

Efectividad de hongos entomopatógenos sobre la mortalidad de *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) en condiciones de laboratorio

Carlos Jesús Ramírez-Sánchez¹
Francisco Javier Morales-Flores¹
Raquel Alatorre-Rosas²
Jaime Mena-Covarrubias³
Santiago de Jesús Méndez-Gallegos^{1§}

¹Postgrado en Innovación en Manejo de Recursos Naturales-*Campus* San Luis Potosí-Colegio de Postgraduados. Iturbide 73, Col. Centro, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, México. CP. 78600. (ramirez.carlos@colpos.mx; franciscojmf@colpos.mx). ²Postgrado en Fitosanidad-Entomología y Acarología-Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. CP. 56230. (alatoros@colpos.mx). ³Programa de Entomología- Campo Experimental Zacatecas-INIFAP. AP. Núm. 18. Calera de Víctor Rosales, Zacatecas, México. CP. 98500. (mena.jaime@inifap.gob.mx).

§Autor para correspondencia: jmendez@colpos.mx.

Resumen

Actualmente a nivel nacional e internacional *Dactylopius opuntiae* Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae) se ha convertido en el principal enemigo fitosanitario del nopal (*Opuntia* spp.). Para su control existen pocas opciones, pero se ha privilegiado el empleo de agroquímicos, con los efectos colaterales que su uso implica. Considerando que la utilización de hongos entomopatógenos representan una alternativa viable en el manejo integrado de este fitófago, en esta investigación se evaluó la patogenicidad y virulencia de tres especies y dos aislamientos: *Beauveria bassiana* (GHA, Bb1), *Metarhizium anisopliae* (Ma129, Ma130) y *Lecanicillium lecanii* (974, 2009) sobre la mortalidad de ninfas de segundo instar de *D. opuntiae*. Los resultados mostraron que todos los aislamientos evaluados presentan diferente grado de patogenicidad; sin embargo, *M. anisopliae* y *L. lecanii* resultaron más efectivos. El aislamiento Ma 130, perteneciente a *M. anisopliae* presentó la mayor virulencia determinada en función de la CL₅₀ con un valor de 6.63×10^7 conidios mL⁻¹, bajo condiciones controladas. Por lo anterior, este aislamiento podría ser considerado en una estrategia de control de *D. opuntiae*.

Palabras clave: control biológico, nopal, plaga.

Recibido: noviembre de 2018

Aceptado: enero de 2019

Introducción

La cochinilla *Dactylopius opuntiae* Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae) es considerada como el principal problema fitosanitario del nopal (*Opuntia* spp.) en México y otras partes del mundo, debido entre otros aspectos a: la presencia de una secreción cerosa, que proporciona a las hembras camuflaje, resistencia a factores climáticos adversos, protección ante enemigos naturales y reduce la efectividad de la acción de los insecticidas; las altas tasas de reproducción y ciclos de vida cortos y a la presencia de ácido carmínico, el cual tiene propiedades antialimentarias y deterrentes.

D. opuntiae es una de las 11 especies de perteneciente a la familia Dactylopiidae (Spodek *et al.*, 2014), la cual se encuentra distribuida en 18 países alrededor del mundo (García *et al.*, 2016). Se le ha registrado causando graves daños en la comunidad Valenciana, España (Rodrigo *et al.*, 2010) y recientemente se ha detectado su presencia por primera vez en Israel (Spodek *et al.*, 2014) y en Marruecos (Bouharroud *et al.*, 2016). Asimismo, por la incidencia y severidad de los daños, durante la última década se ha convertido en la plaga más importante en las plantaciones de nopal para forraje en el noreste de Brasil (Da Silva *et al.*, 2010; Falcao *et al.*, 2013). En México está presente en todas las zonas nopaleras, ubicándose en 22 estados del país (Chávez-Moreno *et al.*, 2011) lo cual da una idea de su amplia distribución y facilidad de dispersión.

Tradicionalmente, su control se ha sustentado en la utilización de plaguicidas, entre los que destacan, malatión, paratión metílico y triclofon (Badii y Flores, 2001), ello a pesar de que actualmente no existen insecticidas autorizados en México para emplearse en este insecto (Vanegas-Rico *et al.*, 2010). Derivado de lo anterior, la aplicación de productos no autorizados o en las dosis no recomendadas pueden ocasionar riesgos a los consumidores, productores y daños al ambiente, tal y como se destaca en el reporte realizado por el Departamento de Salud Pública del estado de California (CDPH), por sus siglas en inglés, donde se advierte sobre el peligro del consumo de nopal proveniente de México ante la presencia de monocrotofos (5.8 ppm) un plaguicida organofosforado prohibido desde 1989. <http://www.cdph.ca.gov/Pages/NR14-021.aspx>.

Ante esta problemática, en México se han probado y desarrollado diversas estrategias para combatir a *D. opuntiae*; a través, de métodos alternativos. Por ejemplo, Mena y Rosas (2007) recomiendan el cepillado o barrido mecánico de los cladodios. También, se han evaluado productos biodegradables (Palacios-Mendoza *et al.*, 2004), extractos vegetales (Vigueras *et al.*, 2009), aceites esenciales (Vázquez-García *et al.*, 2011) y aspersion de silicio orgánico e inorgánico mezclados con jabones biodegradables (Mena, 2013), entre otros; sin embargo, en todos estos métodos el éxito dependerá del estadio de desarrollo en que se encuentra el insecto.

Otra alternativa promisorio de manejo ha sido el empleo de enemigos naturales, como agentes de control biológico (Vanegas-Rico *et al.*, 2010). Algunos de ellos han sido evaluados contra *D. opuntiae* tales como: *Sympherobius barberi* (Pacheco-Rueda *et al.*, 2011), *Chilocorus cacti*, (Flores *et al.*, 2013) e *Hyperaspis trifurcata* (Ramírez *et al.*, 2013), entre otros. No obstante, muchos de estos estudios se han restringido a la fase de laboratorio, por lo que aún no se ha transferido a productores y valorado en condiciones de campo. Otro aspecto poco estudiado en el país, es la selección de cultivares resistentes a *D. opuntiae*, pero en Brasil ya se cuentan con programas de selección y mejoramiento con este fin (Da Silva *et al.*, 2010).

El empleo de biopesticidas, incluyendo aquellos formulados a base de hongos entomopatógenos, están tomando importancia como una alternativa al empleo de insecticidas. En este aspecto Brasil, ha destacado al realizar estudios con *B. bassiana* para el control de *D. opuntiae* (Santos *et al.*, 2011) y *Fusarium incarnatum-equiseti* (Da Silva *et al.*, 2016) pero no existen, de acuerdo a nuestro conocimiento, estudios en México donde se aborde el empleo de diferentes cepas de hongos para su control. Por lo anterior, se pretende evaluar la patogenicidad y virulencia de tres especies de hongos entomopatógenos (*Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium lecanii*) sobre la mortalidad de ninfas de segundo instar de la cochinilla *D. opuntiae*.

Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de patología de insectos del Colegio de Postgraduados *Campus* Montecillo, durante el periodo comprendido de agosto 2015 a abril de 2016.

Obtención de colonias de *D. opuntiae*

El pie de cría inicial se obtuvo por medio de la recolección de cladodios infestados con *D. opuntiae*, durante el mes de julio de 2015 de una plantación comercial para la producción de tuna, ubicada en la comunidad de Cuautlacingo, Otumba, Estado de México. Los cladodios conteniendo las colonias de *D. opuntiae* se cortaron cuidadosamente, se revisaron para evitar la presencia de cualquier enemigo natural y posteriormente, se trasladaron y confinaron en una unidad de cría del Colegio de Postgraduados *Campus* Montecillo, de acuerdo al sistema propuesto por Aldama y Llanderal (2003).

Infestación de cladodios

Para obtener cohortes de *D. opuntiae*, una vez que las hembras adultas iniciaron la reproducción, éstas se recolectaron cuidadosamente y se introdujeron en ‘nidos de tul’, de acuerdo al método descrito por Aldama y Llanderal (2003). Posteriormente, cladodios de nopal *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. conteniendo los nidos se introdujeron en recipientes de plástico transparente: 25 x 15 x 5 cm largo, ancho y altura, respectivamente y se introdujeron en una cámara bioclimática (Thermo Scientific) a una temperatura de 25 ± 1 °C y un fotoperiodo de 24 h oscuridad, durante un periodo de 72 h, a fin de asegurar el establecimiento y fijación de la ninfa migrante. Una vez obtenidas ninfas sésiles se realizaron cortes de cladodios de 5 x 5 cm, en los que se contabilizaron 30 ninfas. Cada unidad se colocó en contenedores desechables transparentes cilíndricos de 6 x 4 cm. Se establecieron 13 unidades experimentales por cada repetición.

Cultivo de aislamientos empleados

Para llevar a cabo el estudio se emplearon los siguientes aislamientos: *Beauveria bassiana* (GHA, Bb1), *Metarhizium anisopliae* (Ma129, Ma130) y *Lecanicillium lecanii* (974, 2009), todos ellos monospóricos, provenientes de la colección de hongos entomopatógenos del Laboratorio de Patología de Insectos del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados (Cuadro 1). La producción de conidios se realizó mediante el cultivo en superficie de medio sólido (Butt y Goettel, 2000) empleando agar dextrosa sabouraud (BD Bioxon, México) en la siguiente proporción:

dextrosa 40 g, peptona de carne 5 g, peptona de caseína 5 g y agar 15 g. Este se esterilizó previamente mediante autoclave y se transfirió a cajas Petri de poliestireno estériles de 90 x 15 mm. Para la obtención de conidios las cajas se incubaron por tres semanas a una temperatura de 25 ± 1 °C y un fotoperiodo de 24 h oscuridad. La extracción de conidios se realizó por medio de raspado de la superficie y posteriormente suspendidos en solución Tween 80 al 0.03%. La cuantificación de conidios se realizó en una cámara de Neubauer, de acuerdo al método propuesto por Goettel y Douglas (1997).

Cuadro 1. Referencia de los hongos utilizados en la evaluación de patogenicidad contra *D. opuntiae*.

Especie	Clave	Insecto hospedante	Localidad
<i>B. bassiana</i>	Bb1	Hymenoptera	Jalisco, México
<i>B. bassiana</i>	GHA	Mycotrol®	USA
<i>M. anisopliae</i>	Ma129	<i>Tetranychus urticae</i>	Tecomán, Colima, México
<i>M. anisopliae</i>	Ma130	<i>T. urticae</i>	Tecomán, Colima, México
<i>L. lecanii</i>	*ARSEF 2009	<i>Toxoptera citricida</i>	Tucumán, Argentina
<i>L. lecanii</i>	*ARSEF 974	Afidos	Venezuela

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

Evaluación de patogenicidad

Para evaluar la patogenicidad de las diferentes cepas sobre la mortalidad de *D. opuntiae*, los cortes de nopal conteniendo ninfas de segundo instar, se colocaron en vasos desechables transparentes y se asperjaron con suspensiones de conidios de los seis aislamientos. Se aplicó una sola dosis de 1×10^8 conidios mL⁻¹ suspendidos en solución Tween 80 al 0.03%, más un control donde se aplicó solución Tween 80 al 0.03%. Las atomizaciones se realizaron en una torre de aspersión con las siguientes características: cilindro de acrílico de 30 cm de diámetro y una altura de 50 cm, el cual tuvo una inclinación de 45° a los 30 cm de altura. Todos los tratamientos se sometieron a una presión de 10 psi. Luego de la aspersión, las unidades experimentales tratadas se introdujeron en recipientes de plástico transparente y se mantuvieron a una temperatura de 26 ± 1 °C, 60% de humedad relativa y un fotoperiodo 12:12 (luz: oscuridad). La mortalidad de las ninfas se evaluó durante un periodo de 192 h con intervalos de 24 h, después de realizada la aspersión. Cada 24 h se realizó la extracción y cuantificación de insectos muertos y cada uno de ellos se colocó en una cámara húmeda para acelerar la esporulación del hongo y así poder confirmar la infección del insecto (Butt y Goettel, 2000).

Evaluación de virulencia

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de patogenicidad, se seleccionaron los tres aislamientos que generaron mayor mortalidad (Ma130, Ma129 y 974) para evaluar su virulencia sobre *D. opuntiae*. Para ello, cortes de nopal conteniendo ninfas de segundo instar se colocaron en vasos desechables transparentes y se asperjaron cuatro dosis de conidios de los tres aislamientos (10^6 , 10^7 , 10^8 y 10^9 conidios mL⁻¹) suspendidos en solución Tween 80 al 0.05%, más un control donde se aplicó solución Tween 80 al 0.05%. Para realizar las atomizaciones se siguió el mismo procedimiento que en el apartado anterior. Luego de la aspersión, las unidades experimentales

tratadas se colocaron en recipientes de plástico transparente, los cuales se introdujeron, a su vez, en una cámara de cría con las siguientes condiciones: humedad relativa (60%), fotoperiodo (12:12) y una temperatura de 26 ± 1 °C. La mortalidad de las ninfas sometidas a los tres tratamientos se evaluó por 192 h, a intervalos de 24 h después de la aspersión. Diariamente, se realizó la extracción y cuantificación de insectos muertos y se siguieron las indicaciones de Butt y Goettel (2000). El porcentaje de mortalidad se calculó de acuerdo a la fórmula de Abbott (1925).

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

Análisis estadístico

Respecto a patogenicidad se empleó un diseño completamente al azar, con seis tratamientos (aislamientos) más un control, tres replicas en el tiempo y dos pseudo-réplicas cada uno. En cada uno de los tratamientos se tuvieron dos repeticiones, teniendo así 12 unidades, más un control. Los porcentajes de mortalidad de ninfas se transformaron por medio de arcosen ($\sqrt{x/100}$) previo al análisis de varianza (Castillo, 2007). En la determinación de la virulencia se empleó un diseño experimental completamente al azar, con 12 tratamientos más un control y se repitió cuatro veces en el tiempo. Asimismo, se realizó un análisis Probit para estimar la CL_{50} y CL_{95} de cada aislamiento con 95% de límite de confianza. También se realizaron análisis de varianza y una comparación múltiple de medias tanto de los aislamientos, como de sus concentraciones con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) mediante el programa Statistical Analysis System (SAS Institute, 2012).

Resultados y discusión

Determinación de la patogenicidad

Los resultados del estudio demostraron que *M. anisopliae* presentó la mortalidad más alta de ninfas con 41.3%; posteriormente, le siguió *L. lecanii* la cual de manera global provocó una mortalidad de 34.4%. Por el contrario, la especie que obtuvo la mortalidad más baja resultó *B. bassiana* con solamente 19.7% (Figura 1). Cuando se evaluó la efectividad por aislamiento de manera individual, el tratamiento que obtuvo la mortalidad más alta resultó *M. anisopliae* con el aislamiento Ma130, el cual registró una mortalidad de 51.1%, seguido por el aislamiento 974 de *L. lecanii* con 38.8% de mortalidad. Los tratamientos Ma129 y 2009 pertenecientes a las especies *M. anisopliae* y *L. lecanii*, resultaron estadísticamente similares con 31.5 y 29.9%, respectivamente. Por otro lado, los aislamientos que presentaron menor efectividad correspondieron a *B. bassiana*, donde el aislamiento GHA obtuvo 22.6% y la menor efectividad la registró el aislamiento Bb1 con sólo 16.5% de mortalidad (Cuadro 2). El experimento registró una mortalidad menor al 10% en el testigo, lo cual lo hace aceptable y manifiesta que el protocolo de inoculación de los hongos entomopatógenos resultó efectivo respecto a la inocuidad.

El análisis de los resultados de las seis cepas (GHA, Bb1, Ma129, Ma130, 974 y 2009) aplicadas a una sola concentración (1×10^8 conidios mL^{-1}) mostró que todos los aislamientos presentan patogenicidad contra *D. opuntiae*. Los hongos que mayor efectividad presentaron son *M. anisopliae* y *L. lecanii*, en los seis aislamientos probados en el bioensayo. Los datos muestran que

existen diferencias estadísticas, incluso en aislamientos pertenecientes a la misma especie, esta diferenciación puede estar asociada a las características de virulencia propias de cada aislamiento, así como a la influencia que ejerce el tipo de hospedante del cual provino su aislamiento.

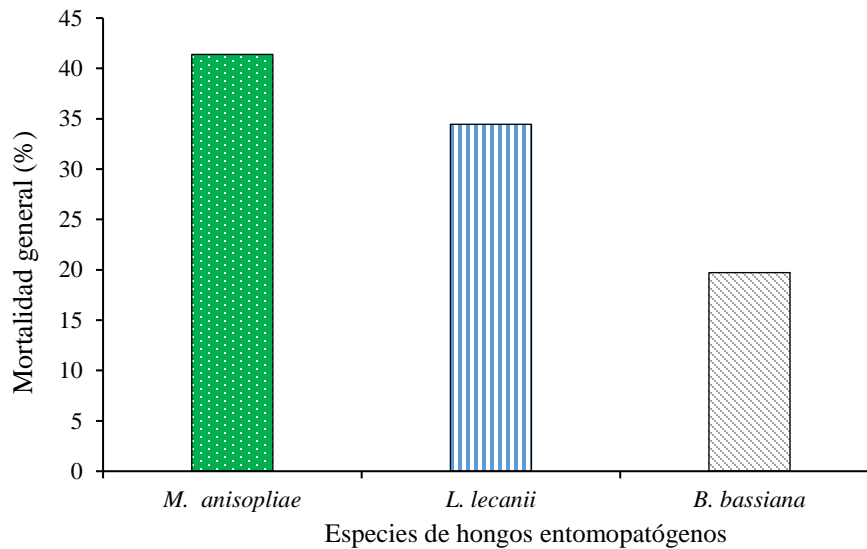


Figura 1. Mortalidad general por especie de hongos entomopatógenos sobre ninfas de segundo instar de *D. opuntiae*.

Cuadro 2. Mortalidad (%) de ninfas de segundo instar de *Dactylopius opuntiae* tratadas con seis aislamientos de hongos entomopatógenos.

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

* = distintas letras indican diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). EE= error estándar.

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

Realmente, pocos patógenos se han aislado de manera natural para emplearse en el control escamas y probablemente los hongos de mayor importancia contra estos insectos sean los pertenecientes al género *Lecanicillium* (Liu *et al.*, 2009). En el caso del hongo *L. lecanii* se han realizado investigaciones de patogenicidad sobre insectos pertenecientes a la familia Matsucoccidae obteniendo mortalidades 61.3% en ninfas de segundo instar a una concentración de 1×10^7 conidios

mL⁻¹ (Liu *et al.*, 2014). En el presente estudio las mortalidades obtenidas con este hongo causaron valores intermedios de mortalidad entre 29.9 y 38.8% para los aislamientos 2009 y 974, respectivamente.

En bioensayos realizados sobre escamas *Phoenicococcus marlatti*, se observó que el hongo *B. bassiana* no logró parasitar el insecto (Asensio *et al.*, 2005). A pesar de que en este estudio los valores de mortalidad registrados resultaron los más bajos Bb1 (16.5%) y GHA (22.9%, Santos *et al.* (2011) al evaluar el efecto del hongo *B. bassiana* mezclado con agentes protectores sobre ninfas de primer instar de *D. opuntiae*, detectaron que al incluir un protector solar (Oxybenzone[®]) en la formulación del hongo, se alcanzaron valores de mortalidad de 46.5%. Dicho valor es más alto que los registrados en el presente estudio, donde *B. bassiana* (GHA) obtuvo una mortalidad máxima de 22.6%.

Esta diferencia puede estar asociada al hecho de que el protector solar puede acentuar su efecto en la mortalidad, al ser combinado con el hongo. Vale la pena considerar que de manera natural *D. opuntiae* presenta una alta tasa de mortalidad natural en ninfas de primer instar ya que aún no desarrollan su cubierta protectora, debido a ello, los valores superiores de mortalidad obtenida por Santos *et al.* (2011) pueden estar relacionados a que se realizaron los bioensayos con ninfas de primer instar, mientras que en esta investigación se aplicaron en ninfas de mayor edad, las cuales presentan una mayor cantidad de filamentos cerosos, que podrían interferir en el contacto del hongo con el cuerpo del insecto. Al respecto, Viguera *et al.* (2009) resaltan que al degradar la cubierta cerosa la mortalidad puede llegar hasta 35% en ninfas de primer instar.

Una de las grandes ventajas que conlleva emplear entomopatógenos es que se pueden combinar con algunos extractos vegetales en las estrategias de manejo del insecto. Da Silva *et al.* (2016) observaron que cuando se aplican *Fusarium incartanum-equiseti* y extractos acuosos de *Ricinus communis* pueden llegar a causar hasta 100% de mortalidad en *D. opuntiae*, aunque también los bioensayos se aplicaron a ninfas y no adultos. En estudios realizados con otras escamas, Jin-Hua *et al.* (2014) aislaron, identificaron y evaluaron la patogenicidad del hongo *Fusarium incarnatum-equiseti* que infecta de forma natural a la escama blanda *Coccus hesperidum* registrando el primer reporte del género *Fusarium* sobre este insecto, esto infiere que este hongo podría presentar patogenicidad sobre otros insectos escama, aunque esta especie no se evaluó en este estudio.

Este potencial se comprobó recientemente con excelentes resultados en estudios de laboratorio, en combinación con extractos vegetales, para el control de *D. opuntiae* en Brasil (Da Silva *et al.*, 2016). Al probar *M. anisopliae* y *B. bassiana*, se observó que este último registró los mejores resultados sobre ninfas de *D. opuntiae*, resaltando además que la combinación de ambas especies podría mejorar su respuesta. Esta tendencia no se pudo confirmar en esta investigación. Una dosis similar a la empleada en este estudio, también se utilizó con *B. bassiana* para el control de *Matamasius spinoleae*, otra plaga importante de *Opuntia* en México, obteniendo valores de mortalidad de 85% (Tafoya *et al.*, 2004).

Determinación de la virulencia

Para determinar la virulencia de ninfas de segundo instar de *D. opuntiae* en condiciones de laboratorio, se evaluaron tres aislamientos de hongos entomopatógenos de dos especies (*M. anisopliae* y *L. lecanii*) las cuales registraron los valores más altos en patogenicidad. La virulencia

de cada aislamiento se determinó estimando la CL_{50} y CL_{95} , expresada en conidios mL^{-1} , con base en la mortalidad obtenida al octavo día después de la inoculación de los hongos. Los aislamientos probados ocasionaron mortalidad en *D. opuntiae*, siendo ésta dependiente de la concentración (Figura 2). Se encontró que el aislamiento Ma130 (*M. anisopliae*) presentó la mayor efectividad, seguido del aislamiento 974 (*L. lecanii*) y finalmente el aislamiento Ma129, con la menor efectividad de los tres aislamientos. Asimismo, se observó una relación positiva entre la concentración de los aislamientos aplicados y la mortalidad, de tal manera que a medida que la concentración aumenta se registra un incremento en la mortalidad.

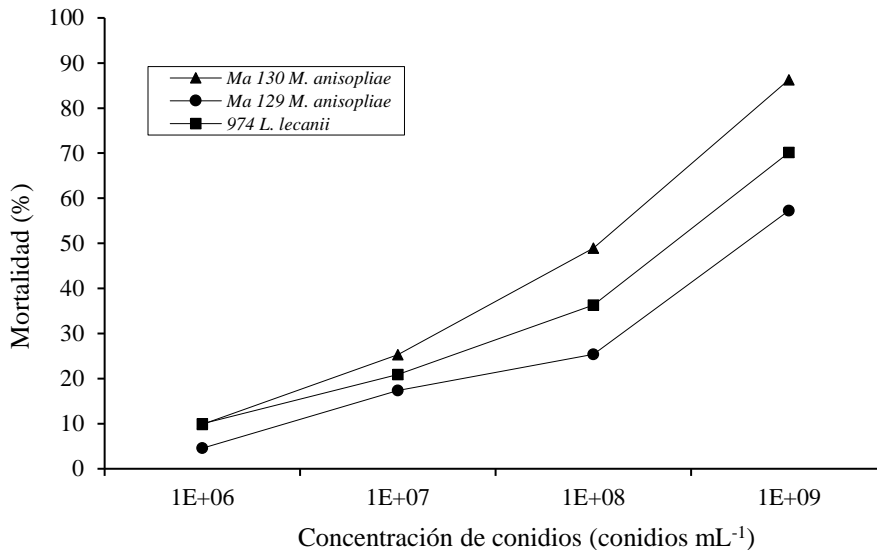


Figura 2. Mortalidad corregida (%) de *D. opuntiae* a diferentes niveles de concentración de conidios en tres aislamientos evaluados.

En el Cuadro 3 se presenta el promedio de la mortalidad registrada y la mortalidad corregida conforme la fórmula de Abbott (1925), donde se destaca que el aislamiento Ma130 de la especie *M. anisopliae* demostró una mayor efectividad en las cuatro concentraciones probadas, los valores promedio de mortalidad oscilaron entre 17.5% (1×10^6 conidios mL^{-1}) y 87.5% (1×10^9 conidios mL^{-1}). Las tres concentraciones más elevadas presentaron diferencias significativas, entre ellas; sin embargo, la concentración más baja (1×10^6 conidios mL^{-1}) presentó una mortalidad promedio de 17.5% la cual resultó no diferente estadísticamente, respecto al control (8.3%).

L. lecanii 974 registró la mejor efectividad, después del aislamiento Ma 30, ya que obtuvo valores de 72.5% a una concentración de 1×10^9 conidios mL^{-1} . Por el contrario, la mortalidad más baja se observó en el tratamiento con la concentración de 1×10^6 conidios mL^{-1} , donde se registró solamente 17.5%, la cual no difiere estadísticamente del control. Respecto al aislamiento Ma129 de *M. anisopliae*, éste presentó el valor más bajo de mortalidad, respecto a los otros dos aislamientos evaluados. El promedio de mortalidad más alto (60.83%) se obtuvo con la concentración más elevada (1×10^9 conidios mL^{-1}) en contraste, el valor promedio de mortalidad más bajo que este aislamiento presentó (12.5%) se observó con la concentración de 1×10^6 conidios mL^{-1} (Figura 3).

Cuadro 3. Mortalidad observada (% \pm EE*) y corregida empleando la fórmula de Abbott.

Aislamientos concentraciones	Mortalidad observada (%)	Mortalidad corregida (%)
Ma 130- 10 ⁹	87.5 \pm 4.59 ^a	86.36
Ma 130- 10 ⁸	53.33 \pm 4.91 ^b	49.09
Ma 130- 10 ⁷	31.67 \pm 3.47 ^c	25.46
Ma 130- 10 ⁶	17.5 \pm 3.7 ^{cd}	10
Ma 129- 10 ⁹	60.83 \pm 4.98 ^a	57.27
Ma 129- 10 ⁸	31.67 \pm 3.47 ^b	25.46
Ma 129- 10 ⁷	24.17 \pm 4.38 ^{bc}	17.28
Ma 129- 10 ⁶	12.5 \pm 3.94 ^c	4.55
974- 10 ⁹	72.5 \pm 4.98 ^a	70
974- 10 ⁸	41.67 \pm 2.15 ^b	36.37
974- 10 ⁷	27.5 \pm 2.85 ^c	20.91
974- 10 ⁶	17.5 \pm 2.85 ^{cd}	10
Control	8.33 \pm 0.96	-

*= Distintas letras, entre concentraciones de aislamientos indican diferencias de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). EE= error estándar.

En el Cuadro 4 se presentan los valores de CL₅₀ y CL₉₅ (incluyendo los límites de confianza) y las ecuaciones de regresión obtenidas a partir del análisis Probit. La concentración letal media (CL₅₀) estimada para el aislamiento Ma130 (*M. anisopliae*) resultó en 6.63×10^7 conidios mL⁻¹, en el caso del aislamiento Ma129 la CL₅₀ obtuvo un valor de 6.56×10^8 conidios mL⁻¹ y para el aislamiento 974 de la especie *L. lecanii* el valor estimado de la CL₅₀ obtenido fue 2.07×10^8 conidios mL⁻¹. Con base a esta información, es posible considerar que el aislamiento más efectivo es Ma 130, el cual muestra un menor requerimiento en la concentración para matar a 50% de la población en estudio en un periodo de tiempo determinado. En orden decreciente de efectividad le siguió la especie *L. Lecanii* (974) y finalmente el tratamiento con menor efectividad resultó ser el aislamiento Ma129.

Cuadro 4. CL₅₀ y CL₉₅ de tres aislamientos de hongos entomopatógenos sobre ninfas de segundo instar de *D. opuntiae*.

Aislamiento	CL ₅₀ (95% LC)	CL ₉₅ (95% LC)	Ecuación de regresión Probit
Ma 130	6.63×10^7 (4.83×10^7 - 1.03×10^8)	8.45×10^9 (3.47×10^9 - 2.92×10^{10})	Y= -6.1119+0.7814 X
Ma 129	6.56×10^8 (3.36×10^8 - 1.67×10^9)	4.01×10^{11} (7.04×10^{10} - 6.6×10^{12})	Y= -5.2041+ 0.5902 X
974	2.07×10^8 (1.19×10^8 - 4.12×10^8)	1.1×10^{11} (2.59×10^{10} - 1.01×10^{12})	Y= -5.0167 + 0.6032 X

Por su parte, Pereira *et al.* (2011) observaron que la DL₅₀ de *M. anisopliae* var. *anisopliae* registró un valor de 7.3×10^6 conidios mL⁻¹ contra ninfas de segundo instar de *D. opuntiae*. Lo anterior, puede estar relacionado características de virulencia del aislamiento, tales como la producción de enzimas (proteasas, quitinasas y lipasas) las cuales facilitan la penetración de la cutícula del insecto y permiten llegar hasta el interior de éste (hemocele) (Schrank y Vainstein, 2010). A pesar de que el empleo de *M. anisopliae* contra insectos escama ha sido poco empleado, debido a que este hongo

se encuentra asociado naturalmente a miembros de otros ordenes tales como: coleópteros, isópteros u ortópteros (Shahid *et al.*, 2012), se ha demostrado la efectividad de este hongo contra piojos harinosos (*Pseudococcus viburni*).

La concentración de conidios tuvo una respuesta lineal positiva con la mortalidad, dado que a mayor concentración la mortalidad se incrementó. Esto puede estar relacionado a la cantidad de esporas viables que logran posicionarse sobre la cutícula del insecto y que posteriormente germinarán, de esta manera pueden tener mayor oportunidad de infectar al insecto por la cantidad de esporas presentes (Cuadro 5).

Cuadro 5. Estimación de conidios por cada tratamiento aplicado.

Tratamiento	Promedio de conidios
Ma 130- 9	66.67
Ma 130- 8	25
Ma 130- 7	11.33
Ma 130- 6	3.67
Ma 129- 9	42.33
Ma 129- 8	19
Ma 129- 7	4
Ma 129- 6	1.33
974- 9	54
974- 8	44.33
974- 7	17.67
974- 6	11.67

Un aspecto importante de resaltar es que la mortalidad de las ninfas de *D. opuntiae* se inició a partir del primer día después de la aplicación de los hongos. Entre el tercer y sexto día se observó la tasa de mortalidad más alta en los tres aislamientos y presenta la tendencia a estabilizarse a partir del octavo día. El aislamiento Ma130 presentó una mayor efectividad de la mortalidad acumulada respecto al tiempo, al eliminar una mayor cantidad de ninfas en menor tiempo, en relación a los otros dos aislamientos evaluados (Figura 3).

Los tres aislamientos de hongos entomopatógenos evaluados, dos pertenecientes a la especie *M. anisopliae* y uno de la especie *L. lecanii*, a pesar de que muestran diferente grado de virulencia, tienen potencial de causar infección en ninfas de segundo instar de *D. opuntiae*. Los resultados del estudio mostraron que el aislamiento Ma130 de *M. anisopliae* presentó la mayor efectividad. Esta especie es el hongo entomopatógeno más empleado alrededor del mundo, dada su disponibilidad natural en el suelo y también por el alto número de especies de insectos hospedantes (Senthil-Nathan, 2015). En la investigación este aislamiento presentó una efectividad mayor en porcentaje de mortalidad, así como también la CL_{50} más baja (6.63×10^7 conidios mL^{-1}), en comparación con los otros dos aislamientos evaluados.

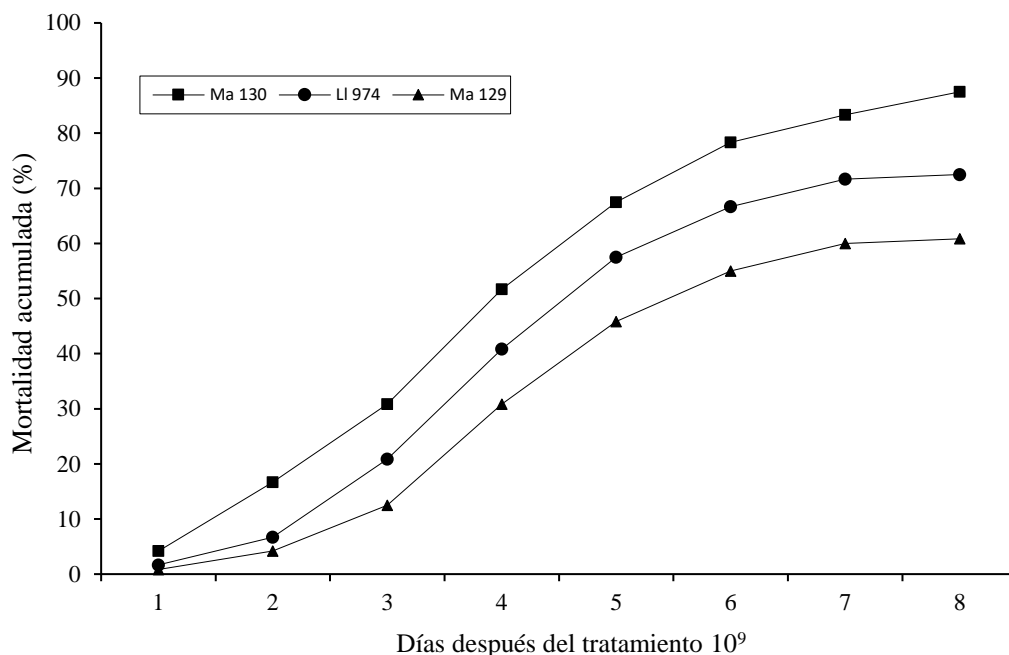


Figura 3. Mortalidad acumulada (%) de tres aislamientos de hongos entomopatógenos en ninfas de segundo instar de *D. opuntiae*, en condiciones de laboratorio.

En este estudio también se evaluó el aislamiento Ma129 perteneciente a la especie *M. anisopliae*, el cual mostró una efectividad inferior respecto a los otros dos aislamientos. Los dos aislamientos de *M. anisopliae* evaluados en esta investigación registraron su mortalidad máxima después del sexto día después de la aspersión. Una tendencia similar, observaron Oreste *et al.* (2016) al estudiar el efecto de un aislamiento de *M. anisopliae* sobre mosca blanca, registrando valores de mortalidad de 94.1%, al séptimo día después de la aplicación de los hongos.

Respecto al aislamiento 974 perteneciente a la especie *L. lecanii* presentó una efectividad interesante en la evaluación de virulencia, respecto a los otros dos aislamientos evaluados, ya que obtuvo un valor de la CL_{50} de 2.07×10^8 conidios mL^{-1} . Esta especie tiene también un alto número de insectos hospedantes; sin embargo, es patógeno principal de hemípteros como escamas, áfidos y mosca blanca (Sujeetha y Sahayaraj, 2014). Por ejemplo, Telli *et al.* (2014) evaluaron la mortalidad de la escama *Coccus hesperidum* L. mediante la inoculación del hongo *L. lecanii* en condiciones de laboratorio y obtuvieron un promedio de mortalidad 47.5% a una concentración de 1×10^7 conidios mL^{-1} . Los autores concluyen que este hongo tiene potencial de ser empleado en planes de manejo integrado de insectos fitófagos pertenecientes al orden Hemiptera.

Por su parte, Liu *et al.* (2014) analizaron la virulencia de dos aislamientos del hongo *L. lecanii* contra ninfas de segundo instar de la escama *Matsucoccus matsumurae* y obtuvieron valores de mortalidad que oscilaron entre 53.6 y 61.3% para los aislamientos V34504 y V34505, respectivamente, además, encontraron que los valores más altos de mortalidad se presentaron después del sexto día de inoculación, lo cual coincide con la observado en esta investigación. Asimismo, Xie *et al.* (2010) concluyeron que este hongo invade a los insectos escama y encontraron que los conidios dañan la cutícula y penetran el integumento por medio de una combinación de fuerzas mecánicas y enzimas degradadoras.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación se destaca que el control de *D. opuntiae* mediante hongos entomopatógenos puede resultar una alternativa viable, tomando como referencia la mortalidad obtenida en condiciones de laboratorio. No obstante, es necesario considerar que la efectividad de los entomopatógenos en condiciones de campo es inferior a lo localizado en condiciones de laboratorio; sin embargo, su efectividad en campo puede incrementarse mediante el empleo de buenas prácticas de manejo en cada una de las etapas del cultivo de los hongos, entre las que se pueden considerar asegurar la calidad del producto que se va aplicar, empleo de dosis correctas, métodos y tiempo de aplicación, y monitoreo, entre otros factores.

Conclusiones

Los seis aislamientos evaluados, presentaron un comportamiento diferencial aun siendo de la misma especie, respecto a patogenicidad contra *D. opuntiae*, a una concentración de 1×10^8 conidios mL⁻¹. *M. anisopliae* (Ma130) registró el mayor grado de mortalidad en condiciones de laboratorio.

Consistentemente, el aislamiento Ma130, resultó con la mayor virulencia contra ninfas de segundo instar de *D. opuntiae*. El valor de la CL₅₀ obtenida es de 6.63×10^7 conidios mL⁻¹. La tasa de mortalidad más alta de ninfas de segundo instar *D. opuntiae* se presentó entre los 3 y 6 días después de realizada la aplicación.

El aislamiento Ma130, perteneciente a la especie *M. anisopliae*, podría incluirse en la estrategia de manejo integrado de *D. opuntiae* como alternativa al empleo de agroquímicos.

Literatura citada

- Aldama, C. y Llanderal, C. 2003. Grana cochinita: comparación de métodos de producción en penca cortada. *Agrociencia*. 37(1):11-19.
- Asensio, L.; Lopez, L. L. and López, J. J. 2005. Use of light, scanning electron microscopy and bioassays to evaluate parasitism by entomopathogenic fungi of the red scale insect of palms (*Pheenicococcus marlatti* CKLL., 1899). *Micron*. 36(2):169-175.
- Badii, M. H. and Flores, A. E. 2001. Prickly pear cacti pests and their control in México. *Florida Entomologist*. 84(4):503-505.
- Bouharroud, R.; Amarrague, A. and Qessaoui, R. 2016. First report of the Opuntia cochineal scale *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) in Morocco. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 46(2):308-310.
- Butt, T. M. and Goettel, M. S. 2000. Bioassays of entomogenous fungi. *In*: Navon, A. and Ascher, K. R. (Eds.). *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. Bet Dagan, Israel. CABI Publishing. 141-195 pp.
- Castillo, M. L. E. 2007. *Introducción al SAS para Windows*. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Chapingo, Estado de México. 295 p.
- Chávez, M. C. K.; Tecante, A.; Casas, A. and Claps, L. E. 2011. Distribution and habitat in Mexico of *Dactylopius* Costa (Hemiptera; Dactylopiidae) and their cacti hosts (Cactaceae: Opuntioideae). *Neotrop. Entomol.* 40(1):62-71.

- Da Silva, M. G. S.; Dubeux, Jr. J. C. B.; Cortes, A. L. C.; Mota, D. L.; Da Silva, L. L. S.; dos Santos, M. V. F. and dos Santos, D. C. 2010. Anatomy of different forage cacti with contrasting insect resistance. *J. Arid Environ.* 74(6):718-722.
- Da Silva, S. A. C.; Soares, O. R. L.; Da Costa, A. F.; Vieira, T. P. and de Oliveira, N. T. 2016. Controlling *Dactylopius opuntiae* with *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex and extracts of *Ricinus communis* and *Poincianella pyramidalis*. *J. Pest Sci.* 89(2):539-547.
- Falcao, H. M.; Oliveira, M. T.; Mergulhao, A. C.; Silva, M. V. and Santos, M. G. 2013. Ecophysiological performance of three *Opuntia ficus-indica* cultivars exposed to carmine cochineal under field conditions. *Sci. Hortic.* 150:149-424.
- Flores, A.; Olvera, H.; Rodríguez, S. and Barranco, J. 2013. Predation potential of *Chilocorus cacti* (Coleoptera: Coccinellidae) to the prickly pear cacti pest *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae). *Neotrop Entomol.* 42(4):407-411.
- García, M.; Denno, B.; Miller, D.; Miller, G.; Ben, D. Y. and Hardy, N. 2016. A literature-based model of scale insect biology and systematics. Retrieved March 2016, from Scalenet. <http://scalenet.info>.
- Goettel, M. S. and Douglas, G. 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey, L. A. (Ed.). Manual of techniques in insect pathology. Wapato, USA. Academic Press. 213-249 pp. <http://www.cdph.ca.gov/Pages/NR14-021.aspx>.
- Humber, R. A. 1997. Fungi: identification. In: Lacey, L. A. (Ed.). Manual of techniques in insect pathology, Academic Press, San Diego. 429 p.
- Jin, H. F.; Ying, P. X.; Jiao, L. X.; Xiong, Q.; Wei, J. J.; Yong, J. Z. and Zhu, M. R. 2014. The strain HEB01 of *Fusarium* sp., a new pathogen that infects brown soft scale. *Ann Microbiol.* 64(1):333-341.
- Liu, H. 2012. Microbial control of crop pests using entomopathogenic fungi. In: Abrol, D. P. and Shankar, U. (Eds.). Integrated pest management middletown. CAB International. 237-280 pp.
- Liu, W.; Xie, Y.; Dong, J.; Xue, J.; Zhang, Y.; Lu, Y. and Wu, J. 2014. Pathogenicity of three entomopathogenic fungi to *Matsucoccus matsumurae*. *PLOS ONE.* 9(7):1-9.
- Liu, W.; Xie, Y.; Xue, J.; Gao, Y.; Zhang, Y.; Zhang, X. and Tan, J. 2009. Histopathological changes of *Ceroplastes japonicus* infected by *Lecanicillium lecanii*. *J. Invertebrate Pathol.* 101(2):96-105.
- Mena, C. J. 2013. Tecnologías de manejo integrado para los insectos plaga del nopal tunero en el Altiplano Mexicano. In: Gallegos, V. C.; Méndez, G. S. de J. and Mondragón, J. C. (Eds.). Producción sustentable de la tuna. Fundación Produce San Luis Potosí. 127-161 pp.
- Mena, C. J. y Rosas, S. 2007. Guía para el manejo integrado de las plagas del nopal tunero. INIFAP, Campo Experimental Zacatecas. Calera de Víctor Rosales, Zacatecas, México. 16-18 pp.
- Mugisho, B. D.; Knapp, M.; Ekesi, S.; Chabi, O. A.; Iddi, H. and Kalemba, N. 2015. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* in controlling the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* on common bean in screenhouse and field experiments. *Insect Sci.* 22(1):121-128.
- Oreste, M.; Bibici, G.; Polisenio, M. and Tarasco, E. 2016. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the *Trialeurodes vaporariorum*-*Encarsia formosa* system. *J. Pest. Sci.* 89(1):153-160.
- Pacheco, R. I.; Lomelí, F. R. J.; Rodríguez, L. E. and Ramírez, D. M. 2011. Ciclo de vida y parámetros poblacionales de *Symphorobius barberi* Banks (Neuroptera: Hemerobiidae) criado con *Dactylopius opuntiae* Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae). *Acta Zoológica Mexicana.* 27(2):325-340.

- Palacios, M. C.; Nieto, H. R.; Llanderal, C. C. y González, H. H. 2004. Efectividad biológica de productos biodegradables para el control de la cochinilla silvestre *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Homoptera: Dactylopiidae). *Acta Zoológica Mexicana*. 20(3):99-106.
- Pereira, A.; Casals, P.; Salazar, A. M. and Gerding, M. 2011. Virulence and pre-letal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* on *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Chilean J. Agric. Res.* 71(4):554-558.
- Ramírez, A. S.; Santana, O. N. y Solís, A. J. F. 2013. Biología de *Hyperaspis trifurcata* Schaeffer (Coleoptera: Coccinellidae) en condiciones de laboratorio. *Dugesiana*. 20(2):99-103.
- Rodrigo, E.; Catalá, O. M. y Granero, M. 2010. Estudio comparativo de la morfología y biología de *Dactylopius coccus* Costa y *D. opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Dactylopiidae) dos especies presentes en la Comunidad Valenciana. *Bol. San. Veg. Plagas*. 36(1):23-35.
- Santos, P.; da Silva, M.; Monteiro, A. and Gava, C. 2011. Improving photoprotection of *Beauveria bassiana* conidial for biological control of the cactus pest *Dactylopius opuntiae* in the semiarid region northeast of Brazil. *Bio. Sci. Technol.* 21(8):893-902.
- SAS Institute Inc. 2012. SAS Sistem Versión 9.1. Cary, North Carolina, USA.
- Schrank, A. and Vainstein, M. H. 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*. 56(7):1267-1274.
- Senthil, N. S. 2015. A review of biopesticides and their mode of action against insect pest. Thangavel, P. and Sridevi, G. (Eds.). *Environmental Sustainability*. 49-63 pp.
- Shahid, A.; Rao, A.; Bakhsh, A. and Husnain, T. 2012. Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. *Arch. Biol. Sci.* 64(1):21-42.
- Spodek, M.; Ben, D. Y.; Protasov, A.; Carvalho, C. J. and Mendel, Z. 2014. First record of *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae) from Israel. *Phytoparasitica*. 42(3):377-379.
- Sujeetha, A. and Sahayaraj, K. 2014. Role of entomopathogenic fungus in pest management. In: Sahayaraj, K. (Ed.). *Basic and applied aspects of biopesticides*. India. 3:31-46.
- Tafoya, F.; Zúñiga, D. M.; Alatorre, R.; Cibrian, T. J. and Stanley, D. 2004. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) against the cactus weevil, *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae) under laboratory conditions. *Florida Entomologist*. 87(4):533-536.
- Telli S.; Dervis, S. and Yigit, A. 2014. Effect of entomopathogenic fungus, *Lecanicillium lecanii* (Sordariomycetes: Hypocreales) on some phytophagous Hemiptera species. *Türk. Entomol. Derg.* 38(3):351-362.
- Vanegas, R. J. M.; Lomeli, F. J. R.; Rodríguez, E.; Mora, G. and Valdez, J. M. 2010. Enemigos naturales de *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) en *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller en el centro de México. *Acta Zoológica Mexicana*. 26(2):415-433.
- Vázquez, G. M.; Garabito, E. S.; Tabares, V. J. and Castillo, H. G. 2011. Essential oils from aromatic plant species and insecticidal effects on *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Homoptera: Dactylopiidae) in mobile juveniles. *Acta Hortic.* 894:215-223.
- Vigueras, A. L.; Cibrián, T. J. and Pelayo, O. C. 2009. Use of botanical extracts to control wild cochineal (*Dactylopius opuntiae* Cockerell) on cactus pear. *Acta Hortic.* 811:229-234.
- Xie, Y. W.; Liu, J. Xue; G. Peng, Z. Han and Zhang, Y. 2010. Integument of soft scale insects and the invasion of the pathogenic fungus *Lecanicillium lecanii*. *Entomologia Hellenica* 19(2):66-75.