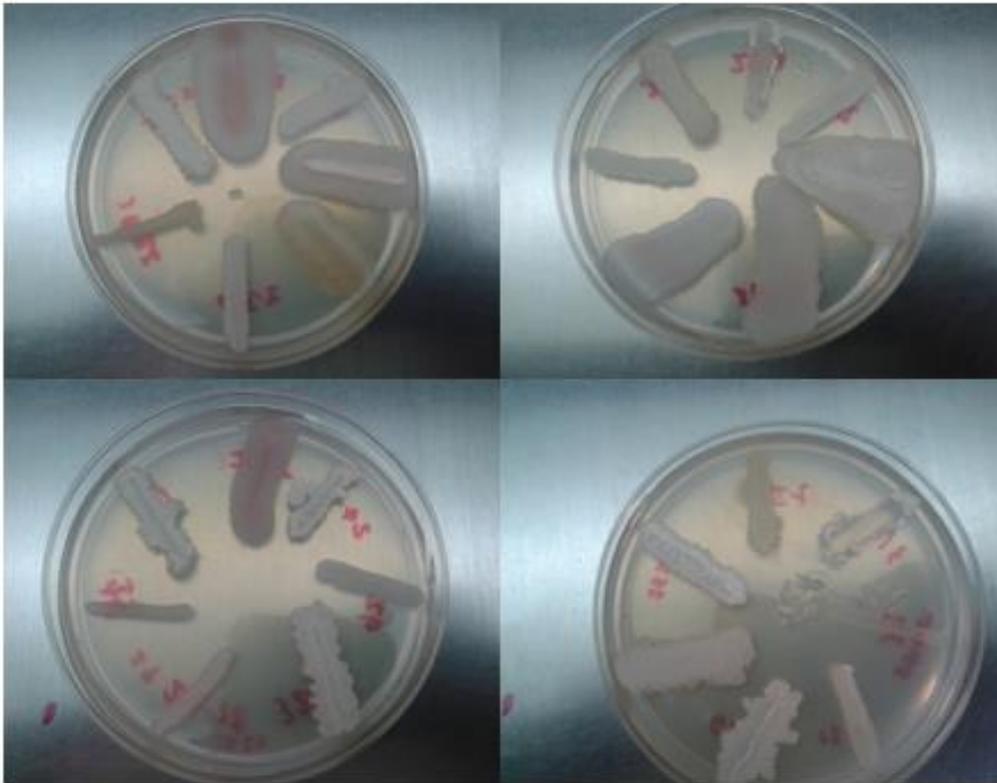


Figura 13. Bacterias aisladas de cadáveres de *D. opuntiae*, vistas de forma macroscópica con diferente tipo de crecimiento, borde, superficie, elevación y color.

5.3 Bioensayos de patogenicidad

5.3.1 Selección de los aislados bacterianos

Se obtuvieron los perfiles proteicos de las cepas formadoras de esporas, observándose bandas de proteínas mayoritarias con diferente peso molecular en cada una de ellas como se observa en la **Figura 14**.

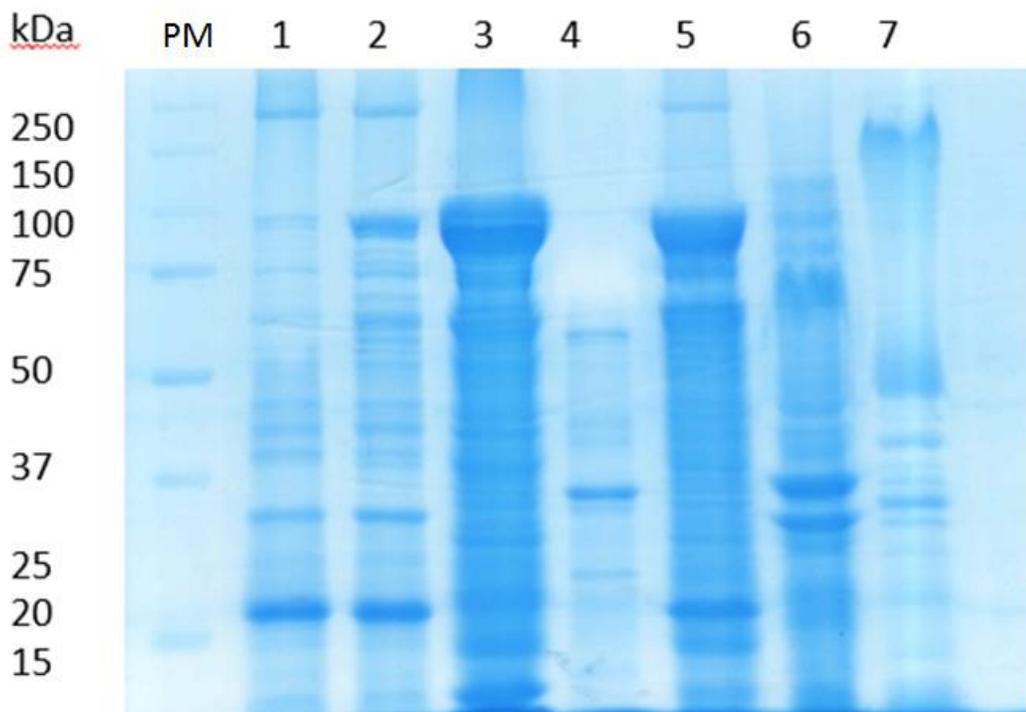


Figura 14. Perfil proteico de cepas bacterianas aisladas de *D. opuntiae*. Carril 1: Peso Molecular. Carril 2: Cepa HH1. Carril 2: Cepa HH5. Carril 3: Cepa HH6. Carril 4: Cepa HH7. Carril 5: Cepa HH10. Carril 6: Cepa HH22. Carril 7: Cepa HH30.

5.3.2 Bioensayos de patogenicidad con las cepas HH10 y HH41

Aunque se realizaron bioensayos con todas las cepas aisladas de los cadáveres, solo dos mostraron ser patógenas a las ninfas del segundo instar de *D. opuntiae*. La cepa HH10 mostró una mortalidad de 62.5% a una concentración de proteína total de 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 96 h (**Figura 15**). Solo el tratamiento de 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostró diferencia significativa con respecto a las demás concentraciones del aislado HH10, la mortalidad se mantiene desde los 150 μg hasta los 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

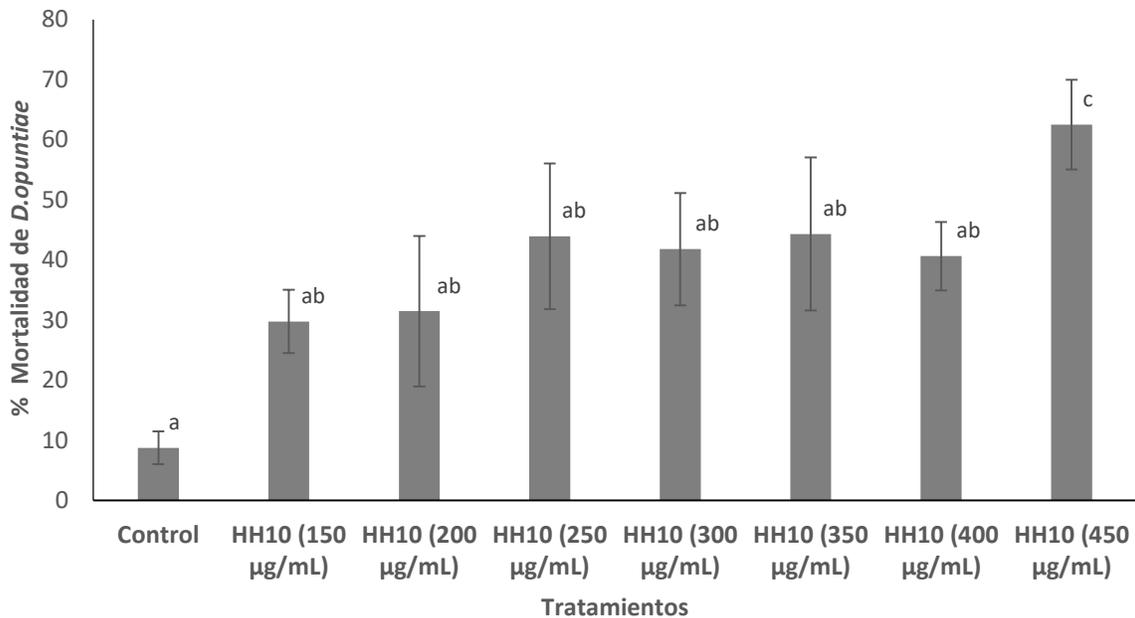


Figura 15. Porcentaje de mortalidad de *D. opuntiae* evaluada a las 96 h a diferentes concentraciones de proteína total del aislado HH10. Letras diferentes en los tratamientos indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

El aislado HH41 mostró una mortalidad máxima de 30.78% a una concentración de 100 µg/mL (**Figura 16**). La mortalidad no se vio incrementada aún y cuando las concentraciones de la proteína total fueron mayores y se observó un descenso en la mortalidad, ya que con la concentración de 1000 µg/mL la mortalidad alcanzada fue de 27.16 %, posiblemente hubo un fenómeno conocido como hormesis.

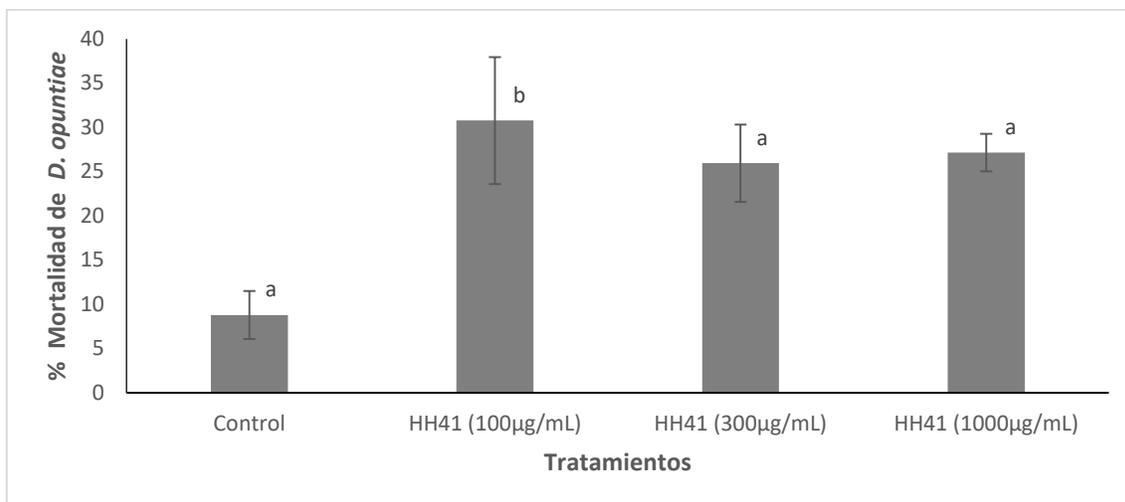


Figura 16. Porcentaje de mortalidad ocasionado por los aislados en *D. opuntiae*, observada a las 96 h a diferentes concentraciones de la proteína total del aislado HH41. Letras diferentes en los tratamientos indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

5.3.3 Bioensayo de bioseguridad contra *A. mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

Los bioensayos de bioseguridad demostraron que los aislados HH10 y HH41 no son patógenos hacia insectos no blanco como *A. mellifera*, ya que la mortalidad de este insecto benéfico fue cero en las concentraciones de proteína total evaluada.

5.3.4 Postulados de Köch de los aislados HH10 y HH41.

Después de realizar los bioensayos de patogenicidad con las 41 cepas de bacterias formadoras de esporas, solo dos cepas mostraron ser patógenas a las ninfas del segundo instar de *D. opuntiae*. En la segunda réplica del experimento de las dos cepas patógenas se fotografiaron las ninfas muertas y con ayuda del microscopio estereoscópico, se observó el aspecto de las ninfas a causa de

aplicación de las cepas, el principal cambio fue el de la coloración en el exoesqueleto (**Figura 17**).



Figura 17. a) Ninfas II muertas en el tratamiento con la cepa HH10 con el complejo espora-cristal a una concentración de 450 $\mu\text{g}/\text{mL}$, coloración oscura de los insectos. b) Ninfa II muerta con la cepa HH41 a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se observó una coloración anormal y aspecto deshidratado. c) Ninfa II con coloración normal rojiza del control. Ninfas tomadas de los bioensayos de patogenicidad.

A partir de los bioensayos realizados con las cepas HH10 Y HH41 se tomaron 10 ninfas del segundo instar muertas en los tratamientos de las dosis con mayor mortalidad. Se reislaron las cepas y se realizo la comparación del perfil proteico de las bacterias de los cadáveres de los bioensayos con los aislados obtenidos en los insectos muertos en campo (**Figura 18**).

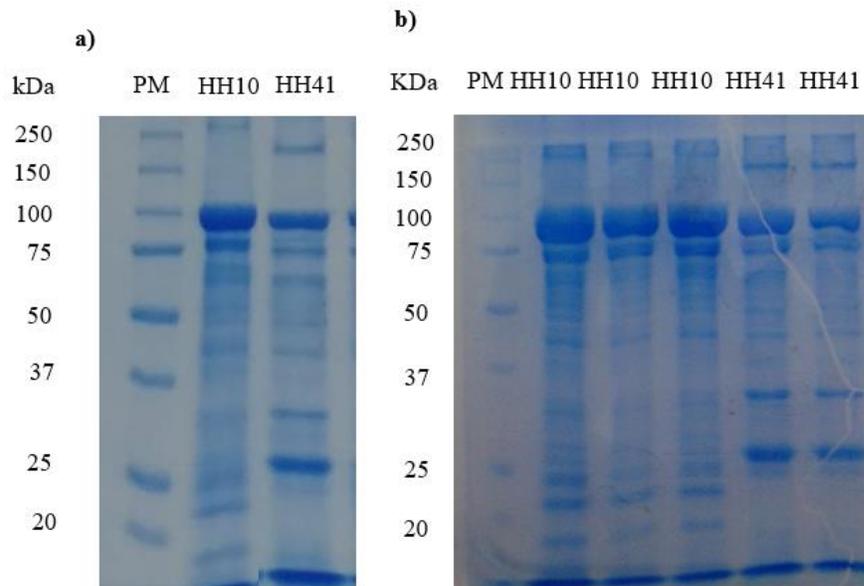


Figura 18. a) Perfiles proteicos de las bacterias antes de ser aplicadas a ninfas de *D. opuntiae*. b) Perfiles de las bacterias recuperadas de los cadáveres en los bioensayos de patogenicidad. PM (Peso Molecular).

Además, se extrajo el sistema digestivo de 10 ninfas de *D. opuntiae* utilizando pinzas de relojero y ayuda del microscopio estereoscópico para fotografiarlo (**Figura 19**), posteriormente se colocaron en medio de cultivo y se aislaron las bacterias para observar sus perfiles proteicos mostrados en la **Figura 20**.

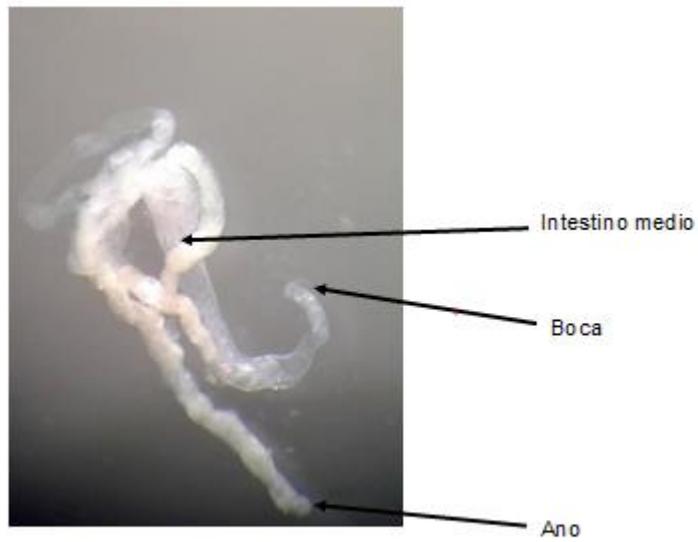


Figura 19. Sistema digestivo de *D. opuntiae* observado bajo microscopio estereoscópico.

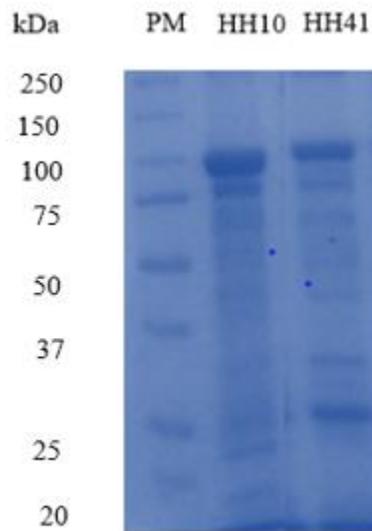


Figura 20. Perfiles proteicos de los aislados HH10 Y HH41 obtenidos del sistema digestivo de ninfas II muertas en los bioensayos de patogenicidad. PM (Peso molecular).

5.4 Características morfológicas e identificación molecular de los aislados patógenos a *D. opuntiae*.

Las cepas HH10 y HH41 fueron crecidas en medio solido HCT (**Figura 21**) y observadas en el el microscopio óptico de refracción a 100X (Nikon Eclipse 80i) presentando células en forma de bastón y en cadenas, que en su fase estacionaria presentan esporas de forma oval alargada, con cuerpos paraesporales agrupados en ambas cepas (**Figura 22**).

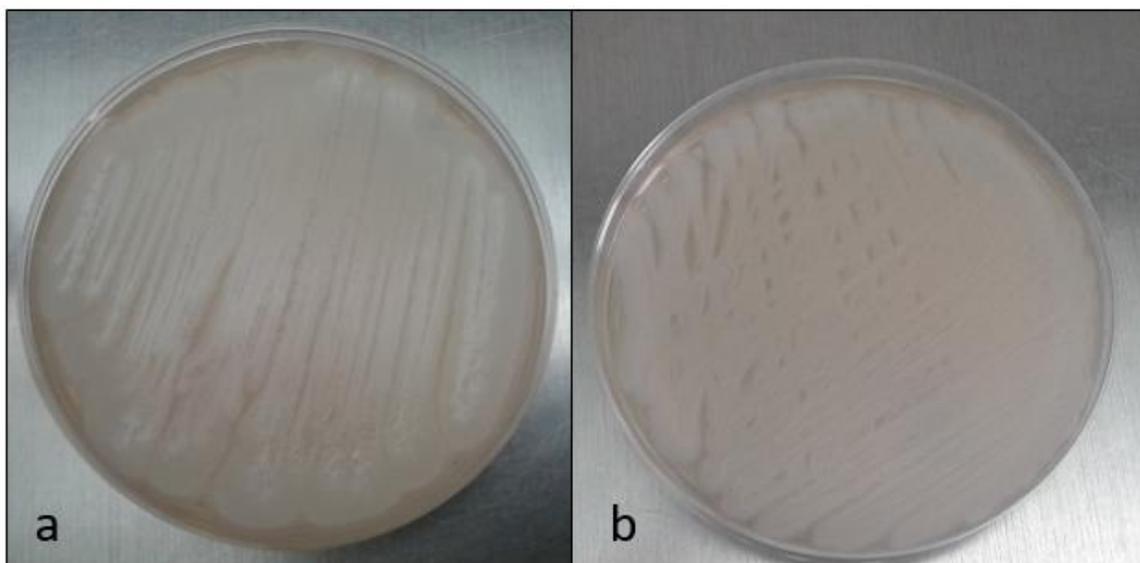


Figura 21. Características morfológicas de las cepas patógenas a *D. opuntiae*. a) Cepa HH10 con crecimiento redondo de color blanquecino, borde ondular y superficie áspera. a) Cepa HH41 con crecimiento redondo, borde ondular, color crema y superficie suave.



Figura 22. Células bacterianas observadas en microscopio óptico a 100X. a) Cepa HH10 células vegetativas con forma de bastón con esporas y cristales proteicos. b) Cepa HH41 células vegetativas con presencia de esporas y cristal proteico.

5.5 Amplificación de gen 16S ARNr y *gyrB* de las cepas HH10 y HH41

Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 1% y mostraron una banda de aproximadamente 1400 pb (**Figura 23**) para el gen 16S ARNr (López *et al.*, 2003) y 1260 pb para el gen *gyrB* (**Figura 24**).

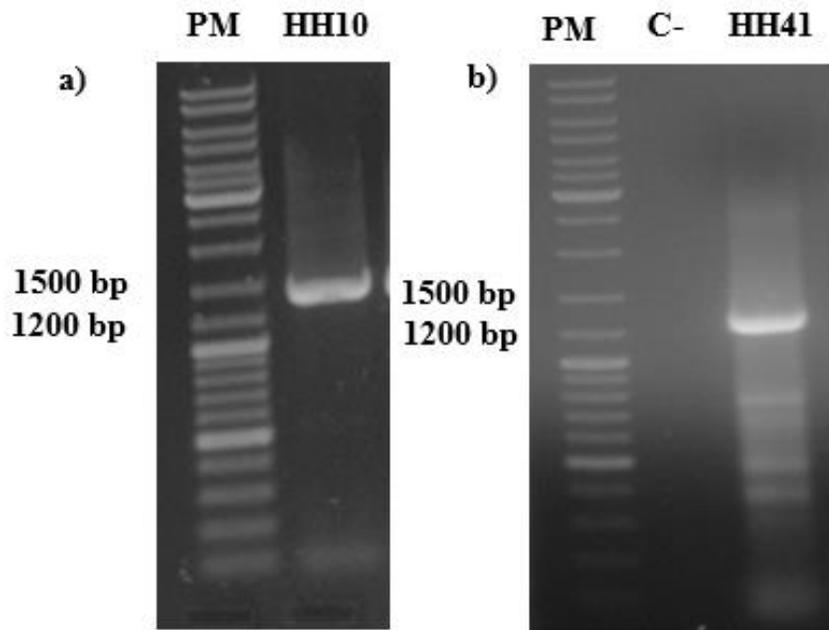


Figura 23. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio; amplicón del gen 16S ARNr con un tamaño de aproximadamente 1400 pb del aislado HH10 (a) y aislado HH41 (b).

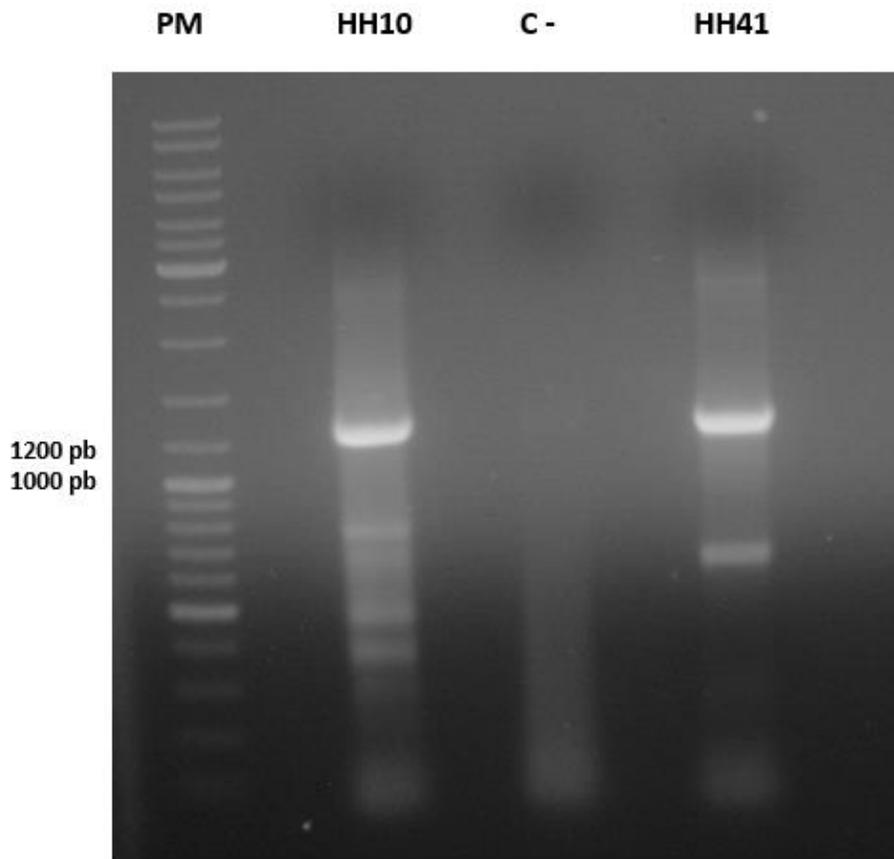


Figura 24. Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Green. Amplicón del gen *gyrB* con tamaño de alrededor de 1260 pb de la cepa HH10 y HH41. Control (-) sin ADN.

Posteriormente se cortaron las bandas marcadas en el gel para extraer el ADN, utilizando el kit de extracción Zymoclean™ Gel ADN y se enviaron 120ng de ADN a secuenciación.

5.5.1 Análisis BLAST de la secuencia de nucleótidos del gen 16S ARNr y *gyrB* de las cepas HH10 y HH41 y elaboración de árboles filogenéticos

Con la secuencia de nucleótidos de la amplificación del gen 16S ARNr y gen *gyrB* de los aislados HH10 y HH41, se analizaron por medio de la herramienta Basic Local Alignment Search Tool, BLAST de la base de datos NCBI. En los **Cuadros 4** y **5** se muestran las especies bacterianas con mayor identidad, así como el número de acceso. Aunque los resultados muestran que las cepas se encuentran muy cercanas a especies de *B. cereus* y *B. anthracis* ya que estas se encuentran dentro del grupo *Bacillus cereus* sensu lato con ambos marcadores, sin embargo, estas cepas presentan cristales de naturaleza proteica como se muestra en la **Figura 22**.

Cuadro 4. Identificación molecular del aislado HH10 y HH41 mediante el marcador molecular 16S ARNr.

Cepa	No. acceso contra el que se comparó en la base de datos del GenBank	% de identidad
HH10	MN420977 <i>Bacillus thuringiensis</i> strain Y9	100
	MN421532 <i>Bacillus cereus</i> strain SR6-20	
	MZ61760.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> strain MCAR/SMC/20121/ANJ	99.8
HH41	MZ367887.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> strain L1	100
	MH424577 <i>Bacillus thuringiensis</i> strain F20	94.34
MH762113 <i>Bacillus anthracis</i> strain DFRL.BHE_8		

Cuadro 5. Identificación molecular del aislado HH10 y HH41 mediante el marcador molecular *gyrB*.

Cepa	No. acceso contra el que se comparó en la base de datos del GenBank	% de identidad
	CP024771.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> LM212	97.82
HH10	CP039269.1 <i>Bacillus cereus</i> strain MH19	97.60
	CP026608.1 <i>Bacillus anthracis</i> HDZK-BYSB7	
	CP020723.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> STRAIN BM-BT15426	
HH41	CP18933.1 <i>Bacillus cereus</i> strain ISSFR-9F	93.28
	CP054568.1 <i>Bacillus anthracis</i> STRAIN FDAARGOS_795	

Con las secuencias de los genes 16S ARNr y *gyrB* se elaboró el respectivo árbol filogenético para la cepa HH10 y HH41, utilizando como grupo externo la bacteria *Pantoea* cepa 168. En la filogenia es evidente la distancia evolutiva entre *Pantoea* cepa 168 y *Pantoea ananatis*, constituyéndose ramas y clúster de taxones más distales entre especies (**Figura 25 y 26**).

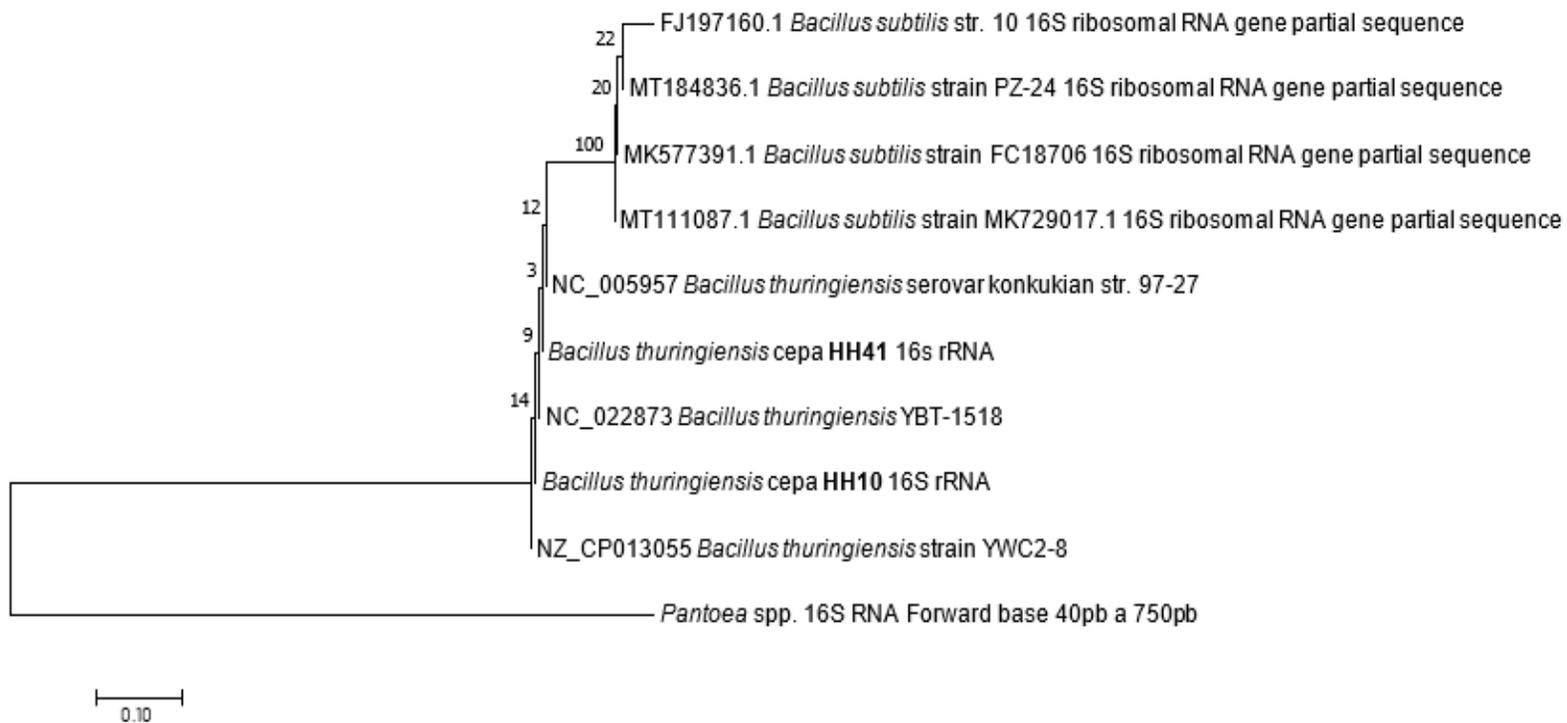


Figura 25. Árbol filogenético de los aislados HH10 y HH41 determinada por el gen 16S ARNr.

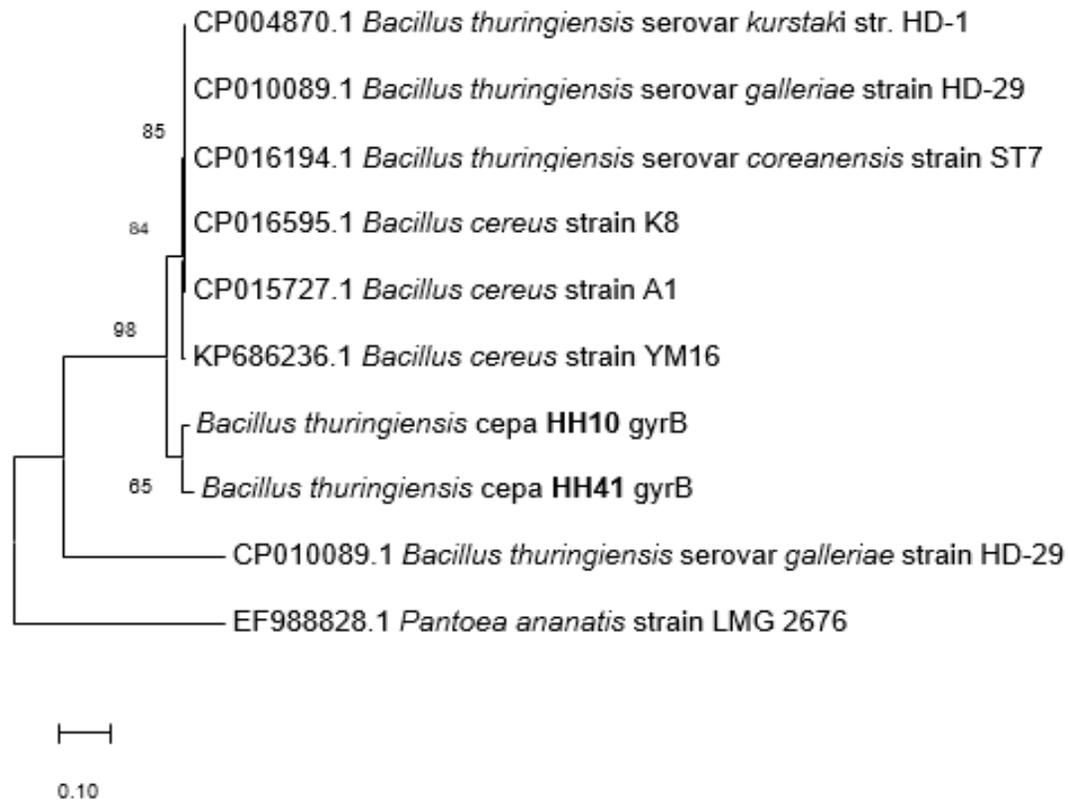


Figura 26. Árbol filogenético de los aislados HH10 y HH41 determinada por el gen *gyrB*.

5.6 Evaluación de la Tensión superficial de los sobrenadantes de las cepas HH10 y HH41

La tensión superficial que se toma como parámetro es la del agua que equivale a 72.8 mD/m, la registrada por el medio de cultivo PGas fue de 62.8 mD/m la del Tween80 al 0.11 % dio 62.8 mD/m, mientras que los aislados HH10 y HH41 oscilo entre 53.2 y 55.2 mD/m. En la **Figura 27** se muestra que no hay diferencia en la disminución de la tensión superficial entre las cepas HH10 y HH41, sin embargo, si hay diferencia con respecto al medio PGas y agua más Tween80, el agua fue el tratamiento control y el punto de referencia de la tensión superficial. Esto significa que, estas bacterias producen algún tipo de biosurfactante que hace disminuir la tensión superficial del agua, aunque en menor grado que el agua más Tween80 que es un tensoactivo comercial y que por su naturaleza disminuye la tensión del agua en mayor grado.

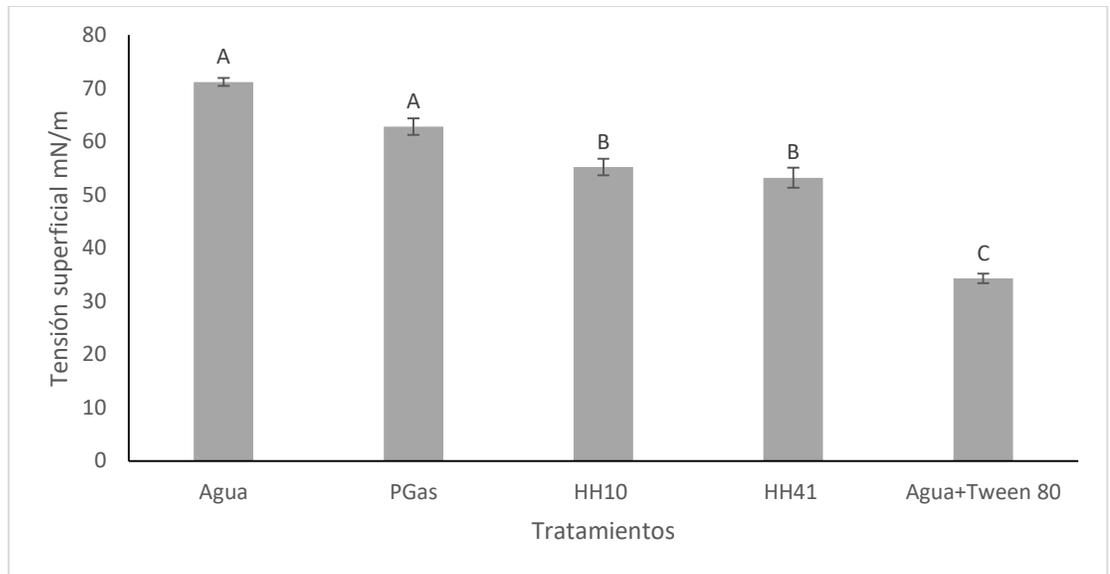


Figura 27. Disminución de la tensión superficial por las bacterias HH10 y HH41 cultivadas en medio PGas hasta las 96 h. Diferentes letras en los tratamientos indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Tratamiento de agua fue tomada como control.

5.7 Actividad hemolítica de las cepas HH10 y HH41

La detección de la actividad hemolítica es una prueba cualitativa para microorganismos que producen algún tipo de biosurfactante. Los aislados patógenos fueron positivos para la prueba de hemólisis de tipo alfa, al formarse un halo alrededor del punto en donde fue inoculado el sobrenadante (**Figura 28**).

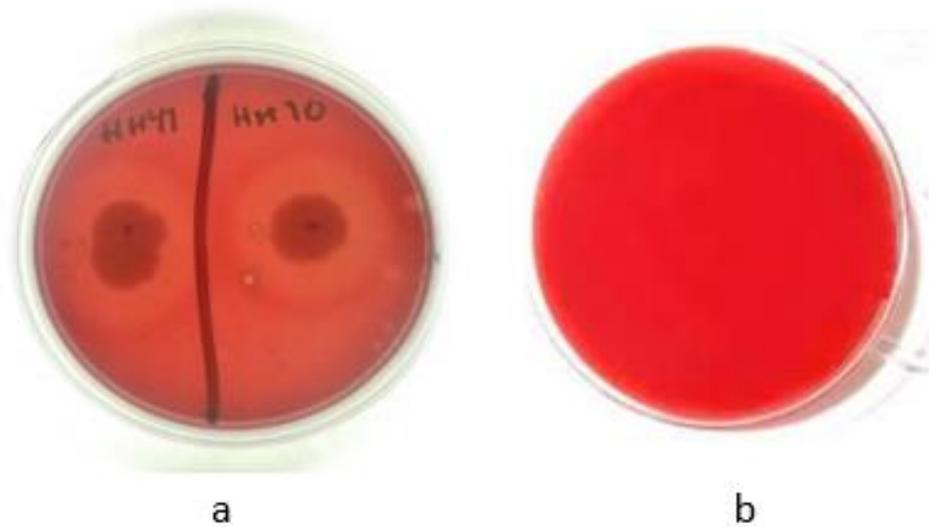


Figura 28. a) Formación de halos en medio agar-sangre a causa de la aplicación del sobrenadante de las cepas HH10 y HH41 cultivadas hasta las 48 h. b) Medio agar-sangre sin formación de halo por la aplicación de medio de cultivo PGas.

Capítulo VI

6. Discusión

Después de más de 70 años de uso de insecticidas químicos y de los efectos secundarios sobre el ambiente y hombre, actualmente en la agricultura moderna se están utilizando menos plaguicidas y e incrementando el uso de productos mas selectivos y menos contaminantes. Los bioplaguicidas son más selectivos y menos contaminantes, se emplean para todos los tipos de cultivos para el control de plagas. Los bioplaguicidas a base de bacterias ocupan un 74 % del mercado y la especie *B. thuringiensis* es la que mas se utiliza en el control de plagas (Siegwart *et al.*, 2015). En el presente trabajo se aislaron bacterias de cadáveres de *D. opuntiae* plaga primaria del nopal y se seleccionó una cepa con potencial para desarrollar un bioinsecticida.

Dactylopius opuntiae es la plaga más importante en la producción de nopal verdura distribuida en todo el mundo, esta plaga representa una amenaza constante ya que está presente en toda la vida productiva de las plantas de nopal *O. ficus-indica* y se le considera plaga primaria, en México la podemos encontrar en cualquier época del año y en cualquier etapa fenológica del cultivo. Además, de ser de fácil dispersión causando tanto pérdidas económicas en los cultivos de nopal verdura como problemas ecológicos (Chávez-Moreno *et al.*, 2009; López-Rodríguez *et al.*, 2018).

Existe pocos trabajos sobre el manejo de esta plaga y los métodos alternativos al químico, debido a ello los residuos de insecticidas altamente tóxicos han causado problemas en la comercialización del nopal verdura, sobre todo a países importadores como Estados Unidos de Norteamérica (Aldana-Madrid *et al.*, 2008; Angeles-Nuñez *et al.*, 2014; Ramírez-Bustos *et al.*, 2018).

Las muestras de cadáveres de *D. opuntiae* fueron recolectadas en el estado de Morelos en plantaciones altamente infestadas para asegurar que se podía encontrar bacterias patógenas, los sitios de muestreo estuvieron libres de manejo de la plaga, para evitar tomar muestras de insectos muertos por moléculas tóxicas como insecticidas, este punto fue importante para disminuir el aislamiento de bacterias oportunistas.

Aunque se obtuvieron bacterias Gram negativas y Gram positivas, se decidió trabajar con aquellas que fueran formadoras de esporas y algunas de ellas formadoras de cuerpos paraesporales o cristales proteicos (Vilas-Boas *et al.*, 2007). Debido a que en la literatura la mayoría de este tipo de bacterias están reportadas como bacterias GRAS (Generally Recognized as Safe) o bacterias inocuas al humano término designado por FDA, varias de estas bacterias han quedado registradas en la Agencia de Protección ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos.

Hay pocos estudios acerca de especies de bacterias como *Bacillus thuringiensis* que sean tóxicas a insectos del orden Hemiptera, los pocos que existen han sido sobre patogenicidad y virulencia hacia áfidos de forma *in vitro*, sin embargo, a la fecha no hay productos biológicos comerciales disponibles para el control de insectos chupadores. Varias limitantes se presentan para realizar investigaciones en la búsqueda de bacterias patógenas hacia *D. opuntiae* ya que no existen metodologías reportadas para realizar los bioensayos *in vitro*. Para el caso de hemípteros como *Myzus persicae* y *Melanaphis sacchari* existen dietas en las que se coloca la bacteria y el complejo espóra-cristal en la dieta líquida (Torres-Quintero *et al.*, 2013; Toledo-Hernández *et al.*, 2018).

En este trabajo, se da el primer reporte de dos cepas bacterianas patógenas a *D. opuntiae*, aisladas de cadáveres del mismo insecto plaga. Toledo-Hernández (2018) aisló 80 cepas bacterianas de cadáveres del mismo insecto plaga y obtuvo

20 con características del genero *Bacillus* spp y cuatro de estas cepas mostraron patogenicidad hacia *M. sacchari*. Por otro lado, se ha demostrado que bacterias como *B. thuringiensis* tiene un mayor crecimiento en el interior de cadáveres de insectos, que en otros ambientes como suelo, hojas y otros nichos. Esto ocurre porque la bacteria encuentra los requerimientos nutritivos para crecer vegetativamente (Hendriksen y Hansen, 2002; Guillen y Porcar, 2012).

Las aplicaciones del complejo espora- cristal fueron realizadas en la etapa de ninfa II ya que el cuerpo aún está cubierto con pocos filamentos cerosos que lo protegen, tal como lo menciona Tulloch (1970) que debería ser en estado ninfal I. Sin embargo, es un estadio difícil de manejar para realizar los bioensayos de patogenicidad, debido a que su tamaño es de aproximadamente de 1 mm y es móvil. Tomando en cuenta este detalle se decidió que los bioensayos de patogenicidad deberían realizarse en el estado ninfal II, en esta etapa la ninfa es sésil, es decir, se encuentra fijada sobre la superficie de la penca de nopal, lo que facilitó la toma de datos de mortalidad. Otros trabajos realizados en el control de esta plaga aplicaron hongos, pero en ninfa I y hembras adultas con el inconveniente de aplicar productos adicionales para la remoción de filamentos cerosos y algunos extractos de plantas con efecto insecticida (Santos *et al.*, 2011; Da Silva *et al.* 2016).

La cepa HH41 mostró una mortalidad del 30.78 % a 100 µg/mL, de proteína total, al aumentar la concentración hasta los 1000 µg/mL, esta mortalidad no se vió aumentada. En algunas ocasiones se pueden presentar fenómenos como la hormesis, tiene que ver con la dosis-respuesta siendo un tema científico debatido durante el siglo XX por no ser tan claro en los fenómenos biológicos (Agathokleous y Calabrese, 2019). Esta respuesta es bifásica, se caracteriza por una respuesta de inhibición por dosis alta y una estimulación por una baja e involucra factores de estrés bióticos y abióticos, incluyendo los insecticidas o bacterias entomopatógenas (Calabrese y Baldwin, 2003; Calabrese, 2008; Cluter, 2013).

Por otro lado, una baja mortalidad con la cepa HH41 podría estar relacionada a reacciones innatas del insecto (Dzik, 2010), ya que estos activan mecanismos de defensa que intentan combatir la infección, mientras que los patógenos secretan factores de virulencia para romper todas las barreras hostiles. Por ejemplo, se ha demostrado que el efecto en la inhibición de la infección por *B. thuringiensis* en larvas de *Galleria melonella* se puede dar por aumento en las cantidades de péptidos antimicrobianos y mayor transcripción de genes que codifican estos péptidos (Wojda y Taszłow, 2013).

La cepa HH41 no alcanzó a matar más del 50 % de los insectos en los bioensayos de patogenicidad, sin embargo, la cepa HH10 mostró una mortalidad de *D. opuntiae* del 29.78 al 62.52 %, en dosis de los 150 a los 450 µg/mL y una CL₅₀ de 403.293 µg/mL, aplicados de forma directa sobre las ninfas en trozos de nopal. Kim *et al.* (2011) mencionan que un diramnolípido producido por la bacteria *Pseudomonas* sp. causó una mortalidad sobre *M. persicae* del 50 y de un 100 % a concentraciones de 40 y 100 µg/mL, respectivamente.

Jang *et al.* (2013) identificaron una orfamida producida por *Pseudomonas protegens* F6 que en bioensayos in vivo sobre *M. persicae* lograron obtener una CL₅₀ 34.5 µg/mL. Yun *et al.* (2013) reportaron una surfactina producida por *B. amyloliquefasciens* G1 que causó mortalidades del 95.19 y 99.04% a concentraciones de 500 y 1000 µg/mL aplicada tópicamente sobre *M. persicae*, la surfactina está formada por grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que podrían afectar la cutícula del pulgón, ya que esta consiste de variadas mezclas de moléculas lipofílicas que pueden interactuar con las moléculas anfifílicas de la surfactina. Los biosurfactantes afectan la cutícula del pulgón induciendo una deshidratación causando la muerte, en el presente trabajo también se observó una deshidratación en las ninfas de *D. opuntiae* lo que probablemente fue la causa de la muerte.

En este trabajo se evaluaron las cepas patógenas a *D. opuntiae* contra adultos de *A. mellifera* para determinar su especificidad, y que no fueran patógenas

a organismos no blanco, como los insectos adultos de abejas, Soni y Thakur (2011) realizaron este tipo de trabajos para demostrar la especificidad de bioagentes entomopatógenos. En 1990 Vanderberg reportó que *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* reducen la longevidad de las abejas cuando esta se aplica en altas concentraciones, sin que se notara algún tipo de infección o patología.

Los postulados de Köch se realizaron mediante la observación y toma de fotografías de los insectos muertos a las 96 h después aplicado el tratamiento con las cepas HH10 y HH41, en estas se observaron cambios en la coloración de la cutícula de las ninfas, además de un aspecto deshidratado. Mediante la obtención de los perfiles proteicos de las cepas extraídas tanto de ninfas como del sistema digestivo, muestran que se cumplieron los postulados de Koch al observarse patrones similares en los perfiles proteicos, Torres-quintero *et al.* en el 2016 realizaron este tipo de trabajos demostrando que la aplicación de *B. thuringiensis* eran los responsables de la mortalidad de *M. persicae*, al igual que Peña *et al.* en 2006 mostraron que los perfiles proteicos de cepas obtenidas en los bioensayos de mortalidad de *Epilachna varivestis* eran similares antes y después. Ambas cepas bacterianas producen un cuerpo de inclusión parasporal y la proteína principal es de aproximadamente de 100 kDa.

Otros trabajos se han realizado en el control de *D. opuntiae* mediante hongos entomopatógenos reportando una mortalidad que oscila entre 63.23 y 100 % con el hongo *Fusarium incarnatum* en combinación con extractos de *R. communis* y *P. pyramidalis* (Da Silva *et al.*, 2015). Sin embargo, ninguno de estos estudios investigó la aplicación de microorganismos sin ningún tipo de coadyuvante y las aplicaciones de los microorganismos se combinaron con otros tipos de sustancias, que tienen un efecto sobre el insecto en sí, como aceites y surfactantes.

Las cepas HH10 y HH41 quedaron dentro del grupo *Bacillus cereus sensu lato* en base a la amplificación del gen 16S ARNr y *gyrB*, estos genes se encuentran

distribuidos universalmente en todas las especies de bacterias (McMacken *et al.*, 1987) y se han utilizado para diferenciar especies dentro del género *Bacillus* (Dubnau *et al.*, 1965), aunque los iniciadores utilizados para amplificar el gen 16S ARNr son universales y no específicos, esto ha sido muy útil para descubrir nuevos grupos taxonómicos (Nielsen *et al.*, 1999). Yamamoto y Haramaya (1995) mencionan que el gen *gyrB* es confiable para diferenciar especies pertenecientes al grupo *B. subtilis*. Aunque se muestra que estas cepas se encuentran dentro del grupo *B. cereus sensu lato*, al ser observados en microscopio se vio un cuerpo parasporal que son cristales proteicos formados en su fase de esporulación y que son liberados al medio cuando se produce la lisis de la célula. Esta es la principal característica que diferencia a *B. thuringiensis* de las otras especies del grupo *B. cereus sensu stricto*, donde se incluye a *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, y *B. pseudomycoides* (Henderson *et al.* 1995).

Al realizar el análisis del árbol filogenético por el modelo Neighbor-Joining de las cepas HH10 y HH41 de *B. thuringiensis* basado en secuencias del gen ARN ribosómico que actualmente es el objetivo de estudio más importante en ecología bacteriana (Větrovský y Baldrian, 2013). Se observó la relación evolutiva con otras especies y la determinación de las distancias evolutivas, estas cepas se encuentran cercanas entre taxones del género *Bacillus* y con mayor distancia con las especies de *Pantoea*, cabe mencionar que estas cepas fueron obtenidas de diferentes municipios en el Estado de Morelos.

Diferentes especies de bacterias producen biosurfactantes, y aunque tienen varios roles en la naturaleza, se les ha dado un nuevo enfoque en el control de insectos plaga. Se ha reportado que el biosurfactante producido por *B. thuringiensis* controlan el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* a través de la producción de la surfactina (Deepak y Jayapradha, 2014); sin embargo, este mismo metabolito también es producido por otras especies, como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. clausii* (Ghribi *et al.*, 2012; Yun *et al.*, 2013; Hazra *et al.*, 2015). Existen informes

de bacterias que reducen la tensión superficial del agua de 72.8 hasta 31.1 mN/m crecidas hasta las 48 horas en medios para producción de biosurfactantes como *B. subtilis* (Yang *et al.*, 2016). Estas cepas bacterianas solo redujeron la tensión superficial a 55.2 para el aislado HH10 y 53.2 crecieron en el Medio PGas hasta un tiempo de 96 horas, este resultado comparado con otras bacterias que disminuyen la TS es relativamente bajo, sin embargo, estos metabolitos secundarios podrían tener actividad insecticida.

Los aislados HH10 y HH41 fueron positivos para disminución de la tensión superficial ya que es un parámetro más para el monitoreo de microorganismos productores de biosurfactantes (Carrillo *et al.*, 1996). La disrupción de los eritrocitos se da por diversas causas debido a que la membrana está compuesta principalmente por lípidos y proteínas de membrana que permiten su anclaje con el citoesqueleto celular, en específico los eritrocitos están compuestos por 52% de proteínas, 40% de lípidos y 8% de carbohidratos como las glicoproteínas (Dodge y Hanahan, 1963). La cohesión de lípidos y proteínas se debe a interacciones no covalentes, como interacciones de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas y efecto hidrófobo.

En la literatura se describen varios fenómenos de lisis de eritrocitos, como la lisis osmótica en medios hipotónicos y la lisis inducida por tensoactivos (Böttger *et al.*, 2012; Soderlind y Karlsson, 2006). La lisis celular por tensoactivos puede ocurrir tanto por vía osmótica como por solubilización, con formación de micelas mixtas dependiendo de la concentración de tensoactivo, por lo que el límite entre esos dos mecanismos no está claramente definido (Shalel y Streichman, 2002). Sin embargo, para los mecanismos de lisis inducidos por ambos tensoactivos, los primeros pasos basados en las interacciones tensoactivos y membrana son similares, la lisis osmótica parece ser un fenómeno más lento que la solubilización por membrana.

Capítulo VII

7. Conclusiones

- De los 41 aislados que presentaron producción de esporas y cristales proteicos la HH41 mostró una mortalidad del 30.78 % de las ninfas II evaluada a las 96 horas mientras que el HH10 mostró el 62.52%.
- Solo el aislado HH10 mostro una virulencia de 403.2 $\mu\text{g/mL}$ con el complejo spora-cristal, con una mortalidad máxima del 62.52 %.
- De acuerdo a los bioensayos de especificidad de las cepas HH10 y HH41 contra *Apis mellifera*, se considera que no afecta a insectos no blanco, manteniendo especificidad hacia la plaga.
- Los aislados HH10 y HH41 fueron identificadas molecularmente como *Bacillus thuringiensis* mediante los genes marcadores 16S del ARNr y *gyrB*, ambas cepas presentan cuerpos paraesporales o cristales proteicos característicos de esta especie.
- Tanto el aislado HH41 y HH10 crecidos en medio PGas específico para la producción de biosurfactantes redujeron la tensión superficial del agua de 72 mD/m a 55.3 para la cepa HH10 y a 53.2 para la cepa HH41.
- Finalmente, se realizaron pruebas de hemólisis para ambos aislados patógenos a *D. opuntiae*, que fueron positivas.

Perspectivas

- Amplificar el gen específico de la proteína cry, específico para la especie *Bacillus thuringiensis*.
- Llevar a cabo la purificación de las proteínas mayoritarias de los aislados patógenos a *D. opuntiae* y demostrar cuál de ellos tiene el efecto insecticida.
- Hacer bioensayos de patogenicidad con el biosurfactante purificado para demostrar si este metabolito es capaz de provocar la patogenicidad de *D. opuntiae*
- En caso de encontrar que le proporciona la patogenicidad llevar a cabo combinaciones del metabolito y proteína para aumentar la virulencia.

Capítulo VIII

8. Literatura

- Agathokleousa E. y E. J. Calabrese. 2019. Hormesis: The dose response for the 21st century: The future has arrived. *Toxicology* 425: 152249.
- Aizawa K. 2001. Shigetane Ishiwata: his discovery of sotto-kin (*Bacillus thuringiensis*) in 1901 and subsequent investigations in Japan. Proceedings of a Centennial Symposium Commemorating Ishiwata's Discovery of *Bacillus thuringiensis*. Japan: Kurume.
- Aldana-Madrid M., M.C. Garcia-Moraga, G. Rodriguez-Olibarria, M.I. Silveira-Gramont, y A.I. Valenzuela-Quintanar. 2008. Determination of organophosphate insecticides in fresh and dried prickly pear cactus pads. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 31: 133-139.
- Alquisira-Ramirez, E.V., J.R. Paredes-Gonzalez, V.M. Hernandez-Velazquez., J.A. Ramirez-Trujillo y G. Peña-Chora. 2014. *In vitro* susceptibility of *Varroa destructor* and *Apis mellifera* to native strains of *Bacillus thuringiensis*. *Apidologie*. 45: 707-718.
- Altschul S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers y D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3): 403-410.
- Angeles-Nuñez J.G., J.L. Anaya-López, M.L. Arevalo-Galarza, G. Leryva-Ruelas, S. Anaya-Rosales y T.O. Martínez-Martínez. 2014. Analysis of the sanitary quality of nopal in Otumba state of Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 5: 129-141.
- Angus, T. A. 1954. A bacterial toxin paralysing silkworm larva. *Nature*. 173 (4403): 545-546.
- Arenas I, Bravo A, Soberón M, Gómez I. 2010. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *J Biol Chem*. 285:12497–12503

- Badii M.H. y J.L. Abreu. 2006. Biological control a sustainable way of pest control. *International Journal of Good Conscience*. 1(1): 82-89
- Badii M.H. y A.E. Flores. 2001. Prickly pear cacti pest and their control in Mexico. *Florida Entomologist*. 84: 503-505.
- Bais H.P., R. Fall y J.M. Vivanco. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*. 134: 307–319.
- Bernhard K., P. Jarrett, M. Meadows, J. Butt, D.J. Ellis, G.M. Roberts, S. Pauli, P. Rodgers y H.D. Burges. 1997. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology*. 70: 59-68.
- Böttger S., K. Hofmann y M.F. Melzig. 2012. Saponins can perturb biologic membranes and reduce the surface tension of aqueous solutions A correlation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 20: 2822-2828.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Bravo-Hollis H. 1978. Las cactáceas de México. 2ª ed. Universidad. Nacional Autónoma de México. 743 pp.
- Bucher G. E. 1959. The bacterium *Coccobacillus acridiorum* d'Herelle: its taxonomic position and status as a pathogen of locusts and grasshoppers. *J. Insect Pathol.*, 1, 331e346.
- Calabrese E.J. 2008. Hormesis: Why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27 (7): 1451-1474.
- Calabrese E.J. y L. Baldwin. 2003. Toxicology rethinks its central belief. *Nature* 421: 691–692.
- Carrillo P.G., C. Mardaraz, S.A. Pitta-Alvarez y A.M. Giuliett. 1996. Isolation and selection of biosurfactant producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 12: 82 -84.

- Castillo V.J. 1993. Relación entre algunas características anatómicas del nopal (*Opuntia spp.*) y el establecimiento de la cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa). Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Chapingo, México. 90 pp.
- Chávez-Moreno C.K., A. Tecante y A. Casas. 2009. The *Opuntia* (Cactaceae) and *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) in Mexico: a historical perspective of use, interaction and distribution. *Biodiversity and Conservation*. 18: 3337. doi.org/10.1007/s10531-009-9647-x.
- Cutler G.C. 2013. Insects, insecticides and hormesis: evidence and considerations for study. *Dose-Response*. 11: 154–177.
- COFEPRIS.
<http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.as>. (accessed on 31 July 2019)
- Colegio de Postgraduados. 2005. Diagnóstico fitosanitario del nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) en Tlalnepantla, Morelos. Memoria de la primera reunión del Grupo Interdisciplinario de Investigación en Nopal. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México. 78 pp
- Cruz-Rodríguez J.A., E. González-Machorro, G. Villegas, R. Rodríguez y L. Mejía. 2016. Autonomous biological control of *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) in a prickly pear plantation with ecological management. *Environmental Entomology*. 45: 642-648.
- Cuevas-Salgado M.I., F.A. Castañeda-Templos y C. Romero-Nápoles. 2015. Aceites vegetales comestibles como alternativa de control para la cochinilla silvestre *Dactylopius opuntiae* Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae), bajo condiciones de campo. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Entomología*. Número especial 1: 64–70
- Da Silva S.A.C., O.R.L. Soares, A.F. Da Costa, T.P. Vieira y N.T. de Oliveira. 2016. Controlling *Dactylopius opuntiae* with *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex and extracts of *Ricinus communis* and *Poincianella pyramidalis*. *Journal Pesticide Science*. 89: 539-547.

- de Barjac, H. y A. Bonnefoi. 1968. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. *Journal Invertebrate Pathology*. 11: 335-347.
- De Lotto G. 1974. On the status of the cochineal insects (Homoptera: Coccoidea: Dactylopiidae). *Journal of the Entomological Society South Africa*. 37: 167-193.
- Deepak R. y R. Jayapradha. 2014. Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus thuringiensis* pak2310: A potential antagonist against *Fusarium oxysporum*. *Journal de Mycologie Médicale*. 25 (1): e15-e24.
- Delgadillo V.I., M.A. González y R. Rivera. 2008. Manejo fitosanitario del nopal verdura en Milpa Alta, Distrito Federal. Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Distrito Federal (CESAVEDF). 63 p.
- Desjardins A.E. 2006. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology. 260 pp
- Dodge J.T., C. Mitchell y D.J. Hanahan. 1963. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 100 (1): 119–30.
- Yun D.C., Yang S.Y., Kim Y.C., Kim I.S y Yung H. 2013. Identification of surfactin as an aphicidal metabolite produced by *Bacillus amyloliquefaciens* G1. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 56 (6): 751-753.
- Dubnau D., I. Smith, P. Morell y J. Marmor. 1965. Gene conservation in *Bacillus* species. I. Conserved genetic and nucleic acid base sequence homologies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 54 (2): 491-498.
- Dzik J.M. 2010. The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. *Acta Biochimica Polonica*. 57(4): n443-66.
- Eisner T., S. Nowicky S., M. Goetz y J. Meinwald. 1980. Red cochineal dye (carminic acid): its role in nature. *Science*. 208:1039-1042.
- Engelhardt H. 2007. Are S-layers exoskeletons? The basic function of protein surface layers revisited. *Journal of Structural Biology*. 160(2):115-124.

- Evans J.D., Chen Y.P., Prisco G.D., Pettis J., Williams V. 2009. Bee cups: single-use cages for honey bee experiments. *Journal of Apicultural Research*, 48(4): 300-302.
- Falkow S. 2004. Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity - a personal recollection 15 years later. *Nature Review Microbiology*. 2: 67-72.
- Flores-Valdez C.A. 1995. "Nopalitos" production, processing and marketing. Agroecology, cultivation and uses of cactus pear. In: Barbera GP. Inglese and E. Pimienta-barrios (Eds). *FAO Plant Production and Protection Paper* .132: 92-99.
- Fredericks D.N y D.A. Relman. 1996. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clinical Microbiology Review*. 9 (1): 18–33
- Geetha I., K.P. Paily y A.M. Manonmani. 2012. Mosquito adulticidal activity of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*. *Pest Management Science*. 68: 1447-1450.
- Gebeshuber I. C., Aumayr, M., Hekele O., Sommer R., Gösselsberger C. y Gruenberger C. 2010. Bacilli, green algae, diatoms and red blood cells how nanobiotechnological research inspires architecture
- Ghribi D., L. Abdelkefi-Mesrati, H. Boukedi, M. Mouna Elleuch, S. Ellouze-Chaabouni y S. Tounsi. 2012. The impact of the *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant on the midgut histology of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) and determination of its putative receptor. *Journal of Invertebrate Pathology*. 109: 183-186.
- Girard F, Vachon V, Prefontaine G, Marceau L, Vincent LG, Ch SJ-L, Masson L, Laprade R. 2008. Cysteine scanning mutagenesis of alpha 4 a putative pore forming helix of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa. *Appl Environ Microbiol* 74:2565–2572.
- Githure, C.W., H.G. Zimmermann y J.H. Hoffmann. 1999. Host specificity of biotypes of *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Oactylopiidae): prospects for

- biological control of *Opuntia stricta* (Haworth) Haworth (Cactaceae) in Africa." *African Entomology*. 7(1): 43-48.
- Gohar M., K. Faegri, S. Perchat, S. Ravnum, O. Okstad, A.M. Gominet, A.B. Kolso y D. Lereclus. 2008. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One*. 3: 2793.
- Gómez I, Sánchez J, Miranda R, Bravo A, Soberón M. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett* 513:242–246.
- González Jr. J.M., H.T. Dulmage y B.C. Carlton. 1981. Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*. 5: 351-365.
- Granados D. y A. D. Castañeda. 1991. El nopal: historia, fisiología, genética, e importancia frutícola. Trillas, México.
- Griffith M.P. 2004. The origin of an important cactus crop. *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae: new molecular evidence. *American Journal of Botany*. 91: 1915-1921.
- Guillen M. y M. Porcar. 2012. Ecological mysteries: Is *Bacillus thuringiensis* a real insect pathogen? *Bt Research*. 3: 1-2.
- Hannay C.L. y P. Fitz-James. 1955. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner." *Canadian Journal of Microbiology*. 1(8): 694-710.
- Hazra C., D. Kundu y A. Chaudhari. 2015. Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus clausii* BS02 using sunflower oil soapstock: evaluation of high throughput screening methods, production. *The Royal Society of Chemistry*. 5: 2974–2982.
- Heimpel A.M. 1967. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Annual Review of Entomology*. 12: 287-322.

- Henderson I., Y. Dongzheng y P.C.B. Turnbull. 1995. Differentiation of *Bacillus anthracis* and other '*Bacillus cereus* group' bacteria using IS231-derived sequences. *FEMS Microbiology Letters*. 128: 113–118.
- Hendriksen N.B. y B.M. Hansen. 2002. Long-term survival and germination of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a field trial. *Canadian Journal of Microbiology*. 48: 256-261.
- Hernández G.L. 1993. Plagas y enfermedades del nopal en México. Reporte de Investigación 11. Centro de investigaciones económicas, sociales y tecnológicas de la agroindustria y de la agricultura mundial. Universidad Autónoma Chapingo (UACH), Chapingo, Estado de México. 52 p
- Hernández-Hernández F.C., F.G. García, I.R. Dueñas I y H. Lanz. 2005. La cochinilla fina del nopal, colorante mexicano para el mundo. *Ciencia*. 78-86
- Hukuhara T. 1987. Epizootiology: prevention of insect diseases. En J. R. Fuxa y Y. Tanada (Eds.), *Epizootiology of insect diseases*. New York: John Wiley & Sons. 497-512.
- Ibrahim M.A., N. Griko, M. Junker y L.A. Bulla. 2010. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*. 1: 31-50.
- INIFAP. 2015. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias Agrícolas y Forestales. Manejo del cultivo de nopal. 20.
- Inglese P., C. Mondragon., A. Nefzaoui, C. Saenz, M. Taguchi, H. Makkar, Louhaichi M. 2018. *Ecología del cultivo, manejo y usos del nopal*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Jang J.Y., S.Y. Yang y Y.C. Kim. 2013. Identification of orfamide A as an insecticidal metabolite produced by *Pseudomonas protegens* F6. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61: 6786–6791.
- Jiménez D.I., S.A. Medina y J.N. Gracida. 2010. Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 26: 65-84.
- Jiménez-Juárez N, Muñoz-Garay C, Gómez I, Saab-Rincon G, Damian-Alamazo JY, Gill SS, Soberón M, Bravo A. 2007. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants

affecting oligomer formation are non toxic to *Manduca sexta* larvae. J Biol Chem 282:21222–21229

- Kiesling R. 1999. Origen, domesticación y distribución de *Opuntia ficus-indica*. Journal of the Professional Association for Cactus Development. 3: 5059.
- Kim S., Y. Kim, S. Lee, J. Kim, M. Yun y S. Kim S. 2011. Insecticidal activity of Rhamnolipid isolated from *Pseudomonas* sp. EP-3 against green peach aphid (*Myzus persicae*). Journal of Agriculture and Food Chemistry. 59: 934–938.
- Klein H. 2002. Biological control of invasive cactus species (Family Cactaceae). Cochineal insects (*Dactylopius* spp.). PPRI Leaflet Series, Weeds Biocontrol. 2.2: 1–3.
- Kosaric N. y F. Vardar-Sukan. 2015. Biosurfactants: production and utilization processes, technologies, and economics. CRC Press, Boca Raton. 371 pp.
- Kunze A., L. Witte, M. Aregullin, E. Rodriguez y P. Proksch. 1996. Anthraquinones in the leaf beetle *Trirhabda geminata* (Chrysomelidae). Zeitschrift für Naturforschung. 51: 249–252.
- Lacey L.A., R. Frutos, H.K. Kaya y P. Vail. 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? Biological Control. 21: 230-248.
- Lacey L.A. 2017. Entomopathogens used as microbial control agents. Microbial control of insect and mite pests. Academic Press. 3-12.
- Lecadet M.M., M.O. Blondel y J. Ribier. 1980. Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. berliner 1715, using bacterial phage CP54 Ber. Journal of General Microbiology. 121: 203-212.
- Lim D.J., S.Y. Yang, M.Y. Noh, C.W. Lee, J.C. Kim y I.S. Kim. 2017. Identification of lipopeptide xantholysins from *Pseudomonas* sp. DJ15 and their insecticidal activity against *Myzus persicae*. Entomological Research. 47: 337-343.
- López I., F. Ruiz-Larrea, L. Cocolin, E. Orr, P. Trevor, M. Megan, J. VanderGheynst y D.A. Mills. 2003. Design and evaluation of PCR primer's for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology. 69: 6801-6807.

- López-Rodríguez P. E., Méndez-Gallegos S. de J., Aquino-Pérez G., Mena-Covarrubias J., y Vanegas-Rico J. M. 2018. Estadísticos demográficos de *Dactylopius opuntiae* Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae) en condiciones de invernadero. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 17(2), 31-42.
- McMacken R., L. Silver Y C. Georgopoulos. 1987. DNA replication, p. 578–580. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Maki-Díaz. 2014. Tendencias de producción y comercialización de nopalito de exportación, calidad y manejo postcosecha. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 136 p.
- Mann J. 1969. Cactus-feeding insects and mites. *Bulletin of the United States National Museum*. 256:1–158.
- Marchesi J.R., T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin T.A., J.C. Fry, S.J. Hiom y W.G. Wade. 1998. Design and evaluation of useful bacterium specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16s rARN. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 795-799.
- Martin P.W. y R. S. Travers. 1988. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 2437-2442.
- Mazzeo G., S. Nucifora, A. Russo y P. Suma. 2019. *Dactylopius opuntiae*, a new prickly pear cactus pest in the Mediterranean: an overview. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 167: 59-72.
- Mena C. J. 2008. Bases para desarrollar un programa de Manejo integrado contra plagas y enfermedades del nopal. VII Simposium-Taller “Producción y Aprovechamiento del nopal en el Noreste de México”. *Salud Pública y Nutrición*. 2:37-53.
- Méndez G.J.S. 1992. Tasas de supervivencia y reproducción de la grana-cochinilla *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae) en diferentes

- temperaturas. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Chapingo, Estado de México. 113 pp.
- Montiel L., J. Valdez y C. Llanderal-Cazares. 1998. Morfología externa de *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae). En: Memorias del I Congreso Internacional de Grana Cochinilla y Colorantes Naturales, Oaxaca. México.
- Muñoz-Garay C., L. Portugal, L. Pardo-López, N. Jimenez-Juarez, I. Arenas, I. Gomez, R. Sanchez-López, R. Arroyo, A. Holzenburg, C.G. Savva, M. Soberon y A. Bravo. 2009. Characterization of the mechanism of action of the genetically modified Cry1AbMod toxin that is active against Cry1Ab-resistant insects. *Biochemica et Biophysica Acta. Biomembranes*. 1788 (10): 2229–2237.
- Nielsen A.T., W.-T. Liu, C. Filipe, L. Grady, S. Molin y D.A. Stahl. 1999. Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorous removal reactor. *Applied Environmental Microbiology*. 65: 1251– 1258.
- Nieto H.R. y C. Llanderal. 1996. Mecanismos de reproducción de *Dactylopius coccus*. En: Avances en la investigación. Instituto de Fitosanidad. Montecillo, Texcoco Estado de México. 88 pp.
- Nubel U., B. Engelen, A. Felske, J. Snaidr, A. Wieshuber, R. Amann, W. Ludwig y A. Backhaus. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16s rRNAs in *Paenicibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis *Journal of Bacteriology*. 178: 5636-5643.
- O'Donnell K., C. Gueidan S. Sink. 2009. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genetics and Biology*. 46: 936–948.
- Ochoa M.J. y G. Barbera. 2017. History and economic and agroecological importance. *Crop ecology, cultivation and uses of cactus pear* (ed. P. Inglese, C. Mondragon, A. Nefzaoui y C. Saenz). pp.1–11.FAO, Rome, Italy.
- Onstad D.W., J.R. Fuxa, R.A. Humber, J. Oestergaard, D.I. Shapiro-Ilan, V.V. Gouli, R.S. Anderson, T.G. Andreadis y L.A. Lacey. 2006. An abridged glossary of

terms used in invertebrate pathology. <http://www.sipweb.org/glossary>. Society for Invertebrate Pathology.

- Pacheco S., I. Gómez, I. Arenas, G. Saab-Rincon, C. Rodríguez-Almazán, S.S. Gill y M. Soberón. 2009. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidasa -N and cadherin receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 284 (47): 32750-32757.
- Palacios–Mendoza C., R. Niet, C. Llanderal y H. González. 2004. Efectividad biológica de productos biodegradables para el control de la cochinilla silvestre *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Homoptera: Dactylopiidae). *Acta Zoológica Mexicana n.s.* 20: 99–106.
- Palma L., D. Muñoz, C. Berry, J. Murillo y P. Caballero. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins (Basel)*. 6: 3296-3325.
- Palomares-Pérez, M.; Rodríguez-Leyva, E.; Ramírez-Alarcón, S. and Brailowsky, H. 2010. First record of *Hesperolabops nigriceps* Reuter (Hemiptera: Miridae) on *Opuntia ficus-indica* L. (Miller) in Milpa Alta, Mexico City. *Neotropical Entomol.* Inpress. 45 p.
- Pardo-López L, Soberón M, Bravo A. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Rev* 37:3–22
- Park H.W. y B.A. Federici. 2009. Genetic engineering of bacteria to improve efficacy using the insecticidal proteins of bacillus species. *Insect Pathogens Molecular Approaches and Techiques*. 12: 275-299.
- Paterson I.D, J.H. Hoffmann, H. Klein, C.W. Mathenge, S. Naser y H.G. Zimmermann. 2011. Biological control of Cactaceae in South Africa. *African Entomology*. 19: 230–246.
- Peña G., J. Miranda-Rios, G. de la Riva, L. Pardo-López, M. Soberon y A. Bravo. 2006. An S-layer protein involved in toxicity to *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 353-360.

- Pérez G.G. 1991. Biosystematics of the family Dactylopiidae (Homoptera: Coccineae) with emphasis on the life of the *Dactylopius coccus* Costa. Thesis of Doctor of Philosophy in Entomology. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg, Virginia. 168 p.
- Pérez M. y R. Becerra. 2001. Nocheztli; el insecto del rojo carmín. CONABIO. Biodiversitas. 6 (36): 1-9.
- Portillo L. y A.L. Viguera. 2006. A review on the cochineal species in México, host and natural enemies. Proceedings of the V International Congress on cactus pear and cochineal. Acta Horticultura. 728: 249–255.
- Soderlind E. y L. Karlsson. 2006. Haemolytic activity of maltopyranoside surfactants. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 62: 254–259.
- Ramírez-Bustos I.I., V. López-Martínez, P. Juárez-López, I. Alía-Tejacal, D. Guillen-Sánchez, H. Saldarriaga-Noreña y I. Leon-Rivera. 2018. Monitoring of pesticides in the cultivation of nopal vegetable (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. in Morelos, Mexico. Agriculture. 8:174. doi:10.3390/agriculture8110174.
- Ramírez-Sánchez C.J., F.J. Morales-Flores, R. Alatorre-Rosas, J. Mena-Covarrubias y S.J. Méndez-Gallegos. 2019. Efectividad de hongos entomopatógenos sobre la mortalidad de *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) en condiciones de laboratorio. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 22: 1-14.
- Regev A., M. Keller, N. Strizhov, B. Sneh, E. Prudovsky, I. Chet, I. Ginzberg, Z. Koncz-Kalman, C. Koncz, J. Schell y A. Zilberstein. 1996. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. Applied Environmental Microbiology. 62: 3581-3586.
- Reyes-Agüero J.A., J.R.A. Aguirre y J.L.F. Flores. 2005. Variación morfológica de opuntia (Cactaceae) en relación con su domesticación en la altiplanicie meridional de México. Interciencia. 30(8): 476-484.

- Richards, A. G. 1951. The integument - of arthropods. University of Minnesota Press, Minneapolis.
- Robertson J.L., H.K. Preisler y R.M. Russell. 2003. Polo Plus Probit and Logit Analysis, User's Guide. LeOra Software. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Berkeley, California.
- Rodríguez L.C., E.H. Faúndez y H.M. Niemeyer. 2005. Mate searching in the scale insects, *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae). European Journal of Entomology. 102: 305-306.
- Romero-López B.E., A. Flores-Hernández., E. Santamaría, J.C. Salazar-Torres, M. Ramírez-Delgado y A. Pedroza-Sandoval. 2006. Identificación, biología y adaptación de la cochinilla silvestre *Dactylopius opuntiae* (Homóptera: dactylopiidae) a las condiciones ambientales de Bermejillo, Durango. Revista Chapingo Serie Zonas Áridas. 5: 41-48
- Saenz C. 2013. Opuntias as natural resource. Agro-industrial utilization of cactus pear. FAO, Rome, Italy.
- Saitou N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4: 406-425.
- Salkeld E.H. 1951. A toxicological study of certain new insecticides as "stomach poisons" to the honey bee *Apis mellifera*. Journal of Canadian Entomology. 8339-8361.
- Sandoval-Denis M., V. Guarnacia, G. Polizzi y P.W. Crous. 2018. Symptomatic citrus trees reveal a new pathogenic lineage in *Fusarium* and two new *Neocosmospora* species. Personia. 40: 1-25.
- Santos P., M. Da Silva, A. Monteiro y 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 & Technology. 21 :893-902.
- Sara M. y U.B. Sleytr U.B. 2000. S-Layer proteins. Journal of Bacteriology. 182: 859–868.

- Sebesta K., J. Farkas, K. Horska y J. Vankova. 1981. Thuringiensin, the beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. En H. D. Burges (Ed.). Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. London: Academic Press. pp. 249-281.
- SEDAGRO-Morelos. 2015. Secretaria de Desarrollo Agropecuario. <https://agropecuario.morelos.gob.mx>.
- SEDAGRO-Morelos. 2019. Secretaria de Desarrollo Agropecuario. <https://agropecuario.morelos.gob.mx>
- SENASICA. 2015. Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria. <http://senasica.gob.mx/>.
- Shalel S., S. Streichman y A. Marmur. 2002. The use of hemolysis kinetics to evaluate erythrocyte bound surfactant. *Colloids Surfaces B*. 27: 215–22.
- Sharma A., D.R. Thakur, S. Kanwar y V.K. Chandla. 2012. Diversity of entomopathogenic bacteria associated with the white grub, *Brahmina coriacea*. *Journal of Pest Science*. 86: 261–273.
- SIAP-SAGARPA. 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.siap.gob.mx> (accessed on 31 July 2019)
- Sieglwart, M., B. Graillet, C. Blachere-Lopez, S. Besse, M. Bardin, P.C. Nicot y M. Lopez-Ferber. 2015. Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review. *Frontiers in Plant Science*. 6: 381.
doi: 10.3389/fpls.2015.00381
- Silva D.M.P., A.C. Do, E.S. Mergulhão, L.V. de Medeiros, M.V.B. Figueiredo y H.A. Burity. 2013. Genetic variability of *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera, Dactylopiidae) on forage cactus in northeast Brazil. *Genetics and Molecular Research*. 12(4): 5236-5246.
- Silva L.N., Zimmer K.R., Macedo A.J. y Trentin D.S. 2016. Plant Natural Products Targeting bacterial Virulence Factors. *Chemical Reviews*. 116: 16, 9162-9236.
- Soderlind E.y L. Karlsson. 2006. Haemolytic activity of maltopyranoside surfactants. *European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics*. 62: 254–259.

- Soni J. and Thuker M. 2011. Effect of biopathogenos on Honey bees. Pest Technology. 5 (1):86-90.
- Spodek M., Y. Ben-Dov, A.C.J. Protasov, C.J. Carvalho y Z.V. Mendel. 2014. First record of *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae) from Israel. Phytoparasitica. 42: 377–379.
- Stephen T.R. y J.S. Elkinton. 2004. Pathogenicity and virulence. Journal of Invertebrate Pathology. 3: 146-151.
- Tanada Y. y H. Kaya. 1993. Insect Pathology. Academic Press. San Diego, Londres, New York. 666 pp.
- Toribio J.J. y M.A. Rodríguez. 2014. Production of biosurfactants by bacteria isolated from a mine tailing zone in Southern Mexico and their resistance to heavy metals. Journal Bacteriology Research. 6(4): 23-31.
- Torres-Quintero M.C., I. Arenas-Sosa, V.M. Hernandez-Velazquez, R. Suarez-Rodriguez y G. Peña-Chora. 2016. Characterization of *Bacillus thuringiensis* (Bacillaceae) strains pathogenic to *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). Florida Entomologist. 99(4): 639-643.
- Tulloch A.P. 1970. The composition of bees wax and other waxes secreted by insects. Lipids. 5: 247-258.
- Valdez-Cepeda R.D., F. Blanco-Macías, R.E. Vázquez-Alvarado y R. Magallanes Quintanar. 2007. Producción y usos del nopal para verdura. Revista Salud Pública y Nutrición (RESPYN). 14. Special Edition.
- Vanegas-Rico, J.M., J.R. Lomeli-Flores, E. Rodríguez-Leyva., G. Mora-Aguilera. 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): 415-43.
- Vega F. y H. Kaya. 2012. Insect pathology, Second edition. San Diego: Academic Press. 481 pp.
- Vera-Núñez J.C, Grageda-Cabrera, O. Arath, Altamirano-Hernández, Josué, Peña-Cabriales. (2010). Efecto de los surfactantes sobre la absorción de agroquímicos en plantas. Nova scientia, 2:3, 14-36.

- Větrovský T. y P. Baldrian. 2013. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PloS one*, 8(2): e57923.
- Viguera A.L. 2008. Bioinsecticidas para el control de cochinilla silvestre (*Dactylopius opuntiae* Cockerell). (Hemiptera: Dactilopidae). En: Grana cochinilla y colorantes naturales. Colegio de Posgraduados. México, pp. 74–77.
- Viguera A.L., J. Cibrián-Tovar y J. Pelayo-Ortiz. 2009. Use of botanical extracts to control wild cochineal (*Dactylopius opuntiae* Cockerell) on cactus pear. Proceedings of the VI International Congress on Cactus and Cochineal. *Acta Horticulturae*. 811: 229-234.
- Vilas B., A.P. Peruca y O.M. Arantes. 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology*. 53: 673–687.
- Wojda I. y P. Tazsłow. 2013. Heat shock affects host–pathogen interaction in *Galleria mellonella* infected with *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Insect Physiology*. 59: 894–905.
- Yang S.Y., D.J. LIM, M.Y. Noh, J.C. Kim, Y.C. Kim y I.S. Kim. 2016. Characterization of biosurfactants as insecticidal metabolites produced by *Bacillus subtilis* Y9. *Entomological Research*. doi: 10.1111/1748-5967.12200
- Yun D.C., Y.S. Yang, I.S. Kim y Y.H. Kim. 2013. Identification of surfactin as an aphicidal metabolite produced by *Bacillus amyloliquefaciens* G1. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 56: 751-753.
- Zavala LE, Pardo-López L, Cantón PE, Gómez I, Soberón M, Bravo A. 2011. Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin remain exposed to the solvent after insertion of part of domain I into the membrane. *J Biol Chem* 286:19109–11911.
- Zhang X., M. Candas, N.B. Griko, R. Taussig y L.A. Bulla. 2006. A mechanism of cell death involving an adenyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by

- the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103(26): 9897-9902.
- Zhang M.Y., A. Lovgren, M.G. Low y R. Landen. 1993. Characterization of an avirulent pleiotropic mutant of the insect pathogen *Bacillus thuringiensis*: reduced expression of flagellin and phospholipases. Infection and Immunity. 61: 4947-4954.
- Zhang Y. y R.M. Miller. 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). Applied and Environmental Microbiology. 58: 3276-3286.