

CRECIMIENTO POBLACIONAL DE LA COCHINILLA *Dactylopius coccus* Costa CRIADA EN CINCO CULTIVARES DE NOPAL *Opuntia ficus-indica* Mill

GROWTH PARAMETERS OF COCHINEAL *Dactylopius coccus* Costa REARED IN FIVE CACTUS PEAR CULTIVARS *Opuntia ficus-indica* Mill

S. de Jesús Méndez-Gallegos^{1*}, L. Antonio Tarango-Arámbula¹, Aurelio Carnero², Riziero Tiberi³, Ovidio Díaz-Gómez⁴

¹Campus San Luis Potosí, Colegio de Postgraduados. 78600. San Luis Potosí. (jmendez@colpos.mx). ²Sezione di Entomologia, Dipartimento Biotecnologia Agraria, Università degli Studi di Firenze. Piazzale delle Cascine 18. Firenze, Italia. ³Departamento de Protección Vegetal. Instituto Canario de Investigaciones Agrarias. 38006, La Laguna, España. ⁴Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Km 14.5 Carretera San Luis Potosí-Matehuala. Ejido Palma de la Cruz, Soledad de Graciano Sánchez, 78321. San Luis Potosí. México.

RESUMEN

La cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) es considerada una de las principales fuentes de colorante natural en el mundo, por lo cual ha sido introducida a varios países para su explotación comercial. No obstante, se desconoce el comportamiento del insecto y la calidad del colorante obtenido en aquellos hospederos diferentes a los de su hábitat natural, donde se desarrolla. Para clarificar lo anterior, se evaluó la supervivencia y reproducción de *D. coccus* y su calidad (porcentaje de ácido carmínico) en cinco cultivares de nopal (Blanco Moscatel, Colorado Moscatel, Offer, Portolano y Sicilia Bianca) de diferente origen geográfico. El estudio se realizó en cámaras de cría a 24 ± 1 °C, 65 ± 5 % HR y fotoperiodo de 14:10 (L:O) y se utilizó la técnica demográfica de tablas de vida y fecundidad, para obtener los parámetros que caracterizan la dinámica poblacional de *D. coccus*. Los cultivares de nopal suministrados como substrato alimenticio causaron un efecto diferencial sobre la supervivencia, reproducción y calidad de ácido carmínico. Los valores más altos de la tasa intrínseca de incremento (r_m) fueron obtenidos en las cohortes desarrolladas en los cultivares Offer, Portolano y Sicilia Bianca con 0.025, 0.021 y 0.003 hembras d^{-1} . Las poblaciones de *D. coccus* desarrolladas en los cultivares Colorado Moscatel y Blanco Moscatel no originaron descendencia. No obstante, en este último cultivar se obtuvo el porcentaje más alto de ácido carmínico (19.1 %). El estudio permitió diferenciar cultivares que pueden ser usados como substrato para la generación de pie de cría o bien en la producción de ácido carmínico o con ambos propósitos.

ABSTRACT

Cochineal (*Dactylopius coccus* Costa) is considered one of the main sources of natural coloring worldwide; therefore, it has been introduced into several countries for commercial exploitation. Nevertheless, insect behavior and coloring quality obtained from hosts, other than those of the natural habitat where they develop, are not known. To clarify the aforesaid, survival and reproduction of *D. coccus* and their quality (percentage of carminic acid) in five cactus pear cultivars (Blanco Moscatel, Colorado Moscatel, Offer, Portolano, Sicilia Bianca) of different geographic origin, were assessed. The study was carried out in breeding chambers, at 24 ± 1 °C, 65 ± 5 % HR, and photoperiod 14:10 (Darkness:Light), using the demographic technique of life and fertility tables for obtaining the parameters that characterize *D. coccus* population dynamics. Cactus pear cultivars provided as nutritional substrate caused differential effect on survival, reproduction, and carminic acid. The highest values of intrinsic rate of increase (r_m) were achieved in the cohorts developed in the cultivars: Offer, Portolano, and Sicilia Bianca, with 0.025, 0.021, and 0.003 females d^{-1} . The *D. coccus* populations reared in cultivars Colorado Moscatel and Blanco Moscatel did not have progeny. However, in the latter cultivar, the highest percentage of carminic acid was obtained (19.1 %). In this study, it was possible to differentiate cultivars which could be used as substrate for generating breeding stock or for carminic acid production, or serving both purposes.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Enero, 2009. Aprobado: Noviembre, 2009.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 44: 225-234. 2010.

Key words: carminic acid, cochineal, reproduction, survival, life tables.

Palabras clave: ácido carmínico, cochinilla, reproducción, supervivencia, tablas de vida.

INTRODUCCIÓN

La grana o cochinilla del nopal (*Dactylopius coccus* Costa) pertenece al orden Hemiptera, familia Dactylopiidae, que contiene nueve especies nativas de Norte y Sudamérica (Rodríguez *et al.*, 2001). Los miembros de esta familia son importantes como fuente de colorante natural (Méndez *et al.*, 2004) y como agentes de control biológico del nopal, considerado como una maleza invasora en Australia y Sudáfrica (Pérez-Guerra, 1991).

Dactylopius coccus tiene gran importancia social y económica debido a que del cuerpo seco de la hembra se obtiene el ácido carmínico (AC) (Méndez-Gallegos *et al.*, 2003), que es una hidroxí antraquinona ligada a una unidad de glucosa, ampliamente usado como principio colorante en alimentos, bebidas, textiles y en la industria farmacéutica y cosmética (Baranyovits, 1978). El AC se considera inocuo (Sugimoto *et al.*, 1998), tiene propiedades antivirales (Krabill *et al.*, 1993), anticancerígenas (Tütem *et al.*, 1996) y antibióticas (Allevi *et al.*, 1998). La FDA, en los EE.UU. (US Government, Code of Federal Regulations 21) y el Consejo del Parlamento en la Unión Europea (EU, Community Directive 94/36/EC) han autorizado el uso del AC como colorante natural (González *et al.*, 2002). Considerando las políticas en materia de seguridad alimentaria y a las presiones de los consumidores por el uso de aditivos alimentarios inocuos en alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos, los subproductos obtenidos a partir de *D. coccus* podrán incrementar su consumo (Méndez-Gallegos *et al.*, 2003).

La grana se produce comercialmente en Bolivia, Chile, España, México y Perú (Gallegos-Vázquez y Méndez-Gallegos, 2000), siendo este último país el mayor productor y exportador. Debido a la creciente demanda de *D. coccus* como fuente de colorante natural se ha introducido a otros países (Campos-Figueroa y Llanderal-Cázares, 2003) que tienen condiciones agroecológicas aptas para la cría intensiva; pero no existe información, respecto a los hospederos potenciales que pueden ser usados como substrato en su producción. Al respecto se han probado diversos hospederos de nopal (Tovar *et al.*, 2005), pero no se tiene información del rendimiento del insecto y

INTRODUCTION

Grana or cochineal of cactus pear (*Dactylopius coccus* Costa) belongs to the order of Hemiptera, Dactylopiidae family that contains nine species native to North and South America (Rodríguez *et al.*, 2001). The members of this family are important as source of natural coloring (Méndez *et al.*, 2004) and as agents of biological control of cactus pear, considered as an invading weed in Australia and South Africa (Pérez-Guerra, 1991).

Dactylopius coccus has great social and economic importance due to the dry body of females are able to produce carminic acid (CA) (Méndez-Gallegos *et al.*, 2003), which is an hydroxide anthraquinone linked with a glucose unit, widely used as coloring principle in food, beverages, textiles, and in pharmaceutical and cosmetic industries (Baranyovits, 1978). Carminic acid is considered innocuous (Sugimoto *et al.*, 1998), it has antiviral (Krabill *et al.*, 1993), anticarcinogenic (Tütem *et al.*, 1996), and antibiotic properties (Allevi *et al.*, 1998). The FDA in the United States (US Government, Code of Federal Regulations 21) and the Council of the European Union (EU, Community Directive 94/36/EC) have authorized the use of CA as natural coloring (González *et al.*, 2002). Considering the policies of food security matters and consumer pressure with respect to the use of innocuous additives to food, or to pharmaceutical and cosmetic products, subproducts obtained from *D. coccus* might increase its consumption (Méndez-Gallegos *et al.*, 2003).

Grana is commercially produced in Bolivia, Chile, Spain, Mexico, and Peru (Gallegos-Vázquez and Méndez-Gallegos, 2000), the latter country is the most important producer and exporter of these insects. Due to the growing demand of *D. coccus* as a source of natural coloring, it has been introduced to other countries (Campos-Figueroa and Llanderal-Cázares, 2003) that have appropriate agro-ecological conditions for intensive breeding, but there is no information with respect to potential hosts, that could be used as other substrate in its production. Regarding this, different cactus pear hosts have been tested (Tovar *et al.*, 2005), but there is no information about insect yield and CA production. Therefore, a detailed monitoring of insect behavior and quality on hosts, different from those used in

la producción de AC. Por ello se debe efectuar un monitoreo detallado del comportamiento y la calidad del insecto en hospederos diferentes a los usados en su medio natural. El objetivo de este estudio fue determinar la influencia de cinco cultivares de nopal, *Opuntia ficus-indica*, en la supervivencia y reproducción de *D. coccus*, así como en la cantidad de AC en función del peso seco del insecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en condiciones de laboratorio, durante 2003 y 2004, en el Departamento de Protección Vegetal del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA) en La Laguna, España, localizado a 28° 17' N y 16° 50' O y a una altitud de 150 m.

Preparación de cladodios y obtención del pie de cría utilizados en el estudio

Se usaron cladodios de un año de edad de los cultivares de nopal (*O. ficus-indica*): Blanco Moscatel (Islas Canarias), Colorado Moscatel (Islas Canarias), Offer (Israel), Portolano (Italia) y Sicilia Bianca (Italia). Los cladodios seleccionados se cortaron y colocaron en cajas de madera (90×120×30 cm, ancho, largo y alto) que fueron introducidas en cámaras de cría a 24±1 °C, HR de 65±5 % y un fotoperiodo 14:10 (L:O). La luz se proveyó por lámparas de sodio de alta presión de 45 W (F20 T12-PL; GRO and SHO P. L., General Electric).

Para el proceso de infestación se usaron contenedores de tul, con 1 g de hembras grávidas obtenidas de una colonia de insectos desarrollada previamente, para asegurar que las hembras tuvieran la misma edad (65 d). Los contenedores permanecieron adheridos por 48 h al cladodio, mediante un palillo de dientes y después se retiraron. En cada cultivar de nopal se usaron ocho repeticiones y se consideró como unidad experimental el cladodio.

Determinación de la supervivencia y reproducción de *D. coccus*

Para obtener las tablas de vida, cada tercer día se registró el número de insectos sobrevivientes por intervalo de edad en todas las cohortes, hasta que los insectos murieron. También se cuantificó la proporción hembras: machos al inicio del estado de pupa. Con esta información se estableció la duración del ciclo biológico.

Para determinar la tasa de reproducción, de aquellas hembras de *D. coccus* que alcanzaron el estado adulto en cada cohorte, al inicio de la reproducción se seleccionaron 15 hembras al azar

their natural environment, must be carried out. The objective of this study was to determine the influence of five *Opuntia ficus-indica* cultivars on survival and reproduction of *D. coccus*, as well as on the amount of CA according to insect dry weight.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted under laboratory conditions during 2003 and 2004 at the Departamento de Protección Vegetal del Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA) (Vegetal Protection Department of the Canary Institute of Agricultural Research) at La Laguna, Spain, located at 28° 17' N and 16° 50' W, at an altitude of 150 m.

Cladode preparation and obtaining of breeding stock utilized in the study

One-year-old cladodes of cactus pear cultivars (*O. ficus-indica*): Blanco Moscatel (Canary Islands), Colorado Moscatel (Canary Islands), Offer (Israel), Portolano (Italy), and Sicilia Bianca (Italy) were used. The selected cladodes were cut and placed in wooden boxes (90×120×30 cm, wide, long, and high), which were introduced into breeding chambers at 24±1 °C, of 60±5 % relative humidity, and photoperiod 14:10 (Darkness:Light). Light was provided by high pressure sodium lamps of 45 W (F20 T12-PL; GRO and SHO P. L., General Electric).

For the infestation process, "tul" bags were used, with 1g of gravid females each, obtained from an insect colony previously developed to guarantee that the females were of the same age (65 d). The bags remained adhered to the cladodes with a toothpick holder for 48 h and were removed subsequently. In each cultivar, eight replicates were used, and the cladode was considered an experimental unit.

Determining survival and reproduction of *D. coccus*

To obtain life tables, every third day the number of surviving insects was registered by age intervals in every cohort, until the insects died. The proportion females to males, was quantified as well, at the beginning of the pupa stage. With this information, the length of the biological cycle was obtained.

At the beginning of reproduction, 15 females were selected randomly and isolated in a petri dish, to determine the reproduction rate of those *D. coccus* females which reached the adult stage in each cohort. Eggs and newborn nymphs were registered and collected daily in the morning and at night, until the reproduction period finished. Based on this information,

y se aislaron en una caja petri. Los huevos y las ninfas recién nacidas se registraron y recolectaron diariamente, mañana y noche, hasta que la reproducción finalizó. Con esta información se obtuvieron las variables fecundidad total (huevos-hembra⁻¹), fecundidad diaria (huevos ·hembra⁻¹ d⁻¹) y duración del periodo reproductivo. El diseño experimental fue completamente al azar, considerando a las cohortes como tratamientos y las hembras individuales como repeticiones. Los datos se analizaron con el procedimiento ANOVA (SAS Institute, 1999) y las diferencias entre medias fueron determinadas mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Con los valores de supervivencia y reproducción de cada cohorte se obtuvieron la tasa de supervivencia (l_x) y la tasa de fecundidad (m_x), los cuales sirvieron para determinar: tasa neta de reproducción ($R_0 = \sum l_x m_x$), tasa intrínseca de incremento natural ($r_m = \ln(R_0)/T$), tiempo de duplicación (TD) = $\ln 2/r_m$, tasa finita de incremento ($\lambda = e^{r_m}$), y tiempo medio de generación (G) = $\ln R_0/r_m$ mediante las ecuaciones propuestas por Birch (1948) y Krebs (1985). Para determinar las diferencias entre las curvas de supervivencia de *D. coccus* se usó la prueba de log rank ($\alpha=0.01$). Las diferencias entre la tasa intrínseca de incremento de cada cohorte se determinaron mediante la prueba de traslape de intervalos ($\alpha=0.05$) (Vera y Sotres, 1991) usando el software SUFERTI (Colunga y Vera, 1991).

Determinación del contenido de ácido carmínico en *D. coccus*

Para cuantificar la producción de AC se tomó una muestra de 125 mg de las hembras secas de cada población, se molió en un mortero y se agregaron 30 mL de ácido clorhídrico 2 N y se homogenizó por 1 min. Las muestras se extrajeron en baño maría a 60 °C por 35 min, se enfriaron y centrifugaron 15 min a 7000 rpm ($g=9329.6$). Este proceso se repitió y los sobrenadantes se mezclaron y diluyeron en 250 mL de agua destilada. El AC se determinó a 494 nm en un espectrofotómetro Shimadzu (Modelo UV-160 A) en tres repeticiones para cada población. Se construyó una curva de calibración midiendo la absorbancia en una serie de concentraciones conocidas de AC y como blanco se usó una muestra de HCL 2N.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Supervivencia y reproducción de *D. coccus*

La supervivencia de *D. coccus* varió en función del substrato suministrado. Las tablas de vida indicaron que la probabilidad de supervivencia (l_x), desde la infestación hasta el proceso de muda al estado adulto (a

the variables: total fertility (eggs·female⁻¹), daily fertility (eggs·female⁻¹d⁻¹), and length of reproduction period, were obtained. The experimental design was completely at random, considering the cohorts as treatments and the individual females as replicates. The data were analyzed using ANOVA procedure (SAS Institute, 1999), and the differences among means were determined by using the Tukey test ($p \leq 0.05$).

With the values of survival and reproduction of each cohort, survival rate (l_x) and fertility rate (m_x) were known, which served to determine: reproduction net rate ($R_0 = \sum l_x m_x$), intrinsic rate of natural increment ($r_m = \ln(R_0)/T$), duplication time (TD) = $\ln 2/r_m$, finite rate of increment ($\lambda = e^{r_m}$), and time of generation (G) = $\ln R_0/r_m$ through the equations proposed by Birch and Krebs (1985). The log rank test ($\alpha=0.01$) was used to determine the differences among the survival curves of *D. coccus*. The differences of intrinsic rate of increase among cohorts were established by the test of interval overlap ($\alpha=0.05$) (Vera and Sotres, 1991), using SUFERTI software (Colunga and Vera, 1991).

Determining carminic acid content in *D. coccus*

A sample of 125 mg of female dry weight from each population was ground in a ceramic bowl to quantify CA production; 30 mL of 2 N hydrochloric acid were added and homogenized for 1 minute. The samples were extracted in a double water bath at 60 °C in a sealed vessel during 35 min, cooled, and centrifuged for 15 min at 7000 rpm ($g=9329.6$). This process was repeated and the supernatants were mixed and diluted in 250 mL of distilled water. Carminic acid was determined at 494 nm in a Shimadzu spectrophotometer (Model UV-160A), in three replicates for each population. A calibration curve was made, measuring the absorbance in a series of known CA concentrations using a 2N HCL sample as a control.

RESULTS AND DISCUSSION

Survival and reproduction of *D. coccus*

Survival of *D. coccus* varied according to the supplied substrate. Life tables indicated that the probability of survival (l_x), from infestation to the process of changing to adult stage (at 42 and 45 d of development in females, and between 40 and 48 d in males), was higher in the cohorts raised in Portolano (29 %), Offer (21 %), and Blanco Moscatel (18 %) cultivars; in other words, only 29, 21, and 18 % females out of 100 individuals of the initial population succeeded in reaching the adult stage. In Figure 1 it is shown that Sicilia Bianca and Colorado

los 42 y 45 d de desarrollo en el caso de las hembras y entre 40 y 48 d para los machos) fue más alta en aquellas cohortes desarrolladas en los cultivares Portolano (29 %), Offer (21 %) y Blanco Moscatel (18 %); es decir, de cada 100 individuos de la población inicial solo 29, 21 y 18 hembras, lograron llegar al estado adulto. En la Figura 1 se observa que los cultivares Sicilia Bianca y Colorado Moscatel presentaron el efecto contrario, ya que sólo 12 % y 11 % de la población, alcanzó el estado adulto.

Los valores de supervivencia obtenidos en las cinco cohortes fueron bajos, comparados con Méndez-Gallegos *et al.* (1993) quienes registraron una supervivencia de 35 % usando como substrato nopal de castilla, considerado el hospedero natural de *D. coccus*, en México. Todas las curvas de supervivencia presentaron una tendencia exponencial negativa, tipo II, que indica un patrón de mortalidad constante independientemente de la edad.

Los cultivares de nopal suministrados como substrato alimenticio, influyeron sobre los valores de supervivencia de *D. coccus*. La prueba de log rank ($X^2=6.635$; g.l.=1; $\alpha=0.01$) detectó diferencias altamente significativas cuando se compararon las curvas de las cohortes obtenidas entre Portolano y Sicilia Bianca (61.80), y cuando se confrontó Portolano con Colorado Moscatel (87.78) y Portolano con Blanco Moscatel (23.32). Similar comportamiento se observó al comparar las curvas de las poblaciones entre Offer y Sicilia Bianca (93.02) y Offer contra Colorado Moscatel (134.99) y Offer con Blanco Moscatel (48.60).

Aunque las ninfas recién emergidas de *D. coccus* aceptaron los cultivares de nopal suministrados, en todos los substratos se presentó una mortalidad de 40 a 60 % durante los primeros 24 d de desarrollo. Esto fue más evidente en la cohorte Blanco Moscatel donde se registró una mortalidad cercana al 40 % durante los primeros 10 d del ciclo de desarrollo (Figura 1). La mortalidad de *D. coccus* tiende a disminuir conforme aumenta la edad de las poblaciones y cuando los individuos llegan a adultos la mortalidad es casi cero. En condiciones naturales *D. coccus* está sujeta a una elevada mortalidad debido a factores físicos y biológicos limitantes que influyen en la supervivencia y reproducción, entre ellos, la especificidad del insecto por un restringido número de especies y cultivares de nopal. El estado fisiológico y nutricional e incluso la edad de la penca limitan la producción de *D. coccus* (Campos-Figueroa y Llanderal-Cázares, 2003).

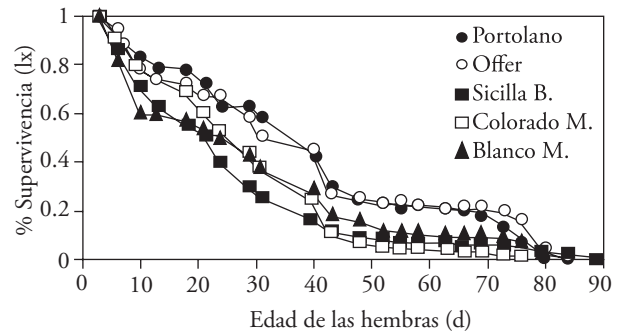


Figura 1. Curvas de supervivencia de *D. coccus* criadas en cinco cultivares de nopal *O. ficus-indica*.

Figure 1. Survival curves of *D. coccus* reared in five *Opuntia ficus-indica* cultivars.

Moscatel cultivars had the opposite effect, since only 12 % and 11 % of the population, reached the adult stage.

The survival values achieved in the five cohorts were low, compared to the observations of Méndez-Gallegos *et al.* (1993) who recorded 35 % of survival, using Castilla cactus pear as substrate, considered the natural host of *D. coccus* in México. All survival curves showed negative exponential tendency, Type II, indicating a constant age-independent mortality pattern.

Cactus pear cultivars, provided as nutritional substrate influenced survival values of *D. coccus*. The log rank test ($X^2 = 6.535$; g.l.=1, $\alpha=0.01$) detected highly significant differences, comparing the curves of the cohorts from Portolano with those of Sicilia Bianca (61.80), the ones from Portolano with those of Colorado Moscatel (87.78), and Portolano vs. Blanco Moscatel curves (23.32). Similar behavior was observed when contrasting the population curves of Offer with Sicilia Bianca (93.02), Offer with Colorado Moscatel (134.99), and Offer with Blanco Moscatel (48.60).

At the beginning the new born *D. coccus* nymphs accepted the provided cactus pear cultivars; however, during the first 24 d of development, in all the substrates, nymph mortality was high ranging from 40 to 60 %. This was more evident in the Blanco Moscatel cohort, where a mortality close to 40 % was recorded during the first 10 d of the development cycle (Figure 1). Cochineal mortality tends to diminish with population age; when the individuals reach adult stage, mortality is almost zero. Under natural conditions, *D. coccus* is subjected to a high mortality

En todas las colonias el número de machos adultos fue al menos dos veces menor que el de las hembras, ya que la relación hembras:machos osciló de 2.4:1 a 4.2:1, por lo que la proporción sexual media obtenida fue 0.35. Pérez-Guerra (1991) consigna una relación de 0.5. a favor de las hembras. Con respecto a la fecundidad, cada hembra de *D. coccus* ovipositó en promedio 167.3 huevos durante el periodo reproductivo, con una duración media de 13 d; en promedio 12.4 individuos d^{-1} hembra $^{-1}$ (Cuadro 1). Los cultivares de nopal usados causaron diferencias significativas en fecundidad total y fecundidad diaria de *D. coccus*, pero no en la duración del periodo reproductivo. Según Ramírez-Cruz *et al.* (2008), la fecundidad de *D. coccus* puede ser considerada como baja en función de las ovarias presentes y en el número de huevos depositados. Al respecto, hay notables diferencias ya que Llanderal y Nieto (2001) determinaron que una hembra de *D. coccus* puede depositar en promedio 100 huevos, pero Mazzeo *et al.* (1998) y Pérez-Guerra (1991) registraron valores más altos (255 y 430 huevos hembra $^{-1}$). En la presente investigación se constató que las hembras de *D. coccus* presentan de manera recurrente la reproducción ovovivípara, en la que los huevos eclosionan dentro del cuerpo de la madre y por tanto es posible observar a las ninfas neonatas salir del oviducto.

El análisis de los resultados indica la posibilidad de que los cultivares Blanco Moscatel y Colorado Moscatel cuenten con mecanismos de resistencia para el establecimiento de *D. coccus*, dado que las cohortes desarrolladas sobre estos dos hospederos mostraron altas tasas de mortalidad y no originaron descendencia.

rate, due to limiting physical and biological factors which influence survival and reproduction among them, specificity of the insect because of a restricted number of *Opuntia ficus-indica* species and cultivars. Physiological and nutritional states and even cladode age, limit *D. coccus* production (Campos-Figueroa and Llanderal-Cázares, 2003).

In all the colonies, there were at least two times fewer males than females, since the relationship females to males fluctuated between 2.4:1 and 4.2:1; thus, the sexual mean proportion was 0.35. Pérez-Guerra (1991) registered a relationship of 0.5 in favor of females. With respect to fertility, each female deposited 167.3 eggs on average during the reproductive period, having a mean length of 13 d, that is, 12.4 individuals (female $^{-1}$) a day on average (Table 1). The utilized cultivars caused significant differences with respect to total and daily fertility, but not with respect to the length of the reproduction period. According to Ramírez-Cruz *et al.* (2008), *D. coccus* fertility may be considered low, based on the present ovarioles and to the number of eggs deposited. Regarding this, there are remarkable differences, since Llanderal and Nieto (2001) determined that one *D. coccus* female was able to deposit 100 eggs on average, but Mazzeo *et al.* (1998) and Pérez-Guerra (1991) recorded higher values (225 and 430 eggs female $^{-1}$). In the present study, it was stated that *D. coccus* females recurrently present ovoviviparous reproduction, where the eclosion of eggs takes place within the mother's body, and it was possible to observe the new born nymphs coming out of the oviduct.

Cuadro 1. Influencia de tres cultivares de nopal[†] *O. ficus-indica* en la reproducción de *D. coccus*.

Table 1. Influence of three *O. ficus-indica* cultivars in *D. coccus* reproduction.

Reproducción	Cultivares de nopal		
	Portolano	Offer	Sicilia B.
Fecundidad total huevos hembra $^{-1}$ (media \pm DE)	(181.3 \pm 101ab)	(215.1 \pm 84a)	(105.4 \pm 85b)
Fecundidad d^{-1} Huevos hembra $^{-1}$ d^{-1} (media \pm DE)	(14.2 \pm 6.7a)	(15.1 \pm 4.0a)	(7.9 \pm 4.7b)
Periodo reproductivo, d (media \pm DE)	(12.2 \pm 3.3a)	(14.1 \pm 2a)	(12.5 \pm 4.6a)

Medias con letra distinta en una hilera son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) ♦ Means with different letter in one row are significantly different ($p \leq 0.05$).

[†] Los datos de los cultivares Blanco Moscatel y Colorado Moscatel no están incluidos, ya que no generaron descendencia ♦ Data of Blanco and Colorado Moscatel cultivars are not included, since they did not generate offspring.

Esto puede estar ligado a aspectos químicos (presencia de compuestos secundarios), fisiológicos (estatus hídrico y nutricional) y morfológicos (grosor de la cutícula, presencia de oxalatos de calcio), que no fueron considerados en este estudio.

Aunque la oviposición durante el periodo reproductivo presentó oscilaciones día a día, fue más frecuente durante la fase inicial de ese periodo, ya que más del 50 % de las crías fueron paridas durante los primeros 5 d (Figura 2). Cabe resaltar que las hembras desarrolladas en el cultivar Sicilia Bianca presentaron un segundo pico de oviposición entre los días 11 y 13. Lo anterior concuerda con lo observado por Ramírez-Cruz *et al.* (2008) quienes indican que *D. coccus* presenta ovariolos con diferentes grados de madurez lo cual ocasiona una oviposición continua durante algunos días, aunque éstas se encuentren separadas de la planta hospedara.

La tendencia observada en la fase reproductiva de *D. coccus* es que conforme avanza la fase reproductiva la oviposición tiende a declinar. El conocimiento preciso de la reproducción permite llevar a cabo la selección rigurosa del pie de cría y lograr una buena producción de *D. coccus* (Aldama-Aguilera y Llanderal-Cázares, 2003).

La prueba de traslape de intervalos detectó diferencia estadística entre las tasas de incremento de las cohortes en estudio (Portolano *vs* Sicilia Bianca, y Offer *vs* Sicilia Bianca). El valor más alto de r_m se registró en la cohorte desarrollada en el cultivar Offer (0,025 hembras d^{-1}); teóricamente, el tamaño de esta población podría incrementarse 2.5 veces d^{-1} (Cuadro 2). Este valor fue bajo en comparación con el observado 0.055 hembras d^{-1} por Méndez-Gallegos *et al.* (1993).

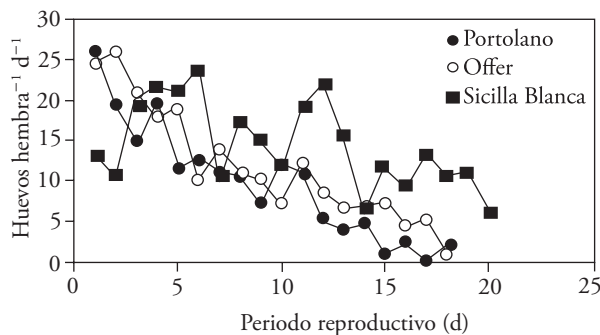


Figura 2. Patrón de oviposición de hembras *D. coccus* criadas en tres cultivares de nopal *O. ficus-indica*.

Figure 2. Oviposition patterns of *D. coccus* females reared in three *Opuntia ficus-indica* cultivars.

The analysis of the results indicates the possibility that Blanco Moscatel and Colorado Moscatel cultivars have resistance mechanisms for the establishment of *D. coccus*, since the cohorts developed on those hosts showed high rates of mortality and did not generate offspring. This behavior may be linked to chemical (presence of secondary compounds), physiological (hydric and nutritional state), and morphological aspects (cuticle thickness, presence of calcium oxalates), which were not taken into account in this study.

Although oviposition during the reproductive period varied from day to day, oscillation was more frequent during the initial phase of this process since more than 50 % of the brood was born during the first 5 d. It is worth emphasizing that the females grown in the Sicilia Bianca cultivar had a second peak of oviposition between days 11 and 13. The aforementioned agrees with the observations by Ramírez-Cruz *et al.* (2008) who pointed out that *D. coccus* has ovarioles with different degrees of maturity which causes continuous oviposition during several days, even though these are separated from the host plant.

Observing the tendency of the cochineal reproduction stage, oviposition has a trend to diminish as the phase advances. The precise knowledge of reproduction allows carrying out strict selection of breeding stock and achieving substantial production of cochineal (Aldama-Aguilera and Llanderal-Cázares, 2003).

The test of interval overlap detected statistical difference between growth rates of the cohorts under study (Portolano *vs* Sicilia Bianca, and Offer *vs* Sicilia Bianca). The highest value of r_m was recorded for the

Cuadro 2. Parámetros demográficos de *D. coccus* criadas en diferentes cultivares de nopal *O. ficus-indica* Mill. Table 2. Demographic parameters of *D. coccus* reared in different *O. ficus-indica* Mill. cultivars.

Cultivares de nopal	Parámetros poblacionales				
	R_0	G	r_m^\dagger	λ	TD
Portolano	4.50	69.10	0.021a	1.022	33.00
Offer	5.83	68.30	0.025a	1.026	27.72
Sicilia Bianca	1.24	73.72	0.003b	1.003	231

[†] Valores de r_m con distinta letra son estadísticamente diferentes $\alpha=0.05$ ♦ Values of r_m with different letter are statistically different ($\alpha=0.05$).

En contraste el valor más bajo ($r_m=0.003$) se obtuvo en la cohorte criada en el cultivar Sicilia Bianca. Los valores de R_0 y G indican que la población de *D. coccus* desarrollada en el cultivar Offer podría incrementarse 5.8 veces en 68 d.

Contenido de ácido carmínico en *D. coccus*

El contenido de AC osciló entre 15 y 19 % en función del peso seco del insecto (Figura 3). El valor más alto se obtuvo en la población desarrollada en el cultivar Blanco Moscatel (19.1 ± 0.2); Pero esta población presentó los valores más bajos de supervivencia y no tuvo descendencia. La cohorte del cultivar Offer, con los valores de crecimiento poblacional más altos, produjo el menor porcentaje de AC (Figura 3).

Estos resultados confirman que los hospederos y su estado nutricional pueden influir en el contenido de AC como lo señalan Rodríguez *et al.* (2005). Aunque los contenidos en AC obtenidos en este estudio se ubican dentro del intervalo registrado por Barbera e Inglese (1997), Sugimoto *et al.* (1998) y Schul (2000); se debe considerar que a diferencia de otros estudios, en la presente investigación la cría del insecto fue en cladodios aislados sin suministro adicional de agua ni nutrientes, lo cual pudo afectar la producción de AC.

A pesar de que las poblaciones desarrolladas en los cultivares Offer y Portolano obtuvieron valores bajos de AC, éstos pueden ser útiles para la producción de pie de cría. El cultivar Sicilia Bianca, obtuvo valores intermedios de supervivencia, fecundidad y un adecuado porcentaje de AC, resultados que lo colocan como un hospedero con características sobresalientes.

CONCLUSIONES

La supervivencia y fecundidad de *D. coccus* y producción de AC fueron afectadas por el tipo de sustrato alimenticio.

En función de la supervivencia y fecundidad de *D. coccus* así como la producción de AC registrada, el estudio permitió diferenciar aquellos cultivares útiles en la generación de pie de cría, cultivares Portolano y Offer, para la producción de AC, cultivares Blanco y Colorado Moscatel y de ambos propósitos cultivar Sicilia Bianca.

Las tablas de vida y fecundidad representan una herramienta adecuada para identificar aquellos cultivares

Offer cohort (0.025 females d^{-1}); theoretically, the size of this population could be increased 2.5 times a day (Table 2). This value was low, compared to the one observed by Méndez-Gallegos *et al.* (1993), being 0.055 females d^{-1} .

In contrast, the lowest value was obtained in the cohort of the Sicilia Bianca cultivar. The values of R_0 and G indicate that the cochineal population of the Offer cultivar could be increased 5.8 times within 68 d.

Carminic acid content in *D. coccus*

Content of CA ranged between 15 and 19 % according to the dry weight of the insect (Figure 3). The highest value was achieved with the population reared in Blanco Moscatel (19.1 ± 0.2), but this cohort had lower survival values and did not have progeny. The Offer cohort obtained the highest population growth, but produced the least CA percentage (Figure 3).

These results confirm that the hosts and their nutritional conditions may influence the CA content, as Rodríguez *et al.* (2005) pointed out. Although the CA contents reached in this study are within the interval recorded by Barbera and Inglese (1977), Sugimoto *et al.* (1998), and Schul (2000), it also must be considered, that in the present research, different from other studies, the insect brood was on isolated cladodes without additional water or nutrient supply, which may had affected the CA production.

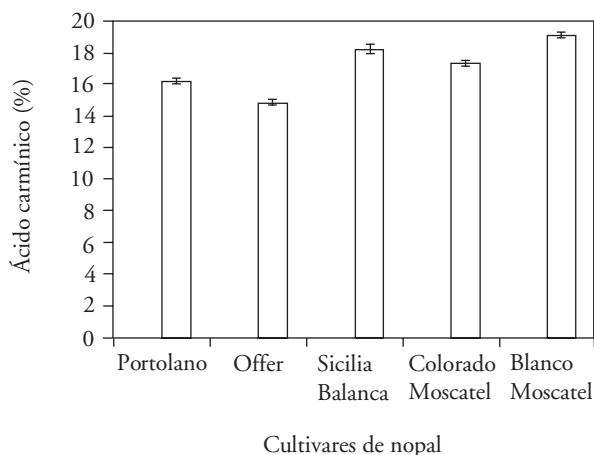


Figura 3. Valores de ácido carmínico producido por *D. coccus* en cinco cultivares de nopal *O. ficus-indica*.
Figure 3. Values of carminic acid produced by *D. coccus* in five *O. ficus-indica* cultivars.

de nopal que pueden ser potencialmente útiles en la implementación de programas de cría intensiva del insecto.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor expresa su agradecimiento al programa ANUIES-SEP-SUPERA, por la beca para realizar sus estudios doctorales. También agradece particularmente al Dr. Eladio González-Díaz por proporcionar el material vegetativo de su colección de nopal de la Estación Experimental Güimar-ICIA, Tenerife, España, para poder realizar esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Aldama-Aguilera, C. y C. Llanderal-Cázares. 2003. Grana cochinilla: comparación de métodos de producción en penca cortada. *Agrociencia* 37(1):11-19.
- Allevi, P., M. Anastasia, S. Bingham, P. Ciuffreda, A. Fiecchi, G. Cighetti, M. Muir, and J. Tyman. 1998. **Synthesis of carminic acid, the colourant principle of cochineal.** *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* (3):575-582.
- Baranyovits, F. L. C. 1978. Cochineal carmine: an ancient dye with a modern role. *Endeavour* 2(2):85-92.
- Barbera, G., and P. Inglese. 1997. The breeding of *Dactylopius coccus* (Costa) under controlled conditions in Sicily. *In: Memorias del VII Congreso Nacional y V Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal.* Monterrey, N. L. México. pp: 186.
- Birch, L. C. 1948. The intrinsic rate of natural increase on an insect population. *J. Anim. Ecol.* 17: 15-26.
- Campos-Figueroa, M., y C. Llanderal-Cázares. 2003. Producción de grana-cochinilla *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae) en invernadero. *Agrociencia* 37(2):149-155.
- Colunga G., M., y J. Vera G. 1991. SUFERTI. Programa de computación para estimar y comparar algunas estadísticas demográficas en insectos. *In: Resúmenes XXVI Congreso Nacional de Entomología.* Sociedad Mexicana de Entomología. Oaxaca, México 1991. pp: 137-138.
- Gallegos-Vázquez, C., y S. de J. Méndez-Gallegos. 2000. La tuna. Criterios y Técnicas para su Producción Comercial. Universidad Autónoma Chapingo - Colegio de Postgraduados -Fundación PRODUCE-Zacatecas A.C. Ed. México. pp: 13.
- González, M., J. Méndez, A. Carnero, M. G. Lobo, and A. Afonso. 2002. **Optimizing conditions for the extraction of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa) using response surface methodology.** *J. Agric. Food Chem.* 50:6968-6974.
- Krabill, K., J. M. Jamison, J. Gilloteaux, and J. L. Summers. 1993. Subcellular localization and antiviral activity of carminic acid/poly r (A-U) combinations. *Cell Biol. Int.* 17(10):919-933.
- Krebs, C. J. 1985. *Ecology. The Experimental Analysis of Distribution and Abundance.* 3rd. Ed. Harper Int. New York. 754 p.

In spite of the fact that cochineal populations, developed in the Offer and Portolano cultivars produced the lower CA values, they may be useful for the production of breeding stock. Since Sicilia Bianca had intermediate survival and fertility values, and an adequate CA percentage, it is considered as the host with the most outstanding characteristics for the production of breeding stocks and CA.

CONCLUSIONS

Survival and fertility of *D. coccus*, and CA production were affected by the type of nutritional substrate.

According to survival and fertility of cochineal insects, and the production of CA, it was possible to differentiate those cultivars useful for generating breeding stock, Portolano and Offer; for CA production, Blanco and Colorado Moscatel; and for both purposes, Sicilia Bianca.

Life and fertility tables represent an adequate tool for identifying those cactus pear cultivars that may potentially be useful in the implementation of intensive cochineal insect breeding programs.

—End of the English version—



- Llanderal C., C., y R. Nieto H. 2001. Características biológicas de la grana cochinilla del nopal *Dactylopius coccus* Costa. *In: Producción de grana cochinilla.* Llanderal C., C., y R. Nieto H. (eds) Colegio de Postgraduados. Texcoco, México. pp: 23-30.
- Mazzeo, G., A. Russo, and P. Suma. 1998. Rilievi sulla biologia della cocciniglia del carminio in ambienti protetto. *In: Atti XVIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia.* Maratea 21-26 giugno 1998. Italia. pp: 137.
- Méndez-Gallegos, S. de J., J. Vera-Graziano, H. Bravo-Mójica, y J. López-Collado. 1993. Tasas de supervivencia y reproducción de la grana-cochinilla *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae) a diferentes temperaturas. *Agrociencia. Serie Protección Vegetal* 4(1):7-22.
- Méndez-Gallegos, S. de J., T. Panzavolta, and R. Tiberi. 2003. Carmine cochineal *Dactylopius coccus* Costa (Rhynchota: Dactylopiidae): Significance, production and use. *Adv. Hort. Sci.* 17(3): 165-171.
- Méndez, J., M. González, G. Lobo, and A. Carnero. 2004. Color quality of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa), geographical origin characterization using multivariate statistical analysis. *J. Agric. Food Chem.* 52(5):1331-1337.
- Pérez-Guerra, G. 1991. Biosystematics of the family Dactylopiidae (Homoptera: Coccinea) with emphasis on the life cycle

- of *Dactylopius coccus* Costa. Ph. Dissertation. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia. 168 p.
- Ramírez-Cruz, A., C. Llanderal-Cázares, and R. Racotta. 2008. Ovariole structure of the cochineal scale insect, *Dactylopius coccus*. 5pp. J. Insect Sci. 8:20, available online: insectscience.org/8.20.
- Rodríguez L. C., M. A. Méndez, and H. M. Niemeyer. 2001. Direction of dispersion of cochineal (*Dactylopius coccus* Costa) within Americas. *Antiquity* 75:73-77.
- Rodríguez L. C., E. Faúndez, J. Seymour, C. Escobar, L. Espinoza, M. Petroutsas, A. Ayres, y H. N. Niemeyer. 2005. Factores bióticos y concentración del ácido carmínico en la cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) (Homoptera: Dactylopiidae). *Agric. Téc.* 65(3):323-329.
- SAS Institute. 1999. SAS System for Windows. V. 8.0. SAS Institute Inc. Cary, NC. 27513. USA.
- Schul, J. 2000. Carmine. In: Lauro G. J., and F. J. Francis (eds). *Natural Foods Colorants: Science and Technology*. Marcel Dekker. New York. pp: 1-10.
- Sugimoto, N., Y. Goda, J. Suzuki, M. Kuroyanagi, T. Yamada, K. Yoshihira, and T. Maitani. 1998. Structures of minor pigments in cochineal dye. *Natural Medicines* 52(2):135-139.
- Tovar, A, M. Pando-Moreno, and C. Garza. 2005. Evaluation of three varieties of *Opuntia ficus-indica* (L) Miller as hosts of the cochineal insect *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae) in a semiarid area of northeastern Mexico. *Economic Bot.* 59(1):3-7.
- Tütem, E., R. Apak, and K. Sozgen. 1996. The interaction of antitumor-active anthraquinones with biologically important redox couples: I. Spectrophotometric investigation of the interaction of carminic acid and mitoxantrone with the iron (II, III) and copper (I, II) redox couples. *J. Inorg. Biochem.* 61(2):79-96.
- Vera G., J., y D. Sotres R. 1991. Prueba de traslapo de intervalos para comparar tasas instantáneas de desarrollo poblacional. *Agrociencia. Serie Protección Vegetal* 2(2):7-13.