

1997 D

094400252

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS .

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



TÉCNICAS DE TEÑIDO CON PIGMENTO DE COCHINILLA PARA LA
DETECCIÓN DE LARVAS Y PUPAS DE LA PALOMILLA DORSO DE
DIAMANTE *Plutella xylostella* L.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

DANITZA EUSTOLIA GOCHE MONTES

ZAPOPAN, JAL., MARZO DE 1999



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**C. DANITZA EUSTOLIA GOCHE MONTES
P R E S E N T E.**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulacion en la modalidad de TESIS con el título "TECNICAS DE TEÑIDO PARA LA DETECCION DE LARVAS Y PUPAS DE PALOMILLA DORSO DE DIAMANTE PLUTELLA XYLOSTELLA L. CON PIGMENTO DE COCHINILLA", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo a la BIOL. ANA LILIA VIGUERAS GUZMAN y como asesores al M.C. LIBERATO PORTILLO MARTINEZ Y M.C. ESTEBAN RODRIGUEZ LEYVA.

A T E N T A M E N T E
" PIENSA Y TRABAJA "
LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., JULIO 14 DE 1998


M. EN C. ARTURO OROZCO BAROCIO
PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION


M. EN C. MARTHA GEORGINA OROZCO MEDINA
SECRETARIO DEL COMITE DE TITULACION



c.c.p. BIOL. ANA LILIA VIGUERAS GUZMAN.- Director del Trabajo.
c.c.p. M.C. LIBERATO PORTILLO MARTINEZ.- Asesor del Trabajo.
c.c.p. M.C. ESTEBAN RODRIGUEZ LEYVA.- Asesor del Trabajo.
c.c.p. Expediente del alumno

AOB/MGOM/bacc*

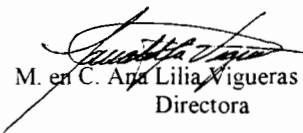
M. C. Arturo Orozco Barocio.
Presidente del Comité de Titulación
de la Lic. en Biología del CUCBA.
P R E S E N T E .


Por medio de este conducto nos permitimos informar a usted, que una vez revisado el manuscrito de la Tesis que realizó la pasante Danitza Eustolia Goche Montes, con código 094400252, cuyo título fue **Técnicas de teñido con pigmento de cochinilla para la detección de larvas y pupas de la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* L.**; consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para su autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

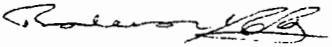
Sin otro particular agradecemos de antemano su atención que se sirva dar a la presente y aprovechamos la ocasión para remitirle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Zapopan, Jal. a 19 de marzo de 1999.

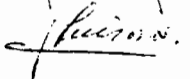

M. en C. Ana Lilia Viguera Guzmán.
Directora

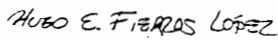

M. en C. Liberato Portillo Martínez.
Asesor


M. en C. Esteban Rodríguez Leyva.
Asesor externo

Sinodales


Dr. Gustavo Moya Raygoza.


M. en C. José Luis Navarrete Heredia.


Biól. Hugo Fierros López.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por su apoyo y porque siempre han estado a mi lado.

A mi directora de tesis Ana Lilia Vigueras, por guiarme con dedicación y paciencia, mil gracias.

A Liberato Portillo por su gran profesionalismo y entusiasmo hacia la investigación.

A Esteban Rodríguez por su buen carácter y por compartirme su forma de trabajo.

A mis sinodales Gustavo Moya y Hugo Fierros por su atención y comprensión.

A José Luis Navarrete porque sus enseñanzas no sólo han estado en un salón de clases, gracias.

A los profesores, especialmente Salvador Magaña, Georgina Quiroz, Rafael Soltero y Francisco Zamora.

A mis amigos de generación.

A Jachin por su gran ayuda incondicional, por sus paros en las colectas y en todo lo que necesite.

A los investigadores Rafael Bujanos, Mabel Martínez y Mike McCully por su colaboración.

A Gustavo, Atala y Yalma por su ayuda durante la realización de la tesis.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	ii
RESUMEN.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Importancia del cultivo de crucíferas (Brassicaceae)	3
2.2. Brócoli.....	3
2.3. Principales plagas que atacan a las crucíferas.....	4
2.4. Palomilla dorso de diamante.....	5
2.4.1. Descripción morfológica y reproducción.....	6
2.4.2. Estructura cuticular de la larva.....	8
2.4.3. Control.....	9
2.5. Técnicas de tinción.....	12
2.6. La cochinilla.....	12
2.7. Descripción y aplicaciones del colorante de la cochinilla.....	13
2.7.1. Cochinilla seca	13
2.7.2. Extracto de cochinilla.....	13
2.7.3. Ácido carmínico.....	13
2.7.4. Carmin.....	14
3. HIPÓTESIS.....	15
4. OBJETIVOS.....	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
5.1. Descripción de la zona de colecta.....	16
5.2. Colecta del material biológico y establecimiento de la cría.....	16

5.3. Bioensayos.....	17
5.4. Preparación de los tintes.....	18
5.4.1. Carmalumbre.....	18
5.4.2. Carmín de Rawitz.....	18
5.4.3. Escarlata R ó Sudán IV.....	18
5.4.4. Azocarmin.....	18
5.4.5. Carmín I.....	19
5.4.6. Carmín II.....	19
5.4.7. Carmín III.....	19
5.4.8. Rojo cochinilla.....	20
5.4.9. Extracto acuoso.....	20
5.5. Determinación del contenido de ácido carmínico.....	20
5.6. Criterio de tinción para larvas y pupas.....	21
5.7. Pruebas preliminares en brócoli.....	21
5.8. Análisis estadístico.....	21
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
6.1. Evaluación de los tintes para larvas.....	23
6.2. Evaluación de los tintes para pupas.....	25
6.3. Determinación del contenido de ácido carmínico de cada tinte.....	28
6.4. Resultados para las pruebas preliminares en brócoli.....	28
7. CONCLUSIONES.....	31
8. RECOMENDACIONES.....	32
9. LITERATURA CITADA.....	33

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Proceso de congelado individual instantáneo.....	7
Figura 2. Ciclo biológico de la palomilla dorso de diamante <i>Plutella xylostella</i> L.....	11
Figura 3. Larvas teñidas con los tintes a) carmín II y b) rojo cochinilla.....	23
Figura 4. Número de larvas teñidas en cada uno de los tintes elaborados.....	24
Figura 5. Resultados obtenidos de acuerdo al tiempo con las proporciones y tintes empleados.....	25
Figura 6. Pupas teñidas con cualquiera de los siguientes tintes a) carmalumbre, carmín de Rawitz y rojo cochinilla. b) escarlata R, azocarmin, carmín I, carmín II y carmín III.....	26
Figura 7. Número de pupas teñidas con cada uno de los tintes elaborados con cochinilla.....	26
Figura 8. Resultados obtenidos de acuerdo al tiempo con las proporciones y tintes empleados.....	27
Figura 9. Floretes de brócoli teñidos con los tintes azocarmin, carmín I, carmín II y carmín III.....	29
Figura 10. Floretes de brócoli teñidos con los tintes carmín de Rawitz, carmalumbre y rojo cochinilla.....	30

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Principales plagas secundarias de crucíferas del Bajío.....	5
Cuadro 2. Principales factores de mortalidad de <i>Plutella xylostella</i> L.....	10
Cuadro 3. Larvas teñidas con los nueve tintes durante 60 minutos.....	23
Cuadro 4. Determinación del contenido de ácido carmínico en los nueve tintes.....	28
Cuadro 5. Tinción de los bordes de los tallos de brócoli con los nueve tintes en seis proporciones.....	29

RESUMEN

La palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* L. es la plaga de mayor incidencia en las crucíferas como el brócoli, col y coliflor. Este insecto ocasiona grandes pérdidas a los agricultores y a las compañías procesadoras por el rechazo de estos productos, debido a que los contaminan en estado de larva y pupa. La detección de larvas y pupas en brócoli y coliflor, se dificulta porque presentan la misma coloración que su huésped, lo cual los hace poco visibles en estos vegetales. Debido a lo anterior, se evaluaron nueve tintes con cochinilla para teñir las larvas y pupas de color rojo y así tener un contraste con el fondo verde del brócoli, y de esta manera, detectarlas y eliminarlas fácilmente del producto. De los nueve tintes, sólo dos produjeron los mejores resultados para la tinción de larvas. Dichos tintes fueron: carmín II y rojo cochinilla con la proporción 1:0 (tinte: agua) y durante un tiempo de 60 minutos. Mientras que las pupas fueron teñidas mejor con los tintes carmalumbre, carmín de Rawitz, escarlata R, azocarmin, carmín I, carmín II, carmín III y rojo cochinilla. Estos ocho tintes aplicados en las proporciones 1:0 y 1:3 (tinte: agua), durante 15 y 30 minutos tiñeron con facilidad las pupas.

Además se realizaron pruebas preliminares de tinción en los floretes del brócoli con los nueve tintes. Sólo los bordes de los tallos donde se realizaron los cortes se tiñeron y esta tinción no fue de manera uniforme, pues dependió de la proporción y tinte empleado.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, se observó que el colorante de la cochinilla puede ser empleado en la tinción de larvas y pupas de *Plutella xylostella* L. para su detección en brócoli.

1. INTRODUCCIÓN

En el mundo se cultiva una gran diversidad de hortalizas, entre éstas, las crucíferas como la col (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), el brócoli (*B. oleracea* var. *italica* Plenck), la coliflor (*B. oleracea* var. *botrytis* L.) y la col de bruselas (*B. oleracea* var. *gemmifera* Zenker) son de gran importancia alimentaria, económica y social en varios países. entre estos: China, India, Gran Bretaña, Estados Unidos y México (Hume *et al.*, 1972; Gordon y Barden, 1984; Chelliah y Srinivasan, 1986; Talekar y Shelton, 1993; Bujanos y Marín, 1996).

En México estas hortalizas se producen durante la mayor parte del año, principalmente para el mercado de exportación y en menor escala para el consumo nacional (Garza, 1992). En los estados de Guanajuato y Querétaro, parte de la región denominada el Bajío, los cultivos de brócoli y coliflor tienen gran importancia socioeconómica, debido a que abarcan una extensa superficie agrícola y generan empleos (Bujanos y Marín, 1996).

En México el brócoli y coliflor son afectados por varias plagas, entre éstas se encuentra la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae), plaga de mayor repercusión económica por el daño directo que ocasiona al alimentarse del follaje y porque las larvas y pupas contaminan las partes comestibles de los vegetales con su presencia junto con sus exuvias y excreciones, lo que implica grandes pérdidas económicas tanto a los agricultores como a las compañías procesadoras y de exportación, debido a que la presencia de larvas y pupas provoca el rechazo de estos productos (Bujanos *et al.*, 1993).

La selección de las pellas¹ de brócoli en las compañías procesadoras se realiza de manera manual para eliminar los insectos que contaminan al producto, y la de mayor incidencia es la palomilla dorso de diamante. Las inspecciones resultan insuficientes para percibir las larvas y pupas de este plaga, ya que muestran la misma coloración que su huésped (homocromía) lo cual las hace poco visibles en las pellas (Schauenberg, 1978).

¹ Conjunto de cabezas florales pequeñas, verdes, no desarrolladas (Edmond *et al.*, 1984).

Emplear pigmentos obtenidos a partir de diversos organismos, puede ser de gran ayuda para percibir algunos de los estados inmaduros de insectos homocrómicos: tal es el caso del pigmento obtenido de la cochinilla *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae), insecto parásito del nopal, el cual se utiliza como materia prima para elaborar carmines y extractos alcohólico acuosos, cuyo principio colorante es el ácido carmínico, además su empleo no resulta dañino al hombre a diferencia de los colorantes sintéticos (Portillo y Viguera, 1994).

Debido a lo anterior es necesario establecer metodologías que ayuden a disminuir este problema, y una de ellas puede ser la elaboración de un tinte con pigmento de cochinilla, el cual permita teñir las larvas y pupas de *P. xylostella*, para contrastarlas sobre el fondo verde del brócoli durante el proceso de selección, para así facilitar la percepción de los estados inmaduros.

Por tal motivo, en la presente investigación se evaluó la eficiencia del pigmento de la cochinilla para teñir larvas y pupas de la palomilla dorso de diamante, para que una vez teñidas, su detección y eliminación del brócoli sea más fácil durante el proceso de selección. Con esto se podría optimizar la mano de obra que se utiliza para limpiar al producto de la plaga y contribuir al mantenimiento del nivel de calidad del mismo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Importancia del cultivo de crucíferas (Brassicaceae).

Durante la década de los noventa, México ha tenido una participación significativa a nivel mundial en la exportación de productos hortícolas y actualmente, continúa como el principal proveedor de hortalizas a Estados Unidos (Higuera, 1992).

En nuestro país existen más de 500,000 productores de hortalizas, en su mayoría ejidatarios y pequeños propietarios (Pelayo, 1992). Entre las hortalizas que se cultivan, las de mayor importancia económica son: Solanáceas (jitomate, tomate, berenjena y pimiento), cucurbitáceas (pepino, melón, sandía y calabaza) crucíferas (brócoli, coliflor y col), entre otras (Valadez, 1989).

Muchas crucíferas son comestibles, entre ellas cabe citar: col, coliflor, brócoli, col de bruselas, nabo, colza, rábano y berro. Otras son cultivadas por sus flores como la berza ornamental (Bailey, 1949; Fragoso y Luisier, 1972; Gordon y Barden, 1984).

En 1992, México contribuía con el 92% de las importaciones de coliflor y el 83% del brócoli introducido a Estados Unidos, cifras que se han incrementado en los últimos años (Higuera, 1992). Ambos cultivos son altamente rentables en algunas zonas del país (Alatorre *et al.*, 1992).

Las crucíferas se caracterizan principalmente por sus inflorescencias con racimos simples y sus frutos en silicua o silícula, que mientras más maduros más alejados están del eje floral. La mayoría de estas plantas son herbáceas con hojas alternas, sin estipulas y flores dispuestas en racimos. Habitan las zonas templadas y frías del hemisferio boreal, en la región mediterránea son frecuentes, lo mismo en las tierras de cultivo que en lugares agrestes, e incluso en los peñascos y en las elevadas cumbres de las montañas (Corsia, 1972; Rzedowski y Rzedowski, 1979; Rzedowski, 1994).

2. 2. Brócoli.

En la región del Bajío se cultivan alrededor de 36, 490 ha de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) durante todo el año, debido al clima de la región y a la demanda de estos productos (Salas-Araiza y Salazar-Solis, 1998).

Para la cosecha del brócoli se utilizan como indicadores: el tiempo, el tamaño de la pella y la firmeza de ésta. Para obtener pellas en su madurez óptima la cosecha se puede prolongar por 3 ó 4 semanas dependiendo del cultivar y la superficie sembrada (Valadez, 1989). Los trabajadores cortan manualmente las pellas maduras y las llevan a un camión, o bien una persona las corta y otra las recoge y coloca en cajas. (Tiscornia, 1975).

Posteriormente el brócoli se vende en mercados o es sometido a un proceso industrial, aprovechándose así los excedentes que no se pudieran consumir en el momento de la cosecha (Lacedelli y Elizarraras, 1994). La Figura 1, presenta de manera general un proceso de congelado individual instantáneo.

2.3. Principales plagas que atacan a las crucíferas.

Las plagas que atacan a las crucíferas no sólo causan daño por la defoliación de la planta, sino también al contaminar el producto con su presencia y excreciones, lo que ocasiona grandes pérdidas económicas por el rechazo de estos productos (Andrews, 1984). De acuerdo con lo anterior, Bujanos y Marín (1997) mencionaron que las plagas de esta familia en la región del Bajío se pueden dividir en plagas secundarias y contaminadoras.

Las plagas secundarias son llamadas así, porque su daño lo causan principalmente al defoliar las hojas de las plantas y minar sus tallos, los principales insectos que atacan a las crucíferas se presentan en el cuadro 1.

Las plagas contaminadoras son conocidas así, porque la presencia de alguno de sus estadios biológicos, así como de sus excrementos, ocasionan el rechazo de las cosechas de brócoli, coliflor y col, por que afectan la calidad del producto (Salas-Araiza *et al.*, 1993). Entre estas se encuentran la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae), el gusano falso medidor *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), el gusano importado de la col *Pieris rapae* L. (Lepidoptera: Pieridae) y el gusano rayado de la col *Leptophobia arifa* Boisduval (Lepidoptera: Pieridae) (Bujanos y Marín, 1997; Salas-Araiza y Salazar-Solis, 1998).

Cuadro 1. Principales plagas secundarias de crucíferas del Bajío
(Bujanos y Marín, 1997).

Nombre común	Nombre científico	Orden	Familia
Gusano soldado	<i>Pseudaletia unipuncta</i> Haworth	Lepidoptera	Noctuidae
Gusano del corazón de la col	<i>Copitarsia consuea</i> Walker	Lepidoptera	Noctuidae
Diabrotica o doradilla	<i>Diabrotica undecimpunctata</i> Barber	Coleoptera	Chrysomelidae
Diabrotica- doradilla	<i>Diabrotica balteata</i> Le Conte	Coleoptera	Chrysomelidae
Chinche arlequin de la col	<i>Murgantia histrionica</i> Hahn	Hemiptera	Pentatomidae
Pulgón cenizo de la col	<i>Brevicoryne brassicae</i> L.	Homoptera	Aphididae
Pulgón verde opaco de la col	<i>Lipaphis erysimi</i> Kaltenbach	Homoptera	Aphididae

Metcalf y Flint (1965), Andrews (1984), Pacheco (1985) y Bujanos y Marín (1996 y 1997) describieron de manera detallada la biología y comportamiento de algunos de estos insectos, así como algunas medidas empleadas para su control.

2.4. Palomilla dorso de diamante.

La palomilla dorso de diamante se conoce también con el nombre de "rasquiña" ó "plutella" (Rueda y Shelton, 1996). La clasificación que ha prevalecido para esta plaga es la propuesta por Moriuti (1986):

Orden: Lepidoptera

Familia: Yponomeutidae

Género: *Plutella*

Especie: *P. xylostella* L.

Esta es la plaga contaminadora de mayor importancia por su elevado índice de incidencia (McCully y Salas, 1992). Es originaria del Mediterráneo, centro de origen de las especies de plantas más importantes de las crucíferas. Actualmente se distribuye en diversas partes del mundo en donde se cultivan estos vegetales, en zonas templadas no puede sobrevivir al invierno. Coloniza las regiones productoras al final de la estación de los cultivos o por medio de las plántulas de trasplante que vienen de regiones

subtropicales (Bujanos *et al.*, 1993). Es un insecto cosmopolita debido a su gran capacidad migratoria y a su propagación rápida a través del hospedero (Andrews, 1984).

En México, esta plaga está considerada como una de las más importantes que ocasiona daños indirectos por contaminación en las regiones productoras de crucíferas.

Se registró por primera vez en México en 1960, atacando cultivos de repollo en el Valle Yaqui, Sonora (Carrillo, 1966). En la región del Bajío se presentó hasta 1986, a tal intensidad que hubo varios campos con grandes pérdidas económicas (Laborde, 1992).

2.4.1. Descripción morfológica y reproducción.

La palomilla dorso de diamante es un insecto holometábolo, debido a esto pasa por un estadio pupal entre el estado de larva y el de adulto (De Viedma *et al.*, 1985).

Los huevos son de forma oval, color amarillo y miden aproximadamente 0.5 mm, los cuales son depositados principalmente en el envés de las hojas. Después de emerger del huevecillo, la larva del primer estadio presenta un color amarillo blanquecino, con la cápsula cefálica oscura y se alimenta del envés de las hojas dejando pequeños agujeros (Andrews, 1984).

Por lo general las larvas del primer y segundo estadio minan entre las capas cerosas epidérmicas de las hojas, mientras que las larvas de tercer y cuarto estadio se alimentan por el envés consumiendo toda la hoja. Las larvas maduras de cuarto estadio miden de 8 a 12 mm de longitud y pueden ser de color verde pálido, ocre pálido, amarillo claro o castaño oscuro. La pupa mide de 10 a 12 mm de longitud y presenta un color amarillo claro, amarillo verdoso, verde claro u oscuro con bandas longitudinales de color café oscuro. Antes de pupar la larva teje un capullo blanco dentro del cual se transforma en pupa; esta estructura se adhiere firmemente a diferentes partes de la planta y es una protección física contra algunos parásitos o depredadores, ocasionando con ello los daños en el vegetal. (Bujanos *et al.*, 1993; Martínez, 1996). El estado adulto es una palomilla pequeña que mide de 1.2 a 1.5 cm de expansión alar, con 0.5 a 0.8 cm de longitud (Figura 2).

PROCESO DE CONGELADO INDIVIDUAL INSTANTÁNEO

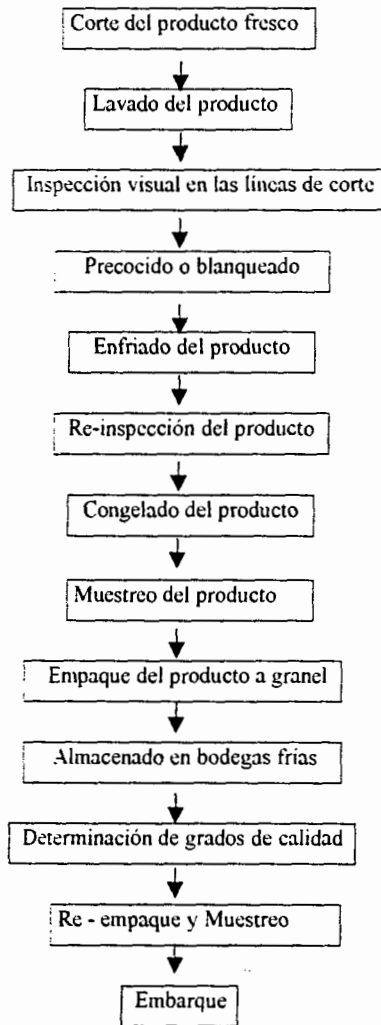


Figura 1. Proceso de congelado individual instantáneo (Lacedelli y Elizarraras, 1994).

La hembra es color gris pardo oscuro y por lo general es más grande que el macho. El macho presenta sobre su parte dorsal un patrón de color crema con forma de tres diamantes, los cuales se distinguen cuando las alas están plegadas. (Rueda y Shelton, 1996). Normalmente están listos para aparearse al atardecer del mismo día de su emergencia. Los machos son atraídos a las hembras por medio de feromonas y las hembras necesitan realizar al menos una cópula para quedar debidamente fecundadas. (Metcalf y Flint, 1965; Pacheco, 1985; Bujanos *et al.*, 1993). La oviposición es estimulada por el apareamiento y la presencia de plantas hospederas. El periodo pre-reproductivo (retraso en el periodo de oviposición) puede incrementarse si la temperatura máxima se eleva, sobre todo si excede los 33°C, o bien si las fuentes de alimentación fueron crucíferas silvestres u hojas de brócoli senescente (Chelliah y Srinivasan, 1986). Esta plaga tiene mayor tasa de reproducción y llega al estado adulto en menor tiempo cuando se alimenta de coliflor, col y brócoli que cuando se alimenta de otras crucíferas (Rivera *et al.*, 1989).

2.4.2. Estructura cuticular de la larva.

La cutícula es la capa que se encuentra en la superficie del cuerpo de la larva, tiene como funciones principales proteger al organismo de la desecación, es impermeable al agua, por lo que minimiza la pérdida de ésta reduciendo la transpiración, protege de ataques por microorganismos, parásitos y predadores, inhibe el crecimiento de hongos y bacterias, provee protección como camuflaje químico, ya que ciertos insectos pueden ser similares en su composición y estructura a los lípidos de la superficie de sus plantas hospederas, como es el caso de la larva de la palomilla dorso de diamante, en donde la composición de los lípidos cuticulares, son idénticos a los lípidos de la superficie de su planta hospedera *Brassica oleracea* L. (Prado y Valdez, 1990 y Buckner, 1993).

Prado y Valdez (1990) señalaron que la cutícula es el conjunto de sustancias segregadas por las células de la hipodermis que constituyen una capa de espesor y características físicas y químicas variables. La cutícula esta formada de los siguientes estratos de fuera hacia adentro: epicutícula externa, epicutícula interna, procutícula y estrato de Schmidt o zona de deposición.

La epicutícula externa está formada de lípidos libres que contienen los principales compuestos alifáticos polares y no polares y que sólo pueden ser extraídos por solventes orgánicos. La cantidad y composición de lípidos cuticulares puede variar ampliamente entre grupos de insectos, y algunas veces dentro de los estados de desarrollo de algunas especies (Buckner, 1993). La epicutícula externa es químicamente insensible al líquido ecdisial y actúa como barrera que deja pasar selectivamente diversas sustancias.

La epicutícula interna se forma por lipoproteínas estabilizadas con polifenoles, bajo este estrato se forma la procutícula que contiene básicamente microfibrillas de quitina incluidas en proteínas y que están en contacto directo con las células de la hipodermis que constituyen el estrato de Schmidt o zona de deposición de aspecto granuloso, en donde la cutícula está siendo apenas formada (Prado y Valdez, 1990).

2.4.3. Control.

Andrews (1984) asentó que el control de esta plaga se dificulta por su tipo de alimentación críptica, por la alta prolificidad de la plaga, generaciones cortas, rápida capacidad de desarrollo de resistencia a insecticidas, y por su capacidad de emigrar grandes distancias.

El control químico ha sido cada vez menos eficiente en zonas donde se realizan continuas aplicaciones de insecticidas, debido a la habilidad de este insecto para desarrollar resistencia a diversos grupos toxicológicos; además, bajo fuerte presión de selección por insecticidas acorta su vida, oviposita más copiosamente y aumenta el porcentaje de eclosión (Talekar *et al.*, 1986).

Bajo ciertas condiciones, el parasitoide *Diadegma insularis* Cresson (Hymenoptera: Chalcididae) reduce la población de *P. xylostella*, pero no mantiene a la plaga bajo su nivel de daño económico (McCully y Salas, 1992).

La palomilla dorso de diamante se encuentra expuesta a un gran número de factores bióticos y abióticos de mortalidad; estos factores ejercen una influencia considerable sobre la densidad de sus poblaciones, el cuadro 2 muestra los principales factores de mortalidad según Lim (1986) y Chelliah y Srinivasan (1986).

Cuadro 2. Principales factores de mortalidad de *Plutella xylostella* L.

Factores de mortalidad	Estadios de <i>P. xylostella</i> que se ven afectados.
Bióticos:	
<i>Trichogramma confusum</i>	Huevecillos, larvas y pupas son parasitados por
<i>Trichogrammatoidea bactre</i>	estas avispidas
Crisopas, coccinélidos, chinches, arañas, hormigas.	Las larvas son depredadas por estos organismos.
Hongos, bacterias y virus.	Atacan al estado larval.
Pájaros	Depredan las larvas.
Abióticos:	
Lluvia	Larvas de primer y segundo estadio y adultos.
Temperatura	Afecta directamente la sobrevivencia de las pupas.
Humedad	Afecta directamente la sobrevivencia de las pupas.

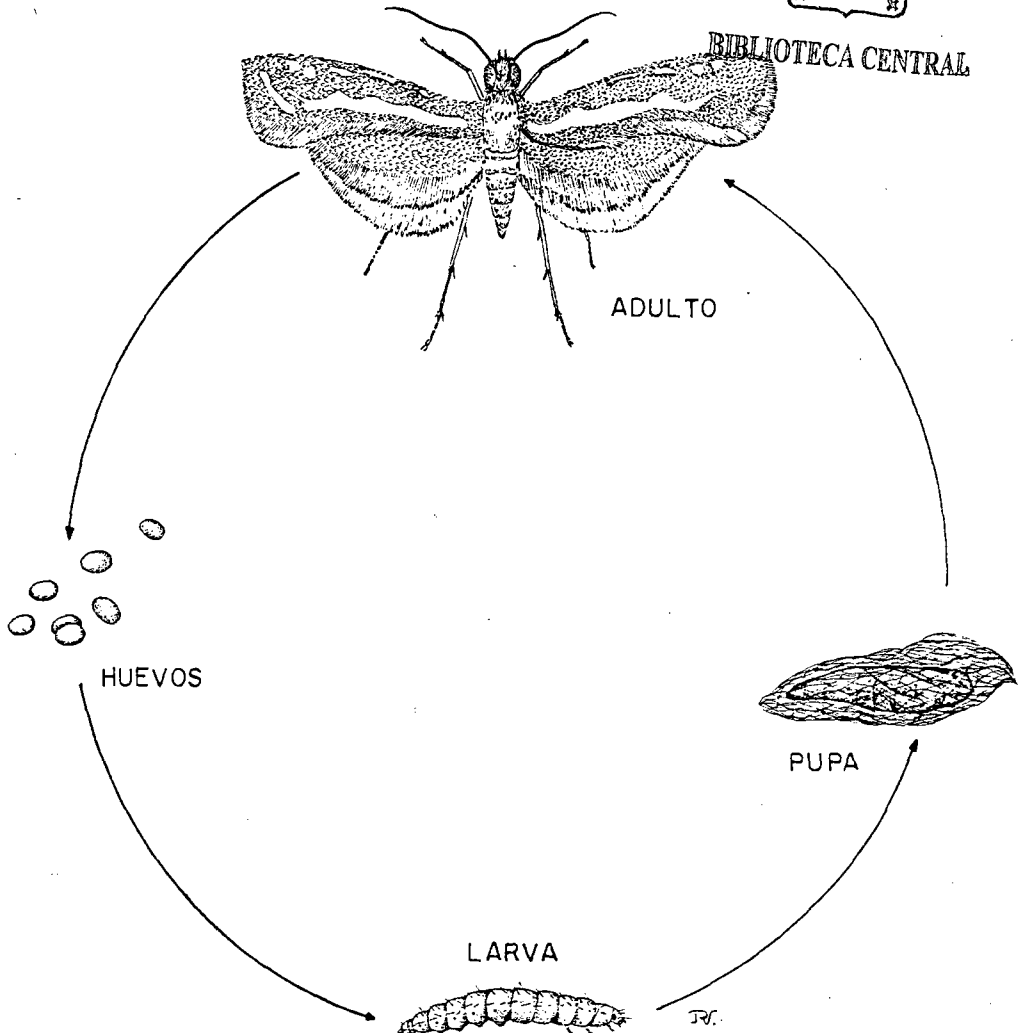


Figura 2. Ciclo biológico de la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* L.
Dibujo de Maria del Refugio Vázquez Velasco.

2.5. Técnicas de tinción.

El proceso de teñido es la reacción química que se realiza entre un material a teñir y una sustancia con color (Rasilla *et al.*, 1998). Para favorecer la unión de los colorantes al material se emplean diferentes sustancias de unión (mordientes). Los mordientes que se aplican actualmente son de origen químico como: sales de alumbre, cremor tártaro, carbonato potásico, cloruro sódico, ácido oxálico, ácido acético y amoniaco (Van de Vrande, 1988).

Son diversas las técnicas que se emplean para teñir un gran número de materiales, por ejemplo fibras textiles, artesanías, alimentos, medicamentos, tejidos, células, cromosomas, entre otros. Sin embargo, no existe literatura suficiente que muestre alguna técnica de tinción para plagas; Contreras (1998) señaló que el colorante sintético llamado floxina B al ser ingerido posee características fototóxicas que son prometedoras para el control de adultos y larvas de la conchuela del frijol, *Epilachna varivestis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae).

En 1996 se sometió a consideración un proyecto llamado FIN-D-BUG[®], donde implicó un proceso de teñido que permitiera detectar las pupas de la palomilla dorso de diamante, dicho proceso fue diseñado para hacerlas visibles, para el tratamiento no se utilizó sustancias nocivas al cuerpo humano, metales pesados, iones tóxicos, sustancias sintéticas (anilinas o plumbaginas), además cumplió con los estándares de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), sin embargo, en México este proyecto no se llevó a la práctica debido a que implicó una alta manipulación del producto y un elevado costo (Bujanos, 1997 comunicación personal²).

2.6. La cochinilla.

MacGregor (1976) señaló que la cochinilla fina es la más importante, ya que ha sido y es utilizada como fuente de colorante. La hembra es la que se utiliza para extraer el colorante, su cuerpo es de forma oval de color rojizo y está cubierto con una cera a manera de talco que se desprende con facilidad (Portillo y Viguera, 1997).

² Bujanos M., R. 1997. Investigador del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología de Querétaro.

Piña (1977) describió la clasificación de la cochinilla fina propuesta por Costa en 1835, nombre que ha prevalecido según Comstock (1972): *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae).

De Lotto (1974), Marín y Cisneros (1977), Portilló (1993), Condeña (1997) y Espinoza (1998), describieron la biología de la cochinilla, así como la importancia que tiene su cultivo y utilización.

2.7. Descripción y aplicaciones del colorante de la cochinilla.

Los cuerpos secos de las hembras son utilizados como materia prima para la preparación del pigmento, su principio colorante es el ácido carmínico, aislado por primera vez en estado de pureza por Warren de la Rue en 1847 (Randich, 1975).

2.7.1. Cochinilla seca.

Se forma con los cuerpos secos, casi sin cera, y libres de materiales extraños, su calidad varía, ya que depende de la humedad, cenizas, impurezas y del contenido de ácido carmínico que no debe ser menor del 10%. Su principal aplicación es la tinción de artesanías, cerámica, tejidos de lana y otros (Avila y Remond, 1986).

2.7.2. Extracto de cochinilla.

Es una solución concentrada que se obtiene después de que se elimina el alcohol de un extracto acuoso alcohólico, es de color rojo, su pH es ácido (5.0 - 5.5) y su contenido de ácido carmínico no menor de 18%. Se emplea para teñir ciertos medicamentos, productos cárnicos, lácteos, vegetales, especias, mermeladas, confitería, helados y bebidas alcohólicas y no alcohólicas (Avila y Remond, 1986; Hernandez, 1998).

2.7.3. Acido carmínico.

Debido a lo costoso de su extracción su uso es más específico, a diferencia del extracto de cochinilla y el carmín. En estado puro su estructura química es una hidroxiantraquinona $C_{22}H_{20}O_{13}$. En medicina se emplea en tinciones bacteriológicas e histológicas y en la elaboración de sustancias rastreadoras; también se usa como

indicador químico de reacciones ácido base, de óxido reducción y como acomplejante de cationes; así como en la fotografía a color y en la fabricación de pigmentos para artistas (Hernández, 1998).

2.7.4. Carmin.

Es una laca aluminio-cálcica del ácido carmínico que se obtiene por extracción acuosa, en un sustrato de hidróxido de aluminio, con un contenido de ácido carmínico no menor del 50%. El carmin puede fabricarse de diferentes colores al variar la sal que se utilice para formar el complejo metálico del ácido carmínico. Se utiliza en la industria de alimentos como colorante en productos cárnicos, gelatinas, jaleas, postres, jarabes, caramelos, goma de mascar, confitería, bebidas, helados, yoghurt y frutas en conserva.

En la industria cosmética se aplica en los tubos labiales, cremas y polvos faciales.

El carmin tostado y el obtenido por segunda precipitación con carbonato de sodio se emplea en pinturas de acuarela (Avila y Remond, 1986).

3. HIPÓTESIS

Si el colorante obtenido de la cochinilla se emplea en la tinción de un gran número de materiales orgánicos, entonces podrá emplearse para teñir estados inmaduros (larvas y pupas) de la palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella* L.).

4. OBJETIVOS

GENERALES

1. Evaluar técnicas de tinción con pigmento de cochinilla para larvas y pupas de *Plutella xylostella* L.
2. Implementar una técnica de tinción de larvas y pupas de *Plutella xylostella*, para facilitar su detección en las pellas del brócoli durante el proceso de selección que se realiza antes del congelado.

PARTICULARES

1. Determinar el tiempo requerido para la tinción de larvas y pupas de *Plutella xylostella* con pigmento de cochinilla (extractos u otros derivados de este insecto).
2. Establecer la proporción del colorante para su aplicación en larvas y pupas de *Plutella xylostella*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio incluyó una parte de trabajo en campo, realizando colectas de larvas y pupas de *Plutella xylostella* L. para el establecimiento de la colonia, y otra parte en laboratorio que se realizó en el Departamento de Botánica y Zoología de la Universidad de Guadalajara, durante el período comprendido de enero a noviembre de 1998.

5.1. Descripción de la zona de colecta.

El material biológico de *Plutella xylostella* se colectó en cultivos de brócoli de la localidad de Toluquilla, en el municipio de Tlaquepaque, Jalisco. Esta localidad se ubica al centro oriente del estado de Jalisco, en las coordenadas 20° 36' 00" de latitud Norte y de los 103° 21' 68" de longitud Oeste a una altura de 1500 m. s. n. m; limita al Norte con Tonalá, Guadalajara y Zapopan, al Sur con el Salto y Tlajomulco, al Oriente con Tonalá y al Poniente con Tlajomulco (Anónimo, 1988).

5.2. Colecta del material biológico y establecimiento de la cría.

El establecimiento de la cría de *P. xylostella* se inició a principios de febrero de 1998, para lo cual se colectaron adultos, pupas y larvas de diferentes estadios en cultivos de brócoli y coliflor de la localidad de Toluquilla municipio de Tlaquepaque, Jalisco. Además se usaron larvas y pupas de *P. xylostella* del laboratorio de Biología de Entomófagos del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Texcoco, Edo. de México.

El material se mantuvo dentro de una cámara de cría provisional, donde se ajustaron las condiciones ambientales a una temperatura aproximada de 27 °C, una humedad de 90% y un fotoperíodo de 15:9 h luz:oscuridad.

Bautista *et al.* (1994) mencionaron que la palomilla dorso de diamante se puede criar tanto en dieta artificial como natural, en la presente investigación se consideró el empleo de una dieta natural, debido a dificultades en la manutención de la colonia con dietas artificiales. La dieta natural para larvas consistió en hojas de col, brócoli y/o coliflor frescas y lavadas con cloro al 1%, colocadas en cajas de petri con papel filtro

para evitar la acumulación de humedad. Las larvas de *P. xylostella* se colocaron en recipientes de plástico de 20.5 x 24 x 10.5 cm, estos recipientes tenían en su cubierta superior, una abertura rectangular de 6 x 15 cm sellada con tul para su ventilación. Las larvas se separaron por estadios (primer, segundo, tercer y cuarto).

A los adultos colectados en campo se les proporcionó agua en frascos pequeños con una mecha para facilitar su absorción y gotitas de miel dispersas en el recipiente o jaula donde estuvieron confinados, además también se colocaron hojas de col para que éstos colocaran sus huevecillos. Las palomillas se colocaron en botes de plástico transparente cerrados, con sólo un orificio al frente, donde se colocó una manga para facilitar su manejo, asimismo en jaulas entomológicas de madera de 21.5 x 22 x 20.5 cm, con tres de sus caras cubiertas con tela de organza.

Dentro de los botes y jaulas se colocaron hojas de col y de brócoli sobre cajas de petri, para que los adultos confinados a la reproducción empezaran a depositar sus huevecillos sobre éstas. Los huevecillos se distinguieron como puntos amarillos en toda la hoja y ocasionalmente en las paredes del bote de plástico o alrededor de la caja de petri donde se depositaron las hojas (Alatorre y Guzmán, 1994).

5.3. Bioensayos.

Para realizar los bioensayos se utilizaron larvas (tercer y cuarto estadio) y pupas de *P. xylostella*, no se incluyeron larvas de primer y segundo estadio en las pruebas por su fragilidad y dificultad de manejo. Para aplicar los tratamientos se utilizó el método de inmersión. Los tratamientos consistieron de la combinación de dos estadios de *P. xylostella* (larva y pupa), nueve tintes, dos proporciones de cada tinte (1:0 y 1:3 tinte: agua) y tres tiempos de inmersión (15, 30 y 60 minutos), es decir, 2X9X2X3 igual a 108 tratamientos, cada tratamiento tuvo tres repeticiones por lo que existieron 324 unidades experimentales. Una unidad experimental estuvo constituida por cuatro larvas o cuatro pupas, según el caso. Después de la aplicación de cada tratamiento se observó y registró la permanencia del pigmento sobre cada unidad experimental.

5.4. Preparación de los tintes.

Para preparar los colorantes de la cochinilla fueron seleccionadas algunas técnicas que se emplean en tinciones histológicas y que en su preparación utilizan carmín sintético y para este estudio se realizaron algunas modificaciones. Burck (1966) describieron carmalumbre, carmín de Rawitz, escarlata R y azocarmin. Xandri (s.f.) propuso carmín I, carmín II y carmín III. Hiscox y Hopkins (1990) establecieron la técnica para el rojo cochinilla. Así mismo, Portillo y Viguera (1997) describieron el extracto acuoso.

5.4.1. Carmalumbre.

La preparación de éste consistió en disolver 0.75 g de alumbre amoniacal en 250 ml de agua destilada, posteriormente se añadieron 0.50 g de carmín (carmín hidrosoluble al 50%), esta solución se hirvió por 15 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente para luego ser filtrada. Se añadieron 0.25 ml de formol para evitar enmohecimiento. Al final se obtuvieron 200 ml de este tinte.

5.4.2. Carmín de Rawitz.

La elaboración consistió en diluir 1 g de carmín (Laca al 65%) y 5 g de alumbre amoniacal en 370 ml de agua destilada; esta mezcla se dejó hervir por unos minutos y se enfrió a temperatura ambiente, después se añadieron 37.5 ml de glicerina; posteriormente se volvió a hervir y se dejó reposar por tres días, transcurrido este tiempo se filtró la solución, para obtener al final 400 ml de este tinte.

5.4.3. Escarlata R ó Sudán IV.

Este tinte se utiliza en la tinción de grasas, para prepararlo se pesaron 50 g de cochinilla seca ya pulverizada (en sustitución del pigmento artificial escarlata R), después se disolvieron hasta saturación en una mezcla de 100 ml de alcohol al 50% y 100 ml de acetona a temperatura ambiente. La solución se dejó reposar por unos minutos y posteriormente se filtró para su posterior uso. Se obtuvieron 200 ml de tinte.

5.4.4. Azocarmin.

Para su preparación se pesaron 0.20 g de cochinilla seca y molida (en sustitución de azocarmin G), después se disolvieron en 200 ml de agua destilada, posteriormente esta solución se calentó a 56°C y se dejó hervir por un lapso de 15 a 20 minutos, después se enfrió a temperatura ambiente y se filtró, a esta solución filtrada se le añadió 1 ml de ácido acético puro para evitar enmohecimiento. El total de tinte obtenido fue 200 ml.

5.4.5. Carmín I.

Se preparó en un vaso de precipitado una mezcla de 33.3 g de cochinilla pulverizada en un litro de agua destilada, después se dejó hervir durante 15 minutos, posteriormente se añadieron 4 g de cremor tártaro y se mantuvo hirviendo durante 10 minutos más, además se adicionaron 2 g de alumbre y se dejó hervir 2 minutos más.

La mezcla obtenida se vació en recipientes poco profundos y se dejó reposar un día, el carmin que se precipitó durante el reposo se lavó con agua caliente y se secó en la sombra. Al final se obtuvieron 8 g de carmin³.

5.4.6. Carmín II.

Para su preparación se colocaron en un vaso de precipitado 10 g de cochinilla pulverizada en 400 ml de agua destilada, se mezclaron y se sometieron a ebullición durante dos horas, después se adicionaron 0.9 g de nitrato de potasio, se continuó la ebullición durante 3 minutos, además se añadieron 1.2 g de oxalato ácido de potasio y se dejó hervir 10 minutos más. Se retiró del fuego para que reposara durante 15 minutos, posteriormente se cambió el líquido y se dejó reposar en recipientes planos durante 3 semanas, al cabo de ese tiempo se decantó el líquido cubierto de mohos, se lavó con agua el carmin que se precipitó y se secó a la sombra. Al final se obtuvieron 3 g de carmin.

³ Se diluyeron 2 g de cada uno de los carmines obtenidos en 200 ml de agua para su aplicación.

5.4.7. Carmín III.

Se preparó una solución de 10 g de cochinilla pulverizada en 400 ml de agua destilada con 0.14 g de carbonato sódico, después se sometió a ebullición durante 20 minutos, posteriormente se agregaron 0.48 g de alumbre y 0.08 g de crémor tártaro. Esta solución se dejó reposar el tiempo necesario para que la cochinilla se depositara en el fondo y después de 15 minutos se pasó el líquido rojo oscuro a través de un tamiz de seda, el tinte se mantuvo en reposo nuevamente hasta que se sedimentó la cochinilla y se repitió la misma operación. La cochinilla que se obtuvo sedimentada se dejó secar en recipientes planos. El total obtenido fue 2.5 g de carmín.

5.4.8. Rojo cochinilla.

Para su preparación se pesaron 10 g de cochinilla en polvo, 0.14 g de carbonato potásico, 0.08 g de cremor tártaro, 0.48 g de alumbre. Posteriormente, se disolvió el carbonato potásico en 400 ml de agua destilada y se agregó la cochinilla, después a los dos días de reposo se agregó el cremor y el alumbre y una vez terminada la efervescencia se filtró la mezcla. El residuo obtenido se lavó con agua caliente y después se agregó al líquido obtenido 60 ml de etanol al 96 %. Al final se obtuvieron 2 g de carmín.

5.4.9. Extracto acuoso.

Se prepararon 10 g de polvo con los cuerpos secos y limpios de las cochinillas, éste se mezcló en 100 ml de agua destilada durante 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se puso a hervir durante 15 minutos, después se filtró con un paño de algodón y se obtuvieron 95 ml de este extracto.

5.5. Determinación del contenido de ácido carmínico.

Una vez preparados cada uno de los tintes, se determinó el contenido de ácido carmínico (materia colorante) de cada uno mediante una técnica peruana modificada (Vigueras, 1998), y consistió en lo siguiente: Se obtuvo una muestra (0.025 g) de la

cochinilla previamente molida, la cual se empleó en la preparación de cada tinte de acuerdo a las técnicas establecidas, la muestra se transfirió a un tubo de ensaye con 75 ml de HCl 2N. La solución se mezcló y se calentó a baño maría por 30 minutos. después se dejó enfriar a temperatura ambiente y se vertió a un matraz de 250 ml para aforar con agua desionizada y luego filtrar. Se desecharon los primeros 50 ml y se tomó una alícuota de 25 ml, para la lectura de la muestra se empleó el espectrofotómetro a 494 nm. El contenido de ácido carmínico se expresó en porcentaje y se obtuvo al aplicar la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de ácido carmínico} = \frac{A}{1.39} \times 100$$

A = absorbancia de la muestra.

1.39 = absorbancia del ácido carmínico al 100%.

5.6. Criterio de tinción para larvas y pupas.

Se consideró larva teñida aquella que presentó en su superficie tinte adherido y con coloración rojiza. Las pupas que se consideraron como teñidas. fueron aquellas que presentaron su capullo teñido de color rojo intenso o tenue.

5.7. Pruebas preliminares en brócoli.

Se observó que pigmentación presentaban las pellas de brócoli expuestas a cada uno de los tintes mediante inmersión, las pellas se cortaron en cada uno de sus floretes (cabezas florales) y se tomaron de tres a cuatro floretes para cada unidad experimental sin repeticiones. Los tiempos de inmersión fueron 15 y 30 minutos. se utilizaron las siguientes proporciones: 1:0, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 y 1:7 tinte: agua.

5.8. Análisis estadístico.

Para el análisis de los datos se emplearon pruebas no paramétricas, ya que los datos que se obtuvieron fueron de tipo cualitativo. Debido a esto se empleó un análisis de varianza por rangos de Kruskal-Wallis y la prueba U de Mann-Witney (Daniel,

1997). Estas pruebas de la estadística no paramétrica tratan de probar si los valores observados experimentalmente están de acuerdo con los valores esperados (Reyes, 1990).

;

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Evaluación de los tratamientos sobre larvas de *P. xylostella*

Al aplicar la prueba de Kruskal Wallis y U de Mann Witney a las variables tintes, proporción y tiempo, se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$). Sólo algunas larvas que permanecieron inmersas durante 60 minutos en los tintes carmín II (6) y rojo cochinilla (8) en cualquiera de las proporciones, lograron teñirse de manera tenue (Figura 3), en el cuadro 3 se muestra el número de larvas teñidas. Ninguna otra combinación de variables (tintes, proporciones y tiempos de inmersión) logró que los tintes se adhirieran a la cutícula de las larvas (Figura 4).

Cuadro 3. Larvas teñidas con los nueve tintes durante 60 minutos.

Tinte	Larvas	
	Proporción 1:0	(agua: tinte) 1:3
1. Carmalumbre	0	0
2. Carmín de Rawitz	0	0
3. Escarlata R	0	0
4. Azocarmin	0	0
5. Carmín I	0	0
6. Carmín II	12	12
7. Carmín III	0	0
8. Rojo cochinilla	24	24
9. Extracto acuoso	0	0

Se emplearon 36 larvas para cada tratamiento.



Figura 3. Larvas teñidas con los tintes a) carmín II y b) rojo cochinilla.

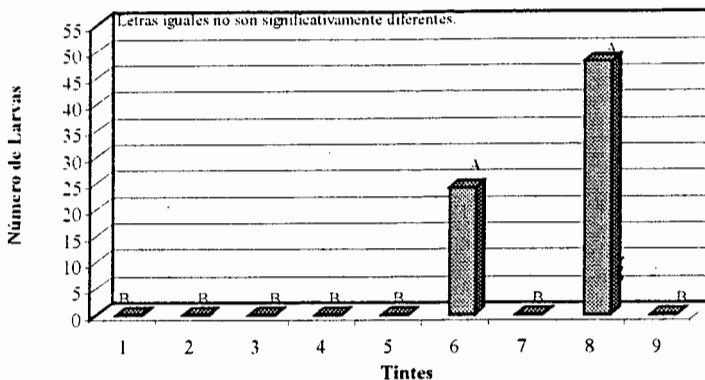


Figura 4. Número de larvas teñidas con cada una de los tintes elaborados con pigmento de cochinilla.

Quizás se debió a que la mayoría de los organismos están cubiertos de complejas mezclas de componentes cuticulares en estado vivo; Buckner (1993) mencionó que las larvas presentan una epicutícula que contiene lípidos cuticulares en cantidades de hasta un 82% o más. Así mismo, Prado y Valdez (1990) asentaron que estos lípidos cuticulares se mezclan con otros compuestos como hidrocarburos saturados e insaturados, ésteres cerosos, alcoholes, aldehídos, acetonas y ácidos grasos, que otorgan mayor complejidad a su cutícula, y que actúa como barrera de protección al agua y a otras sustancias. La cera de la superficie del cuerpo de la larva tiende a asegurar un microambiente óptimo en su cuerpo, controla la temperatura y humedad, y además proporciona protección contra medios de estrés causado por plaguicidas, contaminación (Zapata, 1970; Bursell, 1974; Buckner, 1993) y posiblemente a los colorantes que se emplearon en este trabajo, ya que no permitió la adhesión del tinte en la superficie de la larva.

Los análisis realizados para las variables proporción y tiempo, fueron también diferentes significativamente ($P < 0.05$) en los tintes carmín I y rojo cochinilla. La proporción 1:0 (tinte: agua) fue mejor que 1:3 (tinte: agua). Respecto al tiempo en que permanecieron inmersas las larvas en el tinte, se observó que fueron necesarios 60

minutos para pigmentarlas. Los tiempos de 15 y 30 minutos no resultaron idóneos para el teñido de éstas (Figura 5).

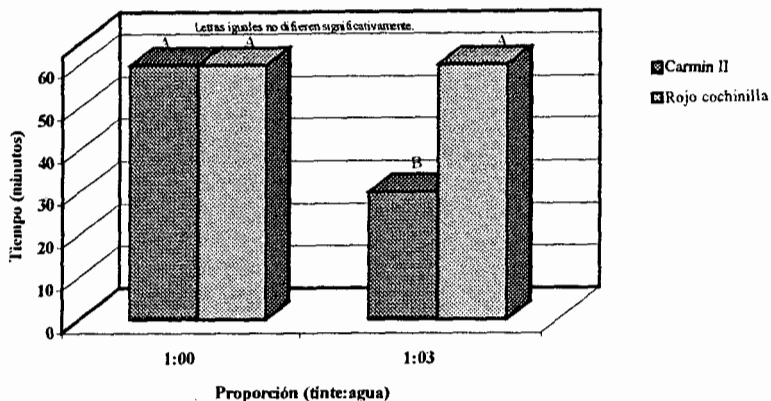


Figura 5. Resultados obtenidos de acuerdo al tiempo con las proporciones y tintes empleados.

6.2. Evaluación de los tratamientos sobre pupas de *P. xylostella*.

Al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis a las variables tintes, proporción y tiempo, se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$). Los tintes denominados carmalumbre (1), carmín de Rawitz (2), escarlata R (3), azocarmín (4), carmín I (5), carmín II (6), carmín III (7) y rojo cochinilla (8), fueron las que mejor tiñeron a las pupas (Figura 6). El tinte extracto acuoso mostró ser menos eficiente para teñir pupas (Figura 7).

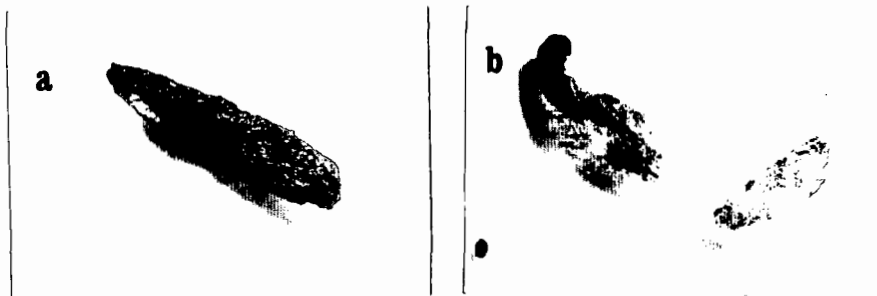


Figura 6. Pupas teñidas con cualquiera de los siguientes tintes a) carmalumbre, carmín de Rawitz y rojo cochinilla. b) escarlata R, azocarmin, carmín I, carmín II y carmín III.

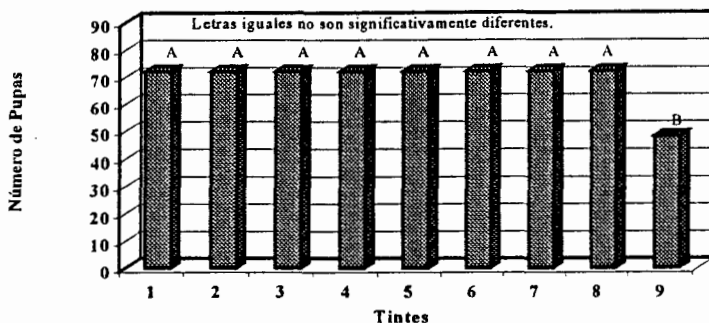


Figura 7. Número de pupas teñidas con cada una de las tintes elaborados con pigmento de cochinilla.

Respecto al tiempo se requiere de 30 minutos para teñir mejor las pupas con el tinte extracto acuoso (9) que con 15 minutos (Figura 8). Las proporciones 1:0 y 1:3 (tinte:agua) son iguales, al observarse que ambas lograron teñir las pupas en cada una de los nueve tintes empleados, sin embargo, presentaron diferencias en cuanto a la intensidad del color fijado, esto al parecer es lógico, ya que una proporción con mayor contenido de tinte (1:0 tinte:agua) pigmenta más, a diferencia de la otra que fue

mezclada con agua (1:3 tinte:agua). Con base a estos resultados y desde el punto de vista económico es más recomendable utilizar la proporción 1:3 (tinte:agua) en los mejores tintes.

Los resultados antes mencionados, indican que posiblemente el pigmento de la cochinilla por ser un colorante que tiñe fibras naturales (animales y vegetales) y la pupa por estar cubierta por una fibra animal (seda) tuvo mayor afinidad al colorante (Van de Vrande, 1988; Ross, 1990; Stralen, 1990). La composición de la seda presenta una serie de cadenas de moléculas proteínicas unidas unas a otras por puentes salinos, hidrogenados y sulfurados, el rompimiento de esta cohesión por parte de compuestos llamados mordientes, debieron permitir el teñido de la fibra (Tlapanochestli, s.f.). Estas reacciones al parecer ocurren al utilizar agua, sales metálicas y ácidos o bases (Van de Vrande, 1988), y algunos de estos reactivos fueron empleados en la preparación de los tintes como alumbre, nitrato de potasio y oxalato ácido de potasio, quizás esto contribuyó a que el pigmento tiñera las pupas de manera rápida y fácil. Además se tiene comprobado que los reactivos antes mencionados son utilizados como mordientes para fijar el pigmento en muchas otras fibras naturales.

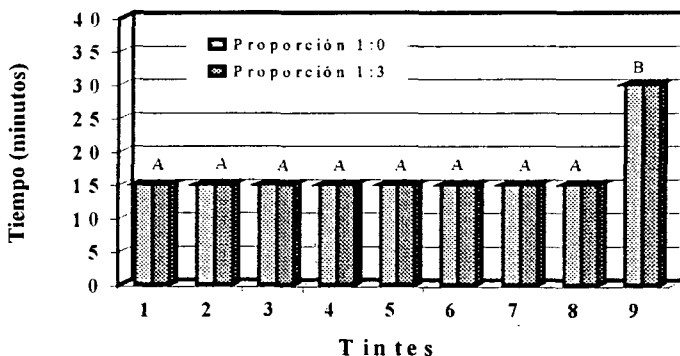


Figura 8. Resultados obtenidos de acuerdo al tiempo con las proporciones y tintes empleados.

6.3. Determinación del contenido de ácido carmínico de cada tinte.

Los resultados obtenidos respecto a la determinación del porcentaje de ácido carmínico en cada tinte se muestran en el cuadro 3.

Se observó que estos contenidos aparentemente no influyeron en la tinción de larvas y pupas del insecto en estudio; ya que el tinte denominado carmin III con un contenido de 64.38% tiñó de manera similar al tinte escarlata R con 12.08%; ya que se hubiera esperado que el carmin III debió haber teñido con mayor intensidad que el escarlata R.

Cuadro 4. Determinación del contenido de ácido carmínico en los nueve tintes.

Tinte	Absorbancia	Acido carmínico (%)
1. Carmalumbre	0.404	29.06
2. Carmin de Rawitz	0.502	36.11
3. Escarlata R	0.168	12.08
4. Azocarmin	0.186	13.38
5. Carmin I	0.517	37.19
6. Carmin II	0.815	58.63
7. Carmin III	0.895	64.38
8. Rojo cochinilla	0.762	54.82
9. Extracto acuoso	0.375	26.97

6.4. Resultados para las pruebas preliminares en brócoli.

En las pruebas preliminares, se observó el efecto de tinción en los floretes del brócoli en función de los tintes, proporción y tiempo.

Estas pruebas arrojaron que sólo se tiñeron los bordes de los tallos donde se realizaron los cortes y no fue de manera uniforme, porque dependió del tinte, proporción y tiempo empleados como puede observarse en el cuadro 5.

Cuadro 5: Tinción de los bordes de los tallos de brócoli con los nueve tintes en seis proporciones. BIBLIOTECA CENTRAL

Tinte	Proporciones (tinte: agua)					
	1:0	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7
1. Carmalumbre	A	A	A	B	B	B
2. Carmin de Rawitz	A	A	A	B	B	B
3. Escarlata R	B	B	B	C	C	C
4. Azocarmin	B	B	B	C	C	C
5. Carmin I	B	B	B	C	C	C
6. Carmin II	B	B	B	C	C	C
7. Carmin III	B	B	B	C	C	C
8. Rojo cochinilla	A	A	A	B	B	B
9. Extracto acuoso	A	A	A	B	B	B

Simbología: A= intenso B= regular C= tenue

Estos resultados son favorables para la presente investigación, ya que cuando hay tinción, sólo afecta los bordes de los tallos en donde se realizan los cortes de los floretes, no tiñen otra parte del vegetal porque su superficie es cerosa e impide la penetración del tinte.

Cuando el borde del florete es teñido de manera intensa o regular, se necesitara realizar únicamente un corte delgado de la parte afectada para su posterior tratamiento o comercialización.



Figura 9. Floretes de brócoli teñidos con azocarmin, carmin I, carmin II y carmin III.



Figura 10. Floretes de brócoli teñidos con carmín de Rawitz, carmalumbre y rojo cochinilla

7. CONCLUSIONES

Con base en la investigación realizada, se puede concluir lo siguiente:

1. El pigmento de la cochinilla puede ser utilizado en la tinción de larvas y pupas de *Plutella xylostella* L. en las pellas del brócoli.
2. Los mejores tintes para larvas de la palomilla dorso de diamante fueron carmín II y rojo cochinilla, con la proporción 1:0 (tinte: agua) durante 60 minutos.
3. Para la tinción de pupas, los tintes carmalumbre, carmín de Rawitz, escarlata R, azocarmín, carmín I, carmín II, carmín III y rojo cochinilla, tiñeron el número total de pupas empleadas en cada unidad experimental, con la proporción 1:0 y 1:3 (tinte: agua), en cualquiera de los tiempos de inmersión: 15, 30 ó 60 minutos.
4. Al aplicar los tintes en los floretes del brócoli, sólo se observó que estos pueden teñir los bordes de los tallos que quedan expuestos por la realización de los cortes. Los tiempos de inmersión no influyeron en la tinción de los bordes, pero sí la proporción del tinte. Con las proporciones 1:0, 1:3 y 1:4 (tinte: agua), se logró teñir con mayor intensidad a los bordes de los tallos, en comparación con las proporciones 1:5, 1:6 y 1:7 (tinte: agua), que tiñeron en menor intensidad.

8. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios sobre otras técnicas de tinción que permitan teñir las larvas de manera eficiente y en un menor tiempo.
2. Realizar investigaciones que analicen el pigmento de la cochinilla sobre el brócoli.
3. Se requiere evaluar la permanencia del tinte en otras plagas de las crucíferas que presentan el problema de “presencia contaminante”, como el pulgón verde de la col; estados inmaduros (larvas y pupas) de otros lepidópteros como el gusano de la col y falso medidor.

9. LITERATURA CITADA

- Andrews, K. L. 1984. *Plutella*: Su reconocimiento y control. In: **Proyecto manejo integrado de plagas en Honduras**. Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano, Honduras. pp. 37-38.
- Anónimo. 1988. **Los municipios de Jalisco**. Secretaría de Gobernación y Gobierno del Estado de Jalisco. Colección Enciclopédica de los Municipios de México.
- Alatorre R. R., Lara, R. J. y A. Dominguez B. 1992. Manejo microbiano de lepidópteros, plagas asociados al cultivo de crucíferas. In: **Manejo Fitosanitario de las Hortalizas en México**. Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Estado de México. pp.249-252.
- Alatorre R., R. y A. Guzman F. 1994. Cría de lepidópteros defoliadores de crucíferas. In: Bautista, M. N., Vejar, C. G. y J. L. Carrillo. (ed.). **Técnicas para la cría de insectos**. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. pp. 70-72.
- Avila, R. y Z. Remond. 1986. **Estudio técnico, carmín de cochinilla**. Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y de Normas Técnicas. Lima, Perú.
- Bailey, H. L. 1924. **Manual of cultivated plants**. Ed. Macmillan. Estados Unidos de América. Nueva York.
- Bautista, M. N., Vejar, C. G. y J. L. Carrillo S. 1994. **Técnicas para la cría de insectos**. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- Buckner, S. J. 1993. Cuticular polar lipids of insects. In: Stanley-Samuelson, W. D. y Nelson. R. D (eds). **Insect lipids, Chemistry, Biochemistry and Biology**. University of Nebraska Press. United States of America. Lincoln. pp. 227-261.
- Bujanos, M. R., A. Marín J., F. Galván C. y K. F. Byerly M. 1993. Manejo integrado de la palomilla dorso de diamante

- Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) en el Bajío, México. **Publicaciones especiales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias**. Comité Técnico de la Asociación de Procesadores y Exportadores de Frutas y Vegetales en General. Celaya, Guanajuato, México. (4): 1-36.
- Bujanos, M. R. y A. Marín J. 1996. Plagas de los cultivos de crucíferas en el Bajío, México. **Publicaciones especiales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias**. Centro de Investigación Regional del Centro (INIFAP). Campo Experimental Bajío. Celaya, Guanajuato, México. (2): 1-34.
- Bujanos, M. R. y A. Marín J. 1997. Enemigos naturales de plagas de las crucíferas en el contexto del manejo integrado de plagas. **Publicaciones especiales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias**. Centro de Investigación Regional del Centro. Campo Experimental del Bajío. Celaya, Guanajuato, México. (1): 1-37.
- Burck, H. C. 1966. **Técnica histológica: Manual para realizar preparaciones microscópicas en el laboratorio**. Ed. Montalvo.
- Bursell, E. 1974. **Introducción a la fisiología de los insectos**. Alhambra, Madrid, España.
- Chelliah, S. y K. Srinivasan. 1986. Bioecology and management diamondback moth in India. *In: Proceedings of the first International Workshop: Diamondback moth management*. Asian Vegetable Research and Development Center. Tainan, Taiwan. pp.63-76.
- Carrillo S., J. L. 1966. **Lista de insectos en la colección entomológica del INIA**. México. D. F. 29 (supl 1.): 10- 24.
- Comstock, J. 1972. **An introduction to entomology**. Publishing Associates, Estados Unidos de América.
- Condeña, A., F. 1997. **Manejo integral de la tuna y cochinilla para los valles interandinos de la sierra peruana**. Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga. Ayacucho, Perú.

- Contreras C., S. E. 1998. Efectividad biológica de la floxina B contra la conchuela del frijol *Epilachna varivestis* Mulsant. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- Corsia, P. 1972. **Flora Universal**. Tomo 5. Historia Natural Destino. Barcelona, España.
- Daniel, W. W. 1997. **Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud**. Ed. Limusa. México, D. F.
- De Lotto, G. 1974. On the status and identity of the cochineal insects (Homoptera: Coccoidea: Dactylopiidae). **Journal Entomology Society**. South Africa. 37 (1): 167-193.
- De Viedma, M. G., Baragaño, J. R. y A. Notario. 1985. **Introducción a la entomología**. Edit. Alhambra. España.
- Edmond, J. B., T. L. Senn y F. S. Andrews. 1984. **Principios de Horticultura**. CECSA. México, D. F.
- Espinoza M. E. 1998. **Manual de Producción: Tuna y Cochinilla**. Pacífico. Lima, Perú.
- Fragoso, G. R. y A. Luisier. 1972. Botánica. Vol. III. **Historia Natural**. Instituto Gallach. De Librería y Ediciones, S. L. Mallorca. Barcelona, España.
- Garza, O. S. 1992. Manejo postcosecha de hortalizas de hoja, raíz y tallo. *In*: Elhadi M. J. e I. Higuera. (ed.). **Fisiología y tecnología postcosecha de productos hortícolas**. Limusa. México, D. F. pp. 229-232.
- Gordon, H. R. y Barden, A. J. 1984. **Horticultura**. Ed. AGT. México, D. F.
- Hernández, A. O. R. 1998. Aprovechamiento de la grana cochinilla del nopal (*Dactylopius coccus* Costa). Tesis Profesional. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas. México, D. F.
- Higuera C, I. 1992. Exportación de productos hortofrutícolas mexicanos. *In*: Elhadi M. J. e I. Higuera. (ed.). **Fisiología y tecnología postcosecha de productos hortícolas**. Limusa. México, D. F. pp. 273-287.
- Hiscox, G. D. y A. A. Hopkins. 1990. **Recetarios Industriales y fórmulas domésticas**. Ed. Gustavo Gili. Tomo II. Barcelona, España.

- Hume W. G. *et. al.* 1972. **Producción comercial de coliflores, coles de Bruselas y otros cultivos afines.** Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Laborde, J. A. 1992. Palomilla dorso de diamante en el Bajío, control mediante un programa integral regional. *In: Manejo fitosanitario de las hortalizas en México.* Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. pp. 245-247.
- Lacedelli, C. J. y J. Elizarraras V. 1994. Ocho años de experiencia profesional en el cultivo y producción de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica* Plenck) en la región del Bajío. Tesis Profesional. Universidad de Guanajuato. Escuela de Agronomía y Zootecnia. Irapuato, Guanajuato.
- Lim, G. S. 1986. Biological control of diamondback moth. *In: Proceedings of the First International Workshop: Diamondback moth management.* Asian Vegetable Research and Development Center. Tainan, Taiwan. pp. 156-167.
- MacGregor L. R. 1976. La grana o cochinilla del nopal usada como colorante desde el México antiguo hasta nuestros días. **Revista de Cactáceas y Suculentas Mexicanas.** 21 (4): 93-99.
- Marín, R. y F. Cisneros V. 1977. Biología y morfología de la cochinilla del carmín, *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae). **Revista Peruana de Entomología.** 20(1): 115-120.
- Martínez C., A.M. 1996. Parasitoides de la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) en dos localidades hortícolas del estado de Querétaro. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo. Texcoco, Estado de México.
- McCully, J. E. y M. D. Salas. 1992. Seasonal variation populations of the principal insects causing contamination in processing broccoli and cauliflower in Central Mexico. *In: Proceedings of the second International Workshop: Diamondback moth management.* Asian Vegetable Research and Development Center. Tainan, Taiwan. pp.51-63.

- Metcalf, C. L. y W. P. Flint. 1965. **Insectos Destructivos e Insectos Útiles**. CECSA. México, D. F.
- Moriuti, S. 1986. Taxonomic notes of diamondback moth. *In: Proceedings of the First International Workshop: Diamondback moth*. Asian Vegetable Research and Development Center. Tainan, Taiwan. pp. 83-88.
- Pacheco M., F. 1985. **Plagas de los cultivos agrícolas en Sonora y Baja California**. Ed. SARH. Ciudad Obregón, Sonora, México.
- Pelayo Z, C. 1992. Panorama de los problemas postcosecha de productos hortícolas en México. *In: Elhadi M. J. e I. Higuera. (ed.). Fisiología y tecnología postcosecha de productos hortícolas*. Limusa. México. pp. 17-25.
- Piña L., I. 1977. **La grana o cochinilla del nopal**. Monografías LANFI. México, D. F.
- Portillo M., L. 1993. Nota sobre la cochinilla cultivada y silvestre. *Nakari*. 4 (1): 9-10.
- Portillo M., L. y A. L. Viguera G. 1994. Propagación de *cochinilla* (*Dactylopius coccus* Costa) (Homoptera: Dactylopiidae), bajo cuatro tratamientos de infestación del método Ricci. *In: XXIX Congreso Nacional de Entomología*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León, México. pp. 74-75.
- Portillo M., L. y A. L. Viguera G. 1997. Utilización de *Opuntia jaliscana* Bravo para el cultivo de la cochinilla del carmín. *In: Resúmenes del I Congreso Nacional sobre Cactáceas*. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. pp.49-50.
- Prado B., E. y J. Valdez C. 1990. **Morfología de insectos**. Colegio de Postgraduados. Centro de Entomología y Acarología. Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- Randich S., J. 1975. Ensayo tecnológico para la obtención de extracto de cochinilla en polvo. Tesis de Ingeniería. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.

- Rasilla C., M. F., D. Arrazola y J. L., V. Mayorga. 1998. Química en el color natural y teñido. *In: Memorias del Primer Congreso Internacional de Grana Cochinilla y Colorantes Naturales*. Oaxaca, México. pp. 73-75.
- Reyes C., P. 1990. **Bioestadística aplicada**. Ed. Trillas. México. D. F.
- Rivera V. M., M. D. Salas, E. Salazar y B. Mendoza. 1989. Tasas de supervivencia y reproducción de la Palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) en crucíferas. *In: Resúmenes del XXIV Congreso Nacional de Entomología*. Sociedad Mexicana de Entomología. Oaxtepec, Morelos. pp. 151.
- Ross, N. G. 1990. Cochineal the bug in the rug. pp. 6-9. *In: Dyes from nature. Plants and Gardens*. Brooklyn Botanic Garden Record. Brooklyn, Nueva York.
- Rueda, A. A., y A. M. Shelton. 1996. Palomilla dorso de diamante (DDM). Cornell Institute for food, agriculture and development. *In: <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/hortcrops/spanish/dbm.html>*
- Rzedowski, J. 1994. **Vegetación de México**. Limusa. México. D. F.
- Rzedowski, J. y Rzedowski, G. C. 1979. **Flora fanerogámica del Valle de México**. Limusa. México. D. F.
- Salas-Araiza M. D., H. Bravo-Mojica, J. E. McCully, R. Alatorre-Rosas, E. Salazar-Solis. 1993. Dinámica poblacional de lepidópteros herbívoros de crucíferas en el Bajío, México. **Folia Entomológica Mexicana**. (88): 69-78.
- Salas-Araiza M. D. y Salazar-Solis E. 1998. Parasitismo natural de lepidópteros plagas en el Bajío, México. **Manejo integrado de plagas**, (50): 34 – 41.
- Schauenberg P. 1978. **Gran enciclopedia de la vida animal**. Tomo III. Ed. ASURI. Bilbao, España.
- Stralen, V. T. 1990. Using cochineal and indigo in dye combinations. pp. 57-59. *In: Dyes from nature: Plants and Gardens*. Brooklyn Botanic Garden Record. Brooklyn, Nueva York.
- Talekar, N. S., S. T. Lee y S. W. Huang. 1986. Intercropping and modification of irrigation method for the control of diamondback moth. *In:*

Diamondback moth and other crucifers pest: Proceedings of the First International Workshop. Asian Vegetable Research and Development Center. Tainan, Taiwan. pp. 141-151.

- Talekar, N. S. y A. M. Shelton. 1993. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annals Review Entomology*. (38): 275-301.
- Tiscornia, J. R. 1975. **Hortalizas de hojas**. Ed. Albatros. Buenos Aires, Argentina.
- Tlapanochestli. s.f. **Instructivo para teñir con grana cochinilla**. Ed. Tlapanochestli y Carmin Internacional. Oaxaca, Oaxaca. México.
- Valadez, L. A. 1989. **Producción de hortalizas**. Limusa. México. D. F.
- Van de Vrande, L. 1988. **Teñido artesanal**. Enciclopedia ceac de las artesanías. Barcelona, España.
- Vigueras, G. A. L. 1998. Producción de cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) y condiciones de extracción del pigmento. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México.
- Xandri, J. M. s. f. **Elaboración de aguardientes simples y compuestos y Licores**. Ed. Salvat.
- Zapata, M. 1970. **Entomología general**. Universidad Nacional Agraria. Lima, Perú.