

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias



"RELACIÓN DEL APARATO REPRODUCTOR
FEMENINO DE *Dactylopius coccus* COSTA (HEMIPTERA:
DACTILOPIIDAE) EN LA SÍNTESIS DE ÁCIDO CARMÍNICO"

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA
P R E S E N T A
DANIEL CORTÉS JIMÉNEZ

GUADALAJARA, JAL., AGOSTO DE 2004



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

C. DANIEL CORTÉS JIMÉNEZ
PRESENTE.

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **Tesis** con el título: "Relación del aparato reproductor femenino de *Dactylopius coccus costa* (Hemiptera: Dactylopiidae) en la síntesis de ácido carmínico", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **ANA LILIA VIGUERAS GUZMÁN** y como asesor/a el/la **LIBERATO PORTILLO MARTÍNEZ**.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan, Jal., 10 de marzo del 2004



DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Leticia Hernández López
M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. ANA LILIA VIGUERAS GUZMÁN.-Director del Trabajo
c.c.p. LIBERATO PORTILLO MARTÍNEZ.-Asesor del Trabajo
c.c.p. Archivo

MERL/LHL/mam

C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
 PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION
 DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
 DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
 PRESENTE.

Por medio de la presente nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Titulación
 modalidad TESIS E INFORMES
 opción TESIS con el título:
"Relación del aparato reproductor femenino de Dactylopius coccus
Costa (HEMIPTERA: DACTYLOPIIDAE) en la síntesis del ácido carmínico"
 que realizó el (la) pasante: DANIEL CORTES JIMENEZ con número de
 código 395048803 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a
 su consideración el escrito final para autorización de impresión y, en su caso, programación de fecha de examen
 respectivo.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos
 la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
 Las Agujas, Zapopan, Jal., a 24 de agosto



EL DIRECTOR DEL TRABAJO

EL ASESOR

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
 LICENCIADO EN BIOLOGÍA

ANA LILIA VIQUEZAS GUZMÁN
 NOMBRE Y FIRMA

Liberato Portillo Martínez
 NOMBRE Y FIRMA

SINODALES

- 1.- Teresa de Jesús Acero Esquivel
 NOMBRE COMPLETO
- 2.- Jose Luis Navarrete Heredia
 NOMBRE COMPLETO
- 3.- Gustavo Moya Raygoza
 NOMBRE COMPLETO
- 4.- Liberato Portillo Martínez
 NOMBRE COMPLETO

FIRMA

 FIRMA

 FIRMA

 FIRMA

"No soy un hombre que sabe. He sido un hombre que busca y lo soy aún, pero no busco ya en las estrellas ni en los libros; comienzo a escuchar las enseñanzas que mi sangre murmura en mí."

Hermann Hesse
Demían

"El día terminaba; la atmósfera oscura de la noche invitaba a descansar de sus fatigas a los seres animados que existen sobre la tierra, y yo solo me preparaba a sostener los combates del camino y de las cosas dignas de compasión, que mi memoria trazará sin equivocarse. ¡Oh Musas!, ¡Oh alto ingenio!, venid en mi ayuda: ¡Oh mente, que escribiste lo que vi!, ahora aparecerá tu nobleza."

Dante Alighieri
La divina comedia

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A Dios, por los tropiezos y las lecciones aprendidas que me han forjado esta visión de la vida y me han convertido en lo que soy.

A mi familia, origen de la estabilidad y serenidad que son tan importantes en mi vida. Fuente de orgullo y bienestar emocional. Gracias por el apoyo, la confianza, la fe y sobretodo por siempre tratar de ver proyectado en mí lo mejor de sus deseos.

A Ana Lilia y Liberato, quienes han sido mis maestros en toda la extensión de la palabra. Gracias por la paciencia, el esfuerzo, la constancia, los gratos momentos y sobretodo por compartir conmigo su visión de la ciencia. Los admiro profundamente.

A Oscar, por todo lo que he aprendido de mi mismo a tu lado. Gracias por la complicidad, las risas, las aventuras y por tu invariable convicción en mi potencial, mostrándote siempre presto a hacerme ver lo bueno y malo en toda ocasión. Espero contar siempre con tu vivacidad.

A Claudia, Luis, Cesar, Iskra, Nora, Fabiola y Nubia, amigos imprescindibles en todo momento. Gracias por todo lo que compartimos y por todo lo que influyeron en mi vida. Su grato recuerdo me acompañará por el resto de mi existencia.

Y a todas aquellas personas que no menciono, que han influido de alguna manera en mi formación, tanto personal como profesional, y que llevo siempre conmigo, con especial gratitud y cariño: Gracias.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología, correspondiente al Departamento de Botánica y Zoología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, como parte del Proyecto de Cría de Grana Cochinilla a cargo del M. en C. Liberato Portillo Martínez y de la M. en C. Ana Lilia Viguera Guzmán.

CONTENIDO

	Pag.
ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE CUADROS.....	III
RESUMEN.....	IV
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Antecedentes históricos.....	1
1.2 Propiedades químicas del ácido carmínico.....	2
1.3 Actualidad.....	4
1.4 Biología y Morfología.....	7
1.4.1 Taxonomía y clasificación.....	8
1.4.2 Dimorfismo sexual.....	8
• Coccercina.....	9
1.4.3 Ciclo biológico.....	9
• Partenogénesis.....	11
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1 Órgano interno de reproducción.....	15
2.2 Medios de cultivo.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS.....	26
6. METODOLOGÍA	
6.1 Descripción del área de estudio.....	27

6.2	<i>Materiales</i>	
6.2.1	Material biológico.....	27
6.3	<i>Métodos</i>	
6.3.1	Procedimiento experimental	
a)	Elaboración de medios de cultivo.....	27
b)	Diseccción del insecto.....	28
c)	Incubación de tejido.....	29
d)	Toma de datos.....	29
6.3.2	Diseño experimental.....	31
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
▶	Ninfa II	
o	Prueba de Tukey para Contaminación del Tejido..	32
o	Prueba de Tukey para Pérdida de Pigmento.....	33
o	Prueba de Tukey para Conservación de Tejido.....	34
▶	Adultas Oviparas	
o	Prueba de Tukey para Contaminación del Tejido..	37
o	Prueba de Tukey para Pérdida de Pigmento.....	38
o	Prueba de Tukey para Conservación de Tejido.....	39
8.	CONCLUSIÓN.....	45
9.	LITERATURA CITADA.....	47
10.	LITERATURA CONSULTADA.....	54
11.	GLOSARIO.....	56
12.	APÉNDICE.....	57

• ÍNDICE DE FIGURAS

Página

1. Fotografía del mural que se encuentra en el Palacio de Gobierno de Oaxaca, México, donde se observa la vida colonial en dicha entidad con el cultivo y uso en el teñido textil de la grana cochinilla.....	1
2. Fórmula desarrollada del ácido carmínico, principio activo del pigmento de la grana cochinilla.....	2
3. Composición de la grana cochinilla.....	7
4. <i>Dactylopius coccus</i> Costa macho.....	9
5. <i>Dactylopius coccus</i> Costa hembra; vista ventral y dorsal.....	9
6. Ciclo biológico de la grana cochinilla (<i>Dactylopius coccus</i> Costa).....	12
7. Grana cochinilla sobre cladodio de <i>Opuntia jaliscana</i>	13
8. Vista dorsal y ventral con apéndices de la grana cochinilla.....	13
9. Órgano genital femenino interno de <i>Apis mellifera</i>	16
10. Tipos de órganos genitales femeninos internos en insectos.....	17
11. Órgano reproductor interno de <i>Dactylopius coccus</i> Costa.....	18
12. Pasos en la disección de la grana cochinilla.....	30
13. Prueba de Tukey para ninfa II en relación a la respuesta de los medios con los tejidos establecidos ($\alpha = 0.1$).....	34
14. Prueba de Tukey para el establecimiento del tejido para ninfa II en relación a 15, 30, 45 y 60 días de establecido el tejido ($\alpha = 0.1$).....	35
15. Vista del aparato reproductor de la hembra de <i>Dactylopius coccus</i> Costa (Ninfa II), en medio de cultivo Dulbecco's a) segundo día; b) 15 días; c) 30 días; d) 45 días y e) 60 días después de establecido.....	35

16. Vista del aparato reproductor de la hembra de <i>Dactylopius coccus</i> Costa (Ninfa II), en medio de cultivo Grace's. a) segundo día; b) 15 días; c) 30 días; d) 45 días y e) 60 días después de establecido.....	36
17. Vista del aparato reproductor de la hembra de <i>Dactylopius coccus</i> Costa (Ninfa II), en medio RPMI-1640. a) 6 días; b) 15 días; c) 30 días; d) 45 días y e) 60 días de establecido el tejido.....	36
18. Prueba de Tukey para adultas ovíparas en relación a la respuesta de los medios con los tejidos establecidos ($\alpha = 0.1$).....	40
19. Prueba de Tukey para adultas ovíparas con respecto a los 15, 30, 45 y 60 días de establecido el tejido ($\alpha = 0.1$).....	40
20. Germinario de grana cochinilla adulta ovípara en medio Dulbecco's. a). Al segundo día de establecido; b). 15 días después; c). A los 30 días; d). A los 45 días y e). A los 60 días de establecido...	41
21. Germinario de grana cochinilla adulta ovípara en medio Grace's. a) Al segundo día de establecido; b) 15 días después; c) A los 30 días; d) A los 45 días y e) A los 60 días de establecido.....	41
22. Medio RPMI-1640 en que se observa la conservación tanto del tejido como del pigmento hasta los 60 días. Asimismo no se observan agentes contaminantes en los tejidos. a) Segundo día; b) 15 días; c) 30 días; d) 45 días y e) 60 días.....	42
23. Medio Grace's en las que se observa la exposición del embrión en desarrollo, debido a la degradación del corion	43
24. Medio RPMI-1640 después de dos meses aproximadamente de haberse establecido los tejidos (con 30 mg AAS). a) Primer bloque; se observa un resurgimiento de la pigmentación en algunas células y el tejido aun se encuentra en buenas condiciones; b) Se conserva el germinario completo con presencia del pigmento; c) y d) Se percibe como el pigmento se encuentra englobado dentro del corion con una producción tanto en la cochinilla preformada como en la matriz embrional; y e) Se observa como algunas células presentan coloración que resurgió.....	44

• ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
1. Precio de la grana cochinilla a través de los años.....	6
2. Composición de tres tipos de medios utilizados comúnmente.....	21
3. Nutrientes para células de invertebrados: nutrientes de Grace (1962) para el cultivo de tejidos de insectos preparado a partir de siete soluciones base.....	22
4. Diseño experimental empleado (Factorial 2 x 3).....	31
5. Análisis de varianza de tripe interacción para el número de días, contaminación, pérdida de pigmento y conservación del tejido en ninfa II.....	32
6. Análisis de varianza de triple interacción para el número de días, contaminación, pérdida de pigmento y conservación del tejido en adultas oviplenas.....	37

• RESUMEN

La demanda de productos derivados del pigmento de la grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) ha motivado la producción del insecto en diferentes regiones de México, pero debido a factores como las condiciones climáticas adversas y la presencia de enemigos naturales y de competidores, la producción de dicho organismo se ve disminuida notablemente, y por ende su aprovechamiento; de igual forma los procesos de producción relacionados con la obtención del pigmento son aún muy rudimentarios e implican una gran pérdida del peso bruto al industrializado.

Con base en lo anterior se realizó el presente trabajo, enfocado a dar un paso en la producción, estudiando los procesos *in vitro*, con el fin de evaluar la viabilidad del establecimiento de los tejidos en diferentes medios, para en un futuro igualar las condiciones *in vivo*, de una manera eficaz, logrando así una producción a nivel comercial y a gran escala.

Fue seleccionado el aparato reproductor de las hembras de la grana cochinilla como posible lugar de síntesis del ácido carmínico, tomando los organismos en los estadios de ninfa II y adulta oviplena, esto debido al porcentaje de ácido carmínico presente en comparación con los demás estadios. Los medios utilizados en el establecimiento de los tejidos fueron RPMI-1640, Dulbecco's y Grace's Insect Medium®. Cada medio fue modificado de acuerdo a varias técnicas empleadas para el cultivo de células de insectos, con el fin de prolongar el periodo de vida del tejido establecido.

El diseño experimental empleado fue un factorial 2×3 , tomando en cuenta que el experimento se realizó con los dos estadios de la grana cochinilla y los tres medios de cultivo seleccionados y ya mencionados.

Los modelos estadísticos para las variables independientes medios y días resultaron, en general, altamente significativos en el análisis de varianza, así como las interacciones en las variables de estudio, las cuales en este caso fueron Contaminación, Pérdida del Pigmento y Conservación del Tejido.

Los resultados obtenidos para el medio Dulbecco's muestra que no fue viable para el mantenimiento del cultivo en ninguno de los dos estadios, puesto que en éste se perdió el pigmento con rapidez, y la contaminación se presentó en un alto índice de los cultivos establecidos. Asimismo la degradación del tejido se presentó eventualmente.

El medio Grace presentó una mayor cantidad de contaminación y el período de vida de los cultivos fue corto en general en los dos estadios (Ninfa II y adultas oviplenas) puesto que la conservación del tejido fue mínima. Sin embargo, este medio si conservó el pigmento por más tiempo que el Dulbecco's en algunos cultivos específicamente de adultas oviplenas, el cual se podía apreciar aun con el avance de la contaminación, aunque el análisis no muestra diferencia entre los dos medios.

El medio RPMI-1640, fue el que mejores resultados arrojó, puesto que el mantenimiento del cultivo fue de hasta 60 días, es decir, mayor en tiempo y menor en contaminación, además de que se conservó el pigmento en la mayoría de las células. Se determinó que este medio es óptimo para el establecimiento del tejido de cochinilla adulta oviplena, ya que fueron estos cultivos los que mostraron mejor respuesta.

El análisis se desarrolló en el programa SAS® ver 6.3 (1985) y estuvo conformado por un ANOVA para las interacciones entre las variables, y una prueba de Tukey para determinar tanto los días como los medios más viables para el experimento. Al realizar las interacciones entre las variables, en el análisis estadístico con $p = .01$, se observó que son altamente significativas, ya que fue evidente que la contaminación va estrechamente ligada a la pérdida de pigmento y consecuentemente a la desintegración del tejido. Asimismo los resultados arrojaron que entre los 15 y 30 días la presencia de contaminación al igual que la pérdida del pigmento es mínima y pasado este periodo hay un aumento exponencial de dichas variables. Por otro lado la conservación de tejido fue óptima durante los primeros 15 días y decreció pasado este periodo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes históricos



Figura 1. Fotografía del mural que se encuentra en el Palacio de Gobierno de Oaxaca, México, donde se observa la vida colonial en dicha entidad con el cultivo y uso en el teñido textil de la grana cochinilla. (Foto: L. Portillo).

El *nocheztli* (*sangre de tuna*), tinte a base de la grana cochinilla, fue auténtica conquista científica del indígena de México. Impulsado por los españoles en el siglo XVI, su cultivo tuvo gran incremento, se extendió hasta Guatemala y se recogía en Loja y Tucumán, en América del Sur; exportada al Viejo Mundo, vía España y Filipinas, revolucionó la industria de colorantes; fue, en consecuencia, uno de los ramos más lucrativos de la economía iberoamericana (Figura 1) (Dahlgren, 1990).

El género *Dactylopius* se distingue fácilmente por el color rojo característico y las secreciones cerosas de aspecto polvorientos o algodonosas. Durante la época colonial México llegó a ser el principal productor del insecto, sobre todo Oaxaca, que fue el estado productor y exportador de grandes cantidades de grana cochinilla seca hacia Europa.

Este insecto llegó a tener gran demanda durante la Colonia por el color que daba el ácido carmínico que contiene, y porque en Europa se utilizaba para teñir la ropa de la nobleza, las tapicerías, artesanías finas, las obras de arte, y otros. Además, otro uso fue para teñir los uniformes de los ejércitos de casi todo el mundo (Del Río, 1992). Con el comienzo de la guerra de Independencia en México y la aparición de las anilinas (colorantes sintéticos, 1850), el interés por continuar con el cultivo y producción de grana cochinilla comenzó a declinar; las áreas que antes eran utilizadas para la reproducción dejaron de serlo y pasaron a ser tierras para cultivos agrícolas. Sólo se dejó la producción de la grana cochinilla para el uso textil artesanal (Cremades y Romero, 1997).

1.2 Propiedades químicas del ácido carmínico

La estructura química y las propiedades del ácido carmínico han sido estudiadas extensivamente desde 1858. Desde inicios del siglo XXI, la estructura primaria y las propiedades, así como los métodos de extracción y purificación de este pigmento han sido investigados intensivamente (Aquino y Bárcenas, 1999). Por otra parte, la forma cristalina de ácido carmínico fue obtenida primeramente en 1858, pero su estructura fue determinada sólo hasta 1965 (Lambdin y col., 2002).

El ácido carmínico (principio colorante) (Figura 2) es un compuesto químico de color rojo intenso muy estable a la luz y el calor. Esta característica, entre otras, ha hecho que el insecto sea explotado intensivamente por la industria de los colorantes naturales (Mora, 1996; Viguera, 1998).

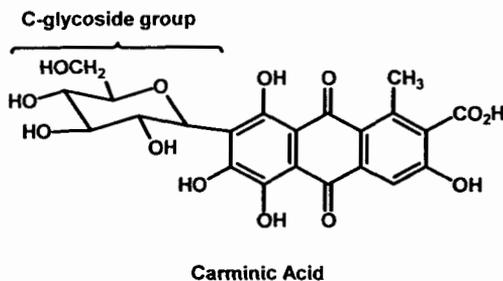


Figura 2. Fórmula desarrollada del ácido carmínico, principio activo del pigmento de la grana cochinilla (Lambdin y col., 2002).

Según Randich (1975) el ácido carmínico tiene una fórmula global $C_{22}H_{20}O_{13}$, de forma cristalina y con prismas de color rojo. No posee punto de fusión, pero se oscurece a $130^{\circ}C$ y a $250^{\circ}C$ se vuelve negro. En lo referente a la solubilidad del pigmento, este es:

- Soluble en agua
- Soluble en alcohol
- Ligeramente soluble en éter
- Insoluble en benceno
- Insoluble en cloroformo

Es un ácido antraquinoncarboxílico oxhidrilado con cadena lateral de azúcar, lo que probablemente condiciona la solubilidad en agua y etanol de este compuesto (Figura 2). El pigmento tiene las siguientes reacciones (Randich, 1975):

Con ácidos: color amarillo-rojo

Con álcalis: color violeta

Con bases alcalinotérreas y metales pesados forma combinaciones no solubles; las cuales se distinguen por sus coloraciones especiales (Randich, 1975):

Alumbre: lentamente se forma precipitado rojo

Cloruro de Aluminio: precipitado violeta rojizo

Cloruro Estañoso: precipitado violeta

Cloruro Estánico: coloración escarlata brillante

Sulfato Ferroso: precipitado gris violeta

Acetato de Plomo: precipitado violeta

Sulfato de Cobre: precipitado violeta

Sulfato de Zinc: precipitado violeta

Ácido Oxálico: precipitado rojo

Sales de Úranio: color verde esmeralda

Sing (1997), mencionó que las hembras desecadas de la grana cochinilla contienen aproximadamente de 18 a 23% de ácido carmínico sobre su peso seco. Por lo general, el ácido carmínico es extraído bajo la forma de un complejo metálico, al que se conoce como carmín (o carmin de cochinilla).

1.3 Actualidad

Dactylopius spp. han recibido atención principalmente en los aspectos biológicos, agronómicos, químicos y toxicológicos; sin embargo, *Dactylopius coccus* Costa ha sido la especie más estudiada desde el siglo XIX (Aquino y col., 2002), ya que presenta mayor contenido de ácido carmínico (principio colorante) por peso y es, por lo tanto, la única especie del género cultivada con fines comerciales.

En la actualidad la grana cochinilla se vuelve a cotizar a precio bastante favorable en el mercado internacional; se emplea principalmente como colorante de medicinas, alimentos y cosméticos. Más en México ya no existen cultivos comerciales sino en escala ínfima para satisfacer a unas cuantas industrias caseras, pues muchos indígenas, fieles a sus viejas costumbres, continúan tiñendo con grana la seda que usan para adornar sus vistosos trajes regionales (Dahlgren, 1990). Sin embargo, México se ha convertido en los últimos años en uno de los principales usuarios del pigmento, esto debido a la tendencia mundial por consumir productos libres de aditivos químicos, y sobretudo por los reportes de alergias y otros padecimientos, inclusive cáncer. Por otro lado, la producción mundial de este recurso natural rebasa las 1000 toneladas anuales y se espera que siga en aumento (Portillo, y Viguera, 2003). Perú ocupa el primer lugar en la producción de grana cochinilla, representando aproximadamente el 90% del total de la producción mundial.

Los colorantes sintéticos han sido utilizados ampliamente por las diversas industrias debido a su bajo costo y a las ventajas técnicas que ofrecen. Sin embargo, las constantes reglamentaciones que controlan su elaboración y uso, junto con la tendencia mundial por adquirir productos de origen natural, han favorecido en fechas recientes la reintroducción de los colorantes naturales en el mercado internacional (Mora, 1996), además, algunas agencias gubernamentales en el mundo han comprobado que los colorantes sintéticos presentan un riesgo tanto carcinogénico como mutagénico (Lambin y col., 2002) y su uso pretende ser restringido aún más por algunas organizaciones como la Comunidad Económica Europea y la Agencia de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (Méndez, 1998). Por ello, la Organización Mundial de

la Salud ha propuesto el uso de colorantes naturales en sustitución de los colorantes sintéticos (Pereira y Warumby, 1998). Consecuentemente la demanda de productos derivados del pigmento de la grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) ha motivado la producción del insecto en diferentes regiones de México, en las que los factores como las condiciones climatológicas adversas y la presencia de enemigos naturales y de competidores, pueden afectar su aprovechamiento y cuyo efecto se puede regular mediante la producción del insecto bajo protección (Llenderal y col., 2003).

Los países desarrollados son los principales consumidores del carmín. De la producción mundial, Francia, Reino Unido, Japón, los Países Bajos y Estados Unidos consumen el 90%. Si bien existen otras fuentes de colorante rojo como los insectos *Kermes*, e *Ilex*, y plantas como el chile, tuna, páprika y azafran, el carmín tiene mayor demanda por su alta estabilidad, concentración y calidad. El precio de la grana ha sido muy variable y en algunos años ha llegado a superar los \$100 dólares/kg, el producto industrializado también presenta variaciones importantes en precios. En los últimos años, el valor del carmín al 50% ha oscilado entre \$570 y \$600 dólares/kg (Aquino y col., 2002).

El precio actual del carmín de 52% en laca (polvo) es de aproximadamente \$ 65/kg dólares. A continuación se presenta la fluctuación de los precios de la grana cochinilla a través de los años (Bustamante, *in litt.*)[†] (Cuadro 1).

[†] Bustamante, José Antonio. Casilla (PO Box) 578, La Serena, Chile. jab@foodsafec.cl.

Cuadro 1. Precio de la grana cochinilla a través de los años
(Bustamante, *in litt.*).

Año	Precio/kg/dólares	Toneladas
1982	7.50	70
1983	9.50	90
1984	16.00	100
1985	60.00	125
1986	125.00	190
1987	70.00	210
1988	33.00	230
1989	17.00	270
1990	16.00	290
1991	11.00	300
1992	10.50	300
1993	13.00	280
1994	25.00	350
1995	48.00	380
1996	142.00	400
1997	90.00	435
1998	30.00	500
1999	25.00	650
2000	19.00	780
2001	16.00	900
2002	14.50	1150
2003	14.50	1350
2004	25.00	> 1350

1.4 Biología y Morfología

La familia *Dactylopiidae* (Cochinilla del carmín) consta de nueve especies agrupadas en un solo género, *Dactylopius*, cuyos hospederos se restringen a la familia Cactaceae (Principalmente a los géneros *Opuntia* y *Nopalea*). Todas las especies contienen ácido carmínico en sus fluidos corporales, lo cual, presumiblemente les sirve como defensa ante el ataque de depredadores (Mann, 1969; Zimmerman, 1989; De Haro y Claps, 1998) tales como dos larvas de insectos, un coleoptero (*Hyperaspis trifurcata*) y una diptero (*Leucopis* sp.), que se alimentan de ciertos coccidos, apropiándose del compuesto químico defensivo de sus presas, ácido carmínico, para su propia protección. *H. trifurcata* descarga el químico con chorros de sangre (hemolinfa) que emite cuando es molestado; *Leucopis* sp. arroja el compuesto con el fluido rectal. Las hormigas se ven afectadas por estos ataques defensivos, los cuales son comparados con la defensa de un pirálido (*Laetilia coccidiivora*) el cual regurgita el ácido carmínico que ha almacenado con anterioridad de sus presas. El fluido defensivo de estas tres larvas contienen ácido carmínico en concentraciones variables (0.2-6.2%) que han probado ser un disuasivo alimentario efectivo contra las hormigas. Muchos insectos son conocidos por apropiarse de sustancias de plantas como defensa. Insectos que adquieren defensas químicas de fuentes animales son relativamente raros (Eisner y col., 1994).

Según Bustamante-Murillo (1997), la composición de la cochinilla es la siguiente (Figura 3):

- A: Capa externa cérea llamada coccerina (ceras y grasas).
- B: Entorno cuticular: (polisacáricos y quitina).
- C: Materia tisular (glucógeno, lípidos y grasas, agua, lipoproteínas, aminoácidos, sales y ácido carmínico).

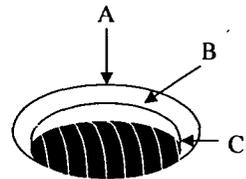


Figura 3. Composición de la Grana cochinilla.

1.4.1 Taxonomía y Clasificación

La grana cochinilla ha sido descrita como *Dactylopius coccus* Costa tradicionalmente, clasificación que aun prevalece (Pérez y Kosztarab, 1992):

Clase:	Insecta
Subclase:	Pterygota
Orden:	Homóptera
División:	Exopterygota
Suborden:	Sternorrhyncha
Superfamilia:	Coccoidea
Familia:	Dactylopiidae
Género:	<i>Dactylopius</i>
Especie:	<i>D. coccus</i>

Actualmente se suscita una acalorada discusión con respecto al orden al que corresponde este insecto. Un análisis de publicaciones sobre este grupo de insectos de 1998 al 2001 mostró que entre 66 y 75 % de los coccidólogos prefirieron homóptera en lugar de hemíptera al mencionarlos en los títulos (Danzing, 2001), aunque hoy existen análisis filogenéticos que indican lo contrario, es decir, que la grana cochinilla corresponde al orden hemíptera (orden que se maneja en el presente trabajo).

1.4.2 Dimorfismo sexual

La grana cochinilla presenta un dimorfismo sexual muy marcado, el macho (Figura 4) pasa por una metamorfosis holometábola (completa) y es alado; en cambio la hembra (Figura 5) posee una metamorfosis parametábola (o incompleta), es de forma oval y se encuentra cubierta por una cera pulverulenta con apariencia de talco que se desprende fácilmente con la corriente del viento (Bonilla, 1999). Algunos autores consideran a

ambas metamorfosis (femenina y masculina) como graduales y simplemente diferentes una de otra.

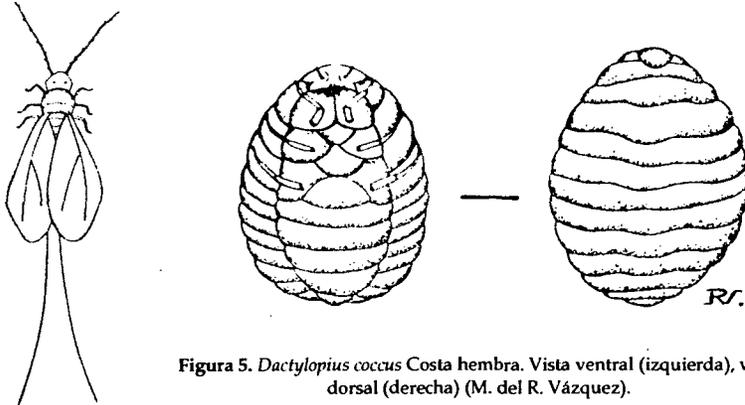


Figura 4. *Dactylopius coccus* Costa macho (M. del R. Vázquez).

Figura 5. *Dactylopius coccus* Costa hembra. Vista ventral (izquierda), vista dorsal (derecha) (M. del R. Vázquez).

- **Coccerina:**

El polvillo blanco que recubre a la grana o cochinilla está constituido por una materia análoga a las ceras que se obtiene agotando la cochinilla por medio de benceno, y está formada casi completamente por una sustancia a la cual se dio el nombre de coccerina, $C_{30}H_{60}(C_{31}H_{61}O_3)_2$. Una vez recristalizada en benceno o en ácido acético, la coccerina se presenta en forma de laminillas brillantes, que funden a $106^{\circ}C$; es poco soluble en todos los solventes, y casi insoluble en alcohol. Saponificada, mediante solución alcohólica de potasa cáustica, produce el alcohol coccerico, $C_{30}H_{60}(OH)_2$ y ácido coccérico, $C_{13}H_{62}O_3$ (Hernández, 1998).

1.4.3 Ciclo Biológico

El ciclo biológico de la grana cochinilla esta dado en función a sexo y al medio ambiente. En el macho tiene una duración menor que el de la hembra, de 48 a 62 días;

se presenta un dimorfismo muy marcado después del estadio de ninfa II. La hembra es la que se utiliza para extraer el pigmento, su ciclo de vida en promedio es de 92 a 103 días, mismo que puede variar de acuerdo a la temperatura (Vigueras y Portillo, 1995).

Los huevos se colocan individualmente debajo del cuerpo de la hembra y tardan en eclosionar desde 15 min a 6 h [lo que implica son ovovivíparas (ver glosario)], las ninfas son de color rojo o rosadas, la hembra y el macho no se distinguen en esta etapa, pero, difieren en su desarrollo un poco después. La mayoría de las hembras seleccionan un lugar determinado en un plazo de 24 a 48 horas, y después inserta su estilete en el tejido de la planta permaneciendo ahí el resto de su vida (Vigueras, 1992).

El macho adulto es alado e inconspicuo en comparación con las hembras ovaes ápteras; inmediatamente después de que emerge, busca a las hembras para posarse sobre la parte dorsal del cuerpo de éstas hasta encontrar aquellas que están listas para copular. Es raro verles volar y normalmente sus desplazamientos son por locomoción; no se alimentan y su vida es muy corta, de tres días en promedio (Marín y Cisneros, 1977; Montiel, 1995) (Figura 4).

En general el cuerpo de las hembras adultas es más o menos oval y alargado. La cutícula en la mayoría de las especies es membranosa (excepto por el lóbulo anal que es esclerosado). La segmentación del cuerpo no presenta una diferencia clara, ya que la cabeza y el tórax se encuentran fusionados y es difícil determinar sus límites (Montiel, 1995) (Figura 5).

Las hembras pasan por los estados de desarrollo de huevo, ninfa (I y II) y adulto; sin embargo, los machos presentan los estados biológicos de desarrollo de huevo, ninfa (I y II), prepupa, pupa y adulto (Briseño, 2001) (Figura 6).

- **Partenogénesis:**

Cada hembra de la grana cochinilla, deposita alrededor de 200 huevos, pero si éstos no son expulsados totalmente, se inicia la emergencia de la ninfa dentro del cuerpo de la madre, motivo por el cual, como ya se mencionó, se considera que *D. coccus* es una especie ovovivípara (Montiel, 1995). El ritmo de producción de los huevos está influenciado por la temperatura, cesando la misma a temperaturas bajas, aunque otras actividades fisiológicas se desarrollen con toda normalidad. Los machos son muy sensibles a temperaturas elevadas, pues los espermatozoides pierden su movilidad y pueden degenerarse (Llanderal, 2000).

En condiciones climáticas extremas o en ausencia de macho se presenta un fenómeno bastante común en insectos denominado partenogénesis (ver glosario). En la reproducción sexual los machos y las hembras diploides producen gametos haploides que se fusionan para formar un cigoto diploide. En cambio, durante la partenogénesis la mitosis y la meiosis se modifican para compensar la falta de fertilización (Llanderal, 2000). Algunos autores como Bustamante (1985) mencionan que la grana cochinilla (fina) presenta partenogénesis en ciertas condiciones (facultativa), aunque el trabajo no es concluyente debido a que solo se realizó con dos generaciones; en cambio Morales (1994), menciona que observaciones realizadas hasta el momento no concluyen que se presente partenogénesis en la cochinilla silvestre, por lo que se requiere llevar a cabo un estudio detallado de esta etapa reproductiva tanto en la grana cochinilla silvestre como en la fina.

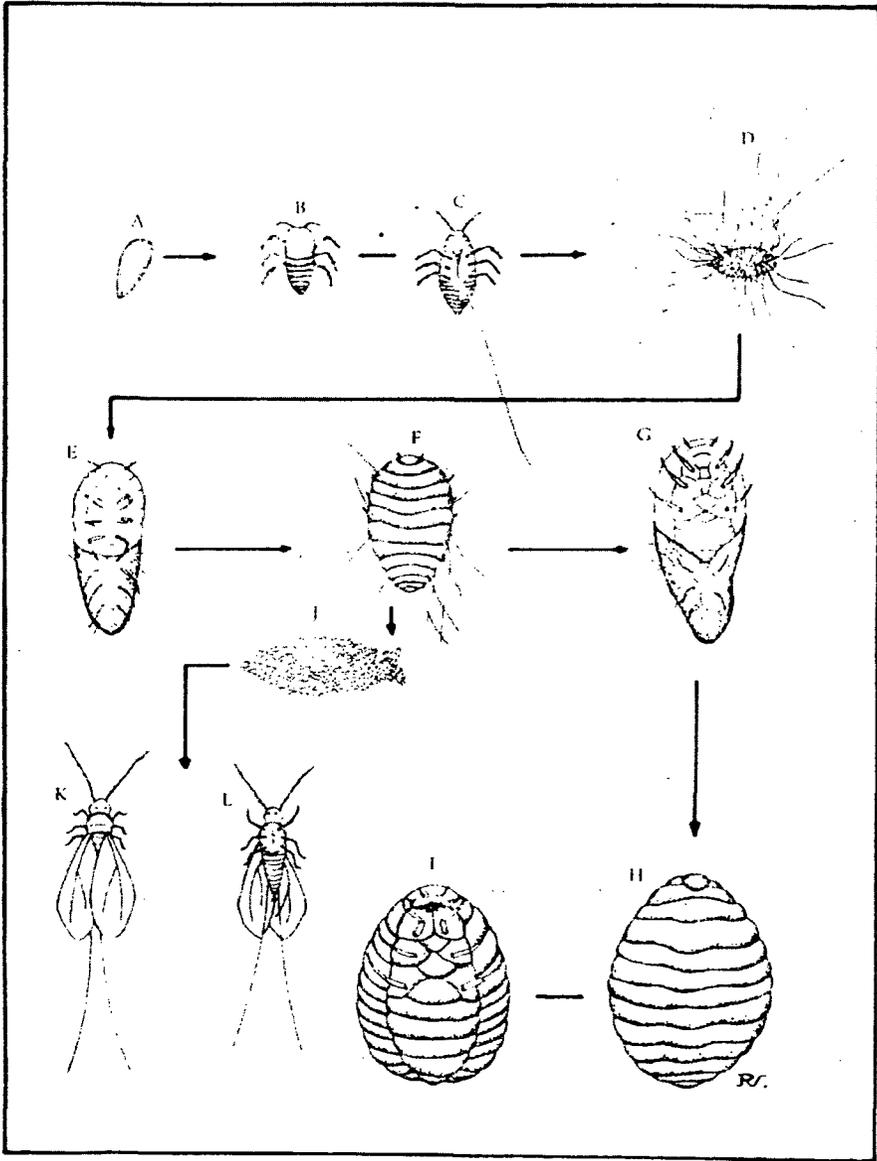


Figura 6: Ciclo biológico de la grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa). A) huevo; B) vista dorsal y C) vista ventral de la ninfa I migrante; D) ninfa I establecida; E) muda a ninfa II; F) Ninfa II; G) muda a hembra adulta; H) vista dorsal y I) ventral de la hembra adulta; J) capullo de macho; K) vista dorsal y L) ventral de macho adulto (Tomado de Portillo, 1992).

2. ANTECEDENTES

El insecto de nombre científico *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae) se conoce comúnmente con los nombres de grana, cochinilla fina, cochinilla del nopal, cochinilla del carmín o cochinilla (Figura 7 y 8); este último vocablo se deriva del latín *coccinos* que quiere decir escarlata (Brana, 1964). El principal interés de la grana cochinilla radica en el pigmento que produce (Portillo y Viguera, 2003). Dado que en México, como en otros países, la cría de este insecto ha adquirido importancia económica en la industria (farmacéutica, textil, alimenticia y cosmetológica, entre otras), es necesario generar metodologías viables para su producción *in vitro*, con el fin de aumentar la misma (Bárceñas y Aquino, 1997).

Una de las herramientas biotecnológicas de mayor importancia es el cultivo *in vitro* de células animales a gran escala para producción de vacunas, hormonas, fármacos y sistemas de diagnóstico. Las aplicaciones de cultivo de células de insectos son inimaginables, y en la actualidad constituyen la base de cientos de proteínas de utilidad médica y veterinaria (Aquino y Bárceñas, 2002).

El acelerado avance de la ciencia y la tecnología prevé la sustitución de producir metabolitos secundarios a partir de las fuentes naturales por biosintéticas. Por medio de la biotecnología y la bioingeniería se han generado numerosos metabolitos a costos significativamente reducidos, como resultado de su alta pureza y eficacia en la producción (Bárceñas y Aquino, 1997).



Figura 7. Grana cochinilla sobre cladodio de *Opuntia jaliscana*. (Foto: L. Portillo).

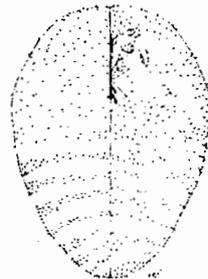


Figura 8. Vista dorsal (izquierda) y ventral con apéndices (derecha) de la grana cochinilla (Dibujo: M. del R. Vázquez).

Los brillantes colores de los insectos siempre han atraído la atención de naturalistas y entomólogos, y una inmensa cantidad de literatura con respecto a ello ha sido acumulada; pero hasta hace muy poco se tuvo conocimiento de la química natural de los pigmentos que éstos contienen. La principal razón de lo anterior fue que las técnicas clásicas de química orgánica eran normalmente inadecuadas para el aislamiento de pequeñas cantidades de pigmento presente en el material biológico. Por otra parte, aun si las sustancias puras pudieran ser aisladas por los métodos disponibles, un estudio químico a gran escala realizado por los viejos métodos requeriría una colección de un fantástico número de insectos (Cromartie, 1959).

El color es una característica que hace a estos productos más atractivos y representa un valor agregado de importancia en su comercialización, especialmente si se garantiza a los clientes que las materias primas utilizadas para colorear los productos no son dañinas. En la actualidad, los consumidores de productos industrializados están mejor informados sobre el daño que produce a la salud el uso de colorantes sintéticos, por lo que demandan el uso de aditivos inócuos (Bárceñas y Aquino, 1997).

Todos los estadios de desarrollo de la grana cochinilla, incluyendo el huevo, son de color rojo, lo que indica la presencia del ácido carmínico. Varios investigadores han intentado definir el lugar preciso del cuerpo en el que se encuentra el colorante; Chapman (1975) indicó que éste se encuentra en el tejido adiposo y en la hemolinfa, mientras que Montiel (1995) reportó su presencia en los huevos y en la hemolinfa de ninfas y adultos. Los significativos avances en el aspecto químico le permitió a Alevi y col. (1996) desarrollar la síntesis orgánica del ácido carmínico. Por su parte Joshi y Lambdin (1996) realizaron trabajos referentes a describir la citología relacionada con la producción del ácido carmínico; sin embargo, Maza (1999) identificó al tejido adiposo como el principal órgano involucrado en la síntesis del ácido carmínico y descartó su presencia en las células de la hemolinfa o hemocitos. Por otra parte algunos investigadores se han dedicado a la tarea de indagar sobre la sinopsis de la biosíntesis del ácido carmínico (Lambdin y col., 2002) y ahondar en la biología reproductiva y genética de la grana cochinilla (Aquino y Barceñas, 2002).

Los resultados obtenidos hasta el momento en lo referente a la producción del ácido carmínico en la cochinilla, indican que la síntesis del colorante no depende de un solo tipo de células especializadas, sino de la interacción de diferentes tipos de células, e, inclusive, de microorganismos simbioses (Aquino y col., 2002).

Todos estos trabajos aportan algunos avances, pero ninguno de ellos explica, de manera concisa, el lugar de producción del colorante y los procesos que en él ocurren.

El hecho de que la producción de carmín alcance hasta 20% del peso seco de la grana cochinilla permite formular hipótesis acerca de que el cultivo *in vitro* de células o tejidos especializados en medios de cultivo apropiados y en condiciones óptimas de temperatura, presión osmótica, pH, etcétera, podría aumentar considerablemente. Por otro lado, la extracción y purificación del carmín con cultivos homogéneos y estériles resultaría más sencilla que utilizar el cuerpo desecado de insectos (Bárceñas y Aquino, 1997).

2.1 Órgano interno de reproducción

Según Chapman (1975), los sistemas reproductores del macho y la hembra generalmente consisten en un par de gónadas conectadas a un ducto medio principal con el gonoporo. Las glándulas accesorias están comúnmente presentes en ambos; en el macho están usualmente relacionadas con la formación de espermatóforo y el mantenimiento del esperma, y en la hembra provee un pegamento para fijar los huevos al sustrato o provee de sustancia para la formación del huevo. La familia Dactylopiidae tiene, además, una espermateca para almacenar el esperma después de la copulación.

Según Prado y Valdéz (1990), el órgano reproductor masculino consiste típicamente de un par de testículos los cuales están conectados con las vesículas seminales y al ducto medio eyaculatorio. En la mayoría de los insectos existe también un número de glándulas accesorias dentro del vaso deferente o el ducto eyaculatorio.

En general, en los insectos, el sistema reproductor de la hembra (Figura 9) consta de un par de ovarios conectados con un par de oviductos laterales, los cuales se unen para formar un oviducto medio que se abre en la vagina; en algunas especies hay una bursa copulatrix para la recepción del pene. Conectada a la vagina se encuentra la espermateca que sirve como almacén de espermatozoides recibidos durante la cópula. También puede haber un par de glándulas accesorias que pueden tener diversas funciones. Los ovarios se encuentran sobre o a los lados del intestino y cada uno consiste de una serie de ovariolos en donde tiene lugar el desarrollo de los oocitos (Llanderal, 2000; Zapata, 1970). Existe una enorme variación en la forma y estructura de los órganos genitales femeninos internos de una especie a otra, aunque en general sus componentes son los mismos (Figura 10).

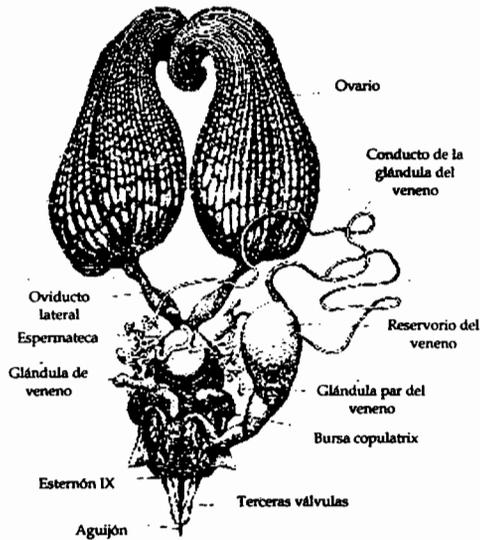


Figura 9: Órgano genital femenino interno de *Apis mellifera* (Tomado de Webber, 1933 en Prado y Valdéz, 1990).

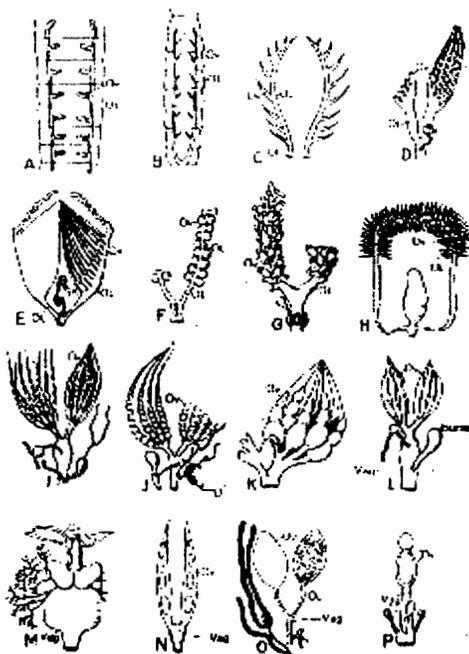


Figura 10. Tipos de órganos genitales femeninos internos en insectos. A) tipo básico; B) *Larva*; C) efemerópteros; D) dermáptero; E) acridido; F) *Forficula*; G) cóccido; H) plecóptero; I) himenóptero; J) lepidóptero; K) hemíptero; L) coleóptero; M) *Glossina*; N) *Camponota*; O) *Aphidius*; P) *Phylloxera*. Ol, oviducto lateral; ov, ovario; vag, vagina. (Tomado de Webber, 1933 en Prado y Valdéz, 1990).

La forma redondeada de los oocitos y su tamaño creciente da al ovariolo la apariencia de collar de perlas formado por unidades cada vez mayores. En cada ovariolo se distinguen, de adelante hacia atrás, cuatro zonas denominadas filamento terminal, germinario, vitelarrio y pedicelo. El pedicelo es un tubo corto y estrecho por el que deben pasar los oocitos para llegar al oviducto lateral. Es de origen mesodérmico y está formado por células columnares que descansan sobre una membrana basal a la que se añaden músculos circulares y algunos haces, internos y externos, de músculos longitudinales. Inicialmente no hay paso del vitelarrio al pedicelo, ya que éste está cerrado por un tapón celular que se deshace en la primera oviposición (Prado y Valdéz, 1990).

Al hablar del pigmento de la grana cochinilla, se hace énfasis en la importancia de la hembra puesto que ésta es quien cuenta con un mayor contenido de ácido carmínico. Los órganos genitales femeninos internos de este insecto constan de ovarios, oviductos laterales, oviducto común o medio, cámara genital y sus derivados, así como espermateca y glándulas accesorias (Prado y Valdéz, 1990) (Figura 11).

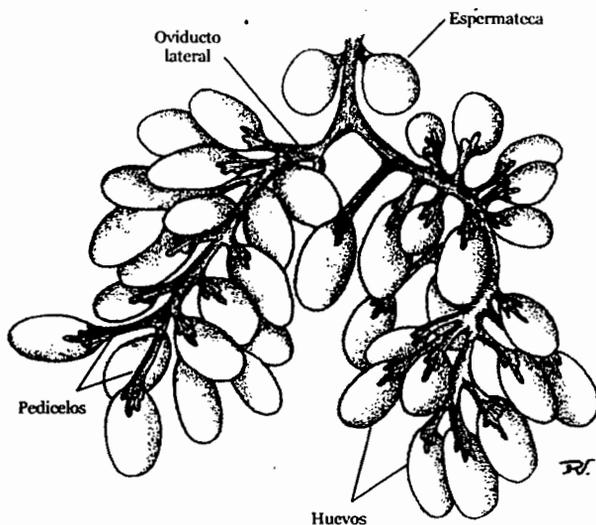


Figura 11: Órgano reproductor interno de *Dactylopius coccus* Costa (M. del R. Vázquez).

2.2 Medios de cultivo

El cultivo de células (o cultivo de tejidos) tiene su origen en el siglo XIX, cuando se comenzaron a estudiar con cierto detalle los tejidos y órganos en vasos de vidrio. El término *in vitro* significa literalmente "en vidrio", aunque en la actualidad la mayor parte de los cultivos celulares se desarrollan en plástico. Actualmente la mayoría de medios para el cultivo de células, se basan en experiencias iniciales sobre la composición de soluciones, que permiten que células obtenidas de tejidos sobrevivan fuera del organismo donante durante cortos periodos de tiempo. El cultivo celular ha alcanzado en el presente una posición en la que su objetivo es con frecuencia reproducir las condiciones existentes *in vivo* que permitan el crecimiento en cultivo de células "normales". Por tanto, el cultivo celular ha evolucionado a partir del examen de células

aisladas tal como mueren *in vitro* hasta el cultivo continuo (a largo plazo) de células que, en muchos aspectos, son idénticas a las que se encuentran en el organismo completo (Morgan y Darling, 1995); por tanto, para cultivar células *in vitro*, el ambiente debe ser lo más parecido posible al esperado *in vivo*. Son factores ambientales importantes el sustrato sobre el que crecen las células, y en general el medio que las rodea.

La composición completa de un medio que permita el crecimiento en cultivo de células puede ser muy compleja y el número de los distintos medios disponibles puede resultar enorme pero, básicamente, cualquier medio de cultivo está constituido por un medio nutriente mínimo tamponado e isotónico que contiene sales inorgánicas, una fuente de energía y aminoácidos, además de varios suplementos (Morgan y Darling, 1995).

Para permitir el crecimiento celular los medios necesitan de diversos suplementos que dependiendo las células establecidas (de vertebrados menores o mayores, invertebrados, etc.) son los esenciales para las mismas. En el caso de los medios específicos para cultivo de líneas celulares de vertebrados, éstos pueden ser utilizados para otro tipo de células (de invertebrados por ejemplo) al cambiar algunos de los suplementos. Lo anterior es posible gracias a que los medios en general tienen componentes esenciales para cualquier célula y varían únicamente en los suplementos (White, 1989).

Para la mayor parte de los objetivos de un cultivo celular resulta perfectamente adecuado un medio de tipo general. El medio basal de Eagle (BME) es uno de los medios definidos originales. Se utiliza normalmente para células adherentes (formadoras de tapiz o monocapa) como las células de HeLa y algunas células primarias. Posteriormente se han desarrollado otros medios a partir del BME, como por ejemplo, el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Cuadro 2). Que se elaboró al añadir a medio BME una mayor cantidad de vitaminas y aminoácidos, y se utilizó por primera vez para cultivar células de embrión de ratón. Sin embargo, en la actualidad se utiliza para una amplia gama de líneas celulares, principalmente aquellas que crecen como monocapas celulares adherentes (Morgan y Darling, 1995).

En la composición de muchos medios de cultivo se incluye una elevada cantidad de Ca_2^+ y Mg_2^+ en parte por que estos cationes divalentes son necesarios para la adherencia de proteínas situadas sobre las células formadores de tapiz. Los medios para el cultivo de células en suspensión no necesitan concentraciones tan elevadas, por ejemplo, el RPMI 1640 (medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute) (Cuadro 2) utilizado frecuentemente para leucocitos humanos o murinos normales o neoplásicos: estas células crecen en suspensión y necesitan poco calcio.

Para permitir el crecimiento celular, los medios básicos precisan la adición de suplementos como la glutamina y el suero. La glutamina es la fuente principal de carbono para la mayoría de las células en cultivo y genera precursores para posteriores biosíntesis y para la producción de proteínas. También actúa, junto con la glucosa (y a veces con el piruvato sódico), como fuente de energía mediante la ruta del ciclo de Krebs. El suero contiene una mezcla importante pero poco definida de compuestos favorecedores del crecimiento (por ejemplo polipéptidos, hormonas, lípidos y metales traza). Se han analizado los componentes del suero que resultan importantes para favorecer el crecimiento celular, lo que ha permitido la producción de un suplemento similar al suero y químicamente definido. Su principal ventaja es la eliminación de la interferencia resultante de factores desconocidos presentes en el suero que podrían alterar algunos experimentos. Sin embargo, el suero sigue siendo utilizado por la mayoría de los que trabajan con cultivos celulares, normalmente en forma de suero fetal bovino (Morgan y Darling, 1995).

Uno de los medios utilizados para el cultivo de células de insectos es el establecido por Grace en 1962, el cual llevó al establecimiento de la primera línea celular de mosquito, logrando una adaptación y una continuidad de las mismas y de las obtenidas a partir de ésta primera línea. (Varma y col. 1979) (Cuadro 3).

Freshey (2000) mencionó que cada cultivo requiere de un conjunto de condiciones diferentes, que se deben tomar en cuenta durante el aislamiento del cultivo para formar las líneas celulares; algunas de ellas son el removimiento de los tejidos grasos y necrosados durante la disección y el manejo adecuado de los tejidos con el instrumental especializado para causar el menor daño al tejido.

Cuadro 2: Composición de tres tipos de medios utilizados comúnmente.

	RPMI 1640 (mg/l)	DMEM (mg/l)	MEM (mg/l)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	-	264	264
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	100	-	-
Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	-	0,1	-
KCl	400	400	400
MgSO ₄ · 7H ₂ O	100	200	200
NaCl	6.000	6.400	6.800
NaHCO ₃	2.000	3.700	2.200
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	-	141	158
Na ₂ HPO ₄	800	-	-
D- glucosa	2.000	4.500	1.000
Rojo fenol	5	15	10
Piruvato sódico	-	110	-
L-arginina · HCl	-	84	126
L-asparagina · H ₂ O	50	-	-
Ácido L-aspartico	20	-	-
L-cistina	50	48	24
Ácido L-glutámico	20	-	-
L-glutamina	300	584	292
Glutation	1	-	-
Glicina	10	30	-
L-histidina · HCl · H ₂ O	-	42	42
L-histidina	15	-	-
L-hidroxiprolina	20	-	-
L-isoleucina	50	105	52
L-leucina	50	105	53
L-lisina · HCl	40	146	73
L-metionina	15	30	15
L-fenilalanina	15	66	33
L-prolina	20	-	-
L-serina	30	2	-
L-treonina	20	95	48
L-triptófano	5	16	10
L-tirosina	20	72	36
L-valina	20	94	-
Biotina	0,2	-	-
D-Ca pantotenato	0,3	4	1
Cloruro de colina	3	4	1
Ácido fólico	1	4	1
D - inositol	35	7,2	2
Nicotinamida	1	4	1
Ácido para-aminobenzóico	1	-	-
Piridaxil · HCl	1	4	1
Riboflavina	0,2	0,4	0,1
Tiamina · HCl	1	4	1
Vitamina B ₁₂	0,005	-	-

En este cuadro se comparan tres medios diferentes, el RPMI-1640 y de DMEM son relativamente ricos, y el MEM es un medio más básico, adecuado para tipos celulares menos exigentes. Obsérvese también que se trata de formulaciones básicas y que en la actualidad existen versiones mucho más alternativas (Morgan y Darling, 1995).

Cuadro 3: Nutrientes para células de invertebrados: Nutrientes de Grace (1962) para el cultivo de tejidos de insectos preparado a partir de siete soluciones base (White, 1989).

Para preparar 100 mililitros de nutrimento, se combinan 10 ml de cada una de las siguientes soluciones base. Se ajusta el pH a 6.5 con KOH; después se esterilizan por filtración. Las temperaturas óptimas para las células de insectos aparentemente son de 27-30°C.

A ₁	MgSO ₄ · 7H ₂ O	2,780 mg	} Disuelto en H ₂ O para preparar 100 ml
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	2,280 mg	
	KCl	2,240 mg	
	NaH ₂ P ₄ · 2H ₂ O	1,140 mg	
	NaHCO ₃	350 mg	
A ₂	CaCl ₂	1,000 mg	} Disuelto en H ₂ O para preparar 100 ml
B.	L-Arginina	700 mg	} Disuelto en H ₂ O para preparar 100 ml
	L-Ácido Aspártico.....	350 mg	
	L-Asparagina.....	350 mg	
	L-Alanina.....	225 mg	
	B-Alanina.....	200 mg	
	L-Cisteina HCl.....	25 mg	
	L-Ácido Glutámico.....	600 mg	
	L-Glutamina.....	600 mg	
	L-Glicina.....	650 mg	
	L-Histidina.....	2,500 mg	
	L-Isoleucina.....	50 mg	
	L-Leucina.....	75 mg	
	L-Lícina HCl.....	625 mg	
	L-Metionina.....	50 mg	
	L-Prolina.....	350 mg	
	L-Fenilalanina.....	150 mg	
	DL-Serina.....	1,100 mg	
	L-Triptófano.....	100 mg	
	L-Treonina.....	175 mg	
	L-Valina.....	100 mg	
L-Tirosina (disuelto en N/1 HCl).....	50 mg		
C.	Sacarosa.....	26.68 g	} Disuelto en H ₂ O para preparar 100 ml
	Fructuosa.....	0.40 g	
	Glucosa.....	0.70 g	

Continuación de cuadro 3....

D.	Ácido málico.....	670 mg	}	Disuelto en 100 ml H ₂ O. Neutralizado con KOH.
	Ácido keroglutámico.....	370 mg		
	Ácido succínico.....	60 mg		
	Ácido fumárico.....	55 mg		
E.	Penicilina G, sal sodio.....	30 mg	}	Disuelto en H ₂ O para preparar 100 ml
	Sulfato estreptomícina.....	100 mg		
F ₁	Ácido Fólico.....	20 mg	}	Disuelto en 100 ml H ₂ O. Dilución 1:1, 000 para preparar el stock F ₂ .
	Biotina.....	10 mg		
F ₂	Tiamina HCl.....	20 mg	}	Disuelto en 100 ml H ₂ O. Dilución 1:1, 000 para preparar el stock F ₂ .
	Riboflavina.....	20 mg		
	Ca Pantotenato.....	20 mg		
	Piridoxina HCl.....	20 mg		
	Ácido Para-aminobenzoico.....	20 mg		
	Niacina.....	20 mg		
	l-inositol.....	20 mg		
	Cloro colina.....	200 mg		

3. JUSTIFICACIÓN

Son pocos los trabajos desarrollados con el fin de determinar el lugar de síntesis del ácido carmínico, sin embargo existen observaciones que indican su posible producción en la región del aparato reproductor; algunas de estas son las hechas por Aquino *y col* (2002), que menciona la presencia de cromatocitos unidos al ovariolo (región entre el germinario y el ovocito), en donde se han detectado pequeños canales, lugar donde Tremblay (1989) ha ubicado como posible sitio de transferencia de los microorganismos simbiotes a la siguiente generación en algunos insectos, y los cuales se especula tienen relación con la producción del pigmento en la grana cochinilla. Por ello resulta necesario como primer parte, evaluar medios de cultivo para el establecimiento del aparato reproductor y, mediante la observación directa, validar dichas observaciones.

4. HIPÓTESIS

La observación directa al órgano reproductor de las hembras de la grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa), inmerso en medio para cultivo de tejidos animales, permitirá determinar la viabilidad y permanencia del ácido carmínico, así como su posible producción.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Determinar la relación del aparato reproductor de *Dactylopius coccus* Costa en sus dos estadios, ninfa II y adulta oviplena, con respecto a la producción del ácido carmínico, con base en tres medios de cultivo.

5.2 Objetivos particulares

- a) Establecer un medio de cultivo idóneo para mantener *in vitro* el aparato reproductor femenino.
- b) Determinar el tiempo de permanencia del ácido carmínico "*in vitro*".
- c) Determinar si hay una producción de pigmento en el tejido establecido.

• ADULTAS OVIPILENAS

El análisis de varianza (ANOVA) mostró una alta significancia estadística entre los días y las interacciones Contaminación (CONT), Perdida del Pigmento (P/P) y Conservación del Tejido (CT) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de varianza de triple interacción para el número de días, contaminación, pérdida de pigmento y conservación del tejido en adulta oviplena.

FUENTE	G.L.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	P=0.01F
Días	3	29.25000000	9.75000000	139.67	0.0001
Cont*SP	1	75.74270161	75.74270161	1085.03	0.0001
Cont*CT	1	13.43071240	13.43071240	192.40	0.0001
Cont*SP*CT	1	12.06015648	12.06015648	172.76	0.0001
Error	53	3.6997628	0.0698068		
Total	59	134.1833333			

• Prueba de Tukey para Contaminación de tejido

Utilizando la prueba de Tukey (Comparación múltiple de medias) utilizando $p = .01$ se determinó que el medio que mejores resultados arrojó con respecto al menor promedio de contaminación presente fue el medio RPMI-1640, aun sin agregar la cantidad de penicilina requerida (10 ml). En contraste, Grace's, con la media más alta, presentó una mayor cantidad de contaminación (aún al agregarle 10 ml de penicilina por caja de petri) y el período de vida de los tejidos fue corto en general. El medio Dulbecco's no fue viable para los fines buscados (Figura 18). La contaminación en los ejemplares de adultas oviplenas, fue en aumento conforme el transcurso de los días y hasta los 15 días, en general no se presentó contaminación o fue mínima en comparación a los días subsiguientes (30, 45 y 60 días) (Figura 19).

Descubrir el origen de la contaminación suele ser un proceso deductivo, pero es preferible que se lleve a cabo de forma sistemática para reducir al mínimo problemas a futuro (Morgan y Darling, 1995). Uno de los factores involucrados en la contaminación de los germinarios establecidos tal vez se debieron a un mal corte en la grana cochinilla o cochinilla sucia, además de la viabilidad del medio a nutrir estas células ajenas al tejido cultivado. Por otra parte resulta esencial conocer los diversos agentes contaminantes

agregó penicilina (10 ml por caja de petri) para evitar la contaminación de estos.

El medio Grace's, en las primeras etapas fue preparado según las especificaciones del Cuadro 3, aunque después se empleo medio ya preparado (Grace's Insect Medium®; Insect Cell Culture Tested).

b) Disección del insecto

Los ejemplares fueron limpiados con alcohol etílico (95%), cuya finalidad fue quitarle la cera totalmente. La disección del insecto fue realizada en la parte dorsal y longitudinal con ayuda de una hoja de bisturí del número 10, se tuvo cuidado de que el corte no fuera muy profundo y se tomó al insecto con unas pinzas de disección para evitar el movimiento (Figura 12 a). Se hicieron lavados constantemente con agua desionizada para quitar el exceso de pigmento y tejido graso (Figura 12 b). Con los alfileres se fijó al insecto en el papel filtro (Figura 12 c) para que de esta manera quedará abierto y expuesto el órgano interno de reproducción (Figura 12 d y e); éstos fueron extraídos y después se establecieron en los tres diferentes medios de cultivo (RPMI 1640, Dulbecco's y Grace's) que se colocaron en agitación constante (aproximadamente a 30 rpm) (Figura 12 f). Toda manipulación se realizó bajo el microscopio estereoscópico dentro de la campana de flujo laminar tipo II Novatech®.

Las disecciones se realizaron en las siguientes fechas:

Bloque I: 29 de mayo de 2003

Bloque II: 04 de junio de 2003

Bloque III: 27 de junio de 2003

Bloque IV: 23 de julio de 2003

Bloque V: 07 de agosto de 2003

c) Incubación del tejido

Los cultivos se mantuvieron a temperatura constante y se evitó en lo posible la apertura de las cajas de petri en cualquier circunstancia para minimizar cualquier factor que pudiera alterar el desarrollo normal del tejido cultivado. Además de evitar la contaminación, otros de los factores que podían alterar al tejido fue la agitación, la cual, aunque normalmente fue constante, después de un tiempo el tejido se volvía más frágil, por lo que se tuvo que disminuir la velocidad.

d) Toma de datos

Cada una de las cajas de petri se rotuló para cada tratamiento con tipo de medio, fecha y estadio de la grana cochinilla. De esta manera se mantuvieron en observación continua y se registraron los cambios observados tanto directamente de la caja de petri como a través del microscopio estereoscópico (a los 15, 30, 45 y 60 días); para lo cual se establecieron tres criterios de evaluación: Contaminación (CONT), Pérdida del Pigmento (P/P) y Conservación del Tejido (CT).

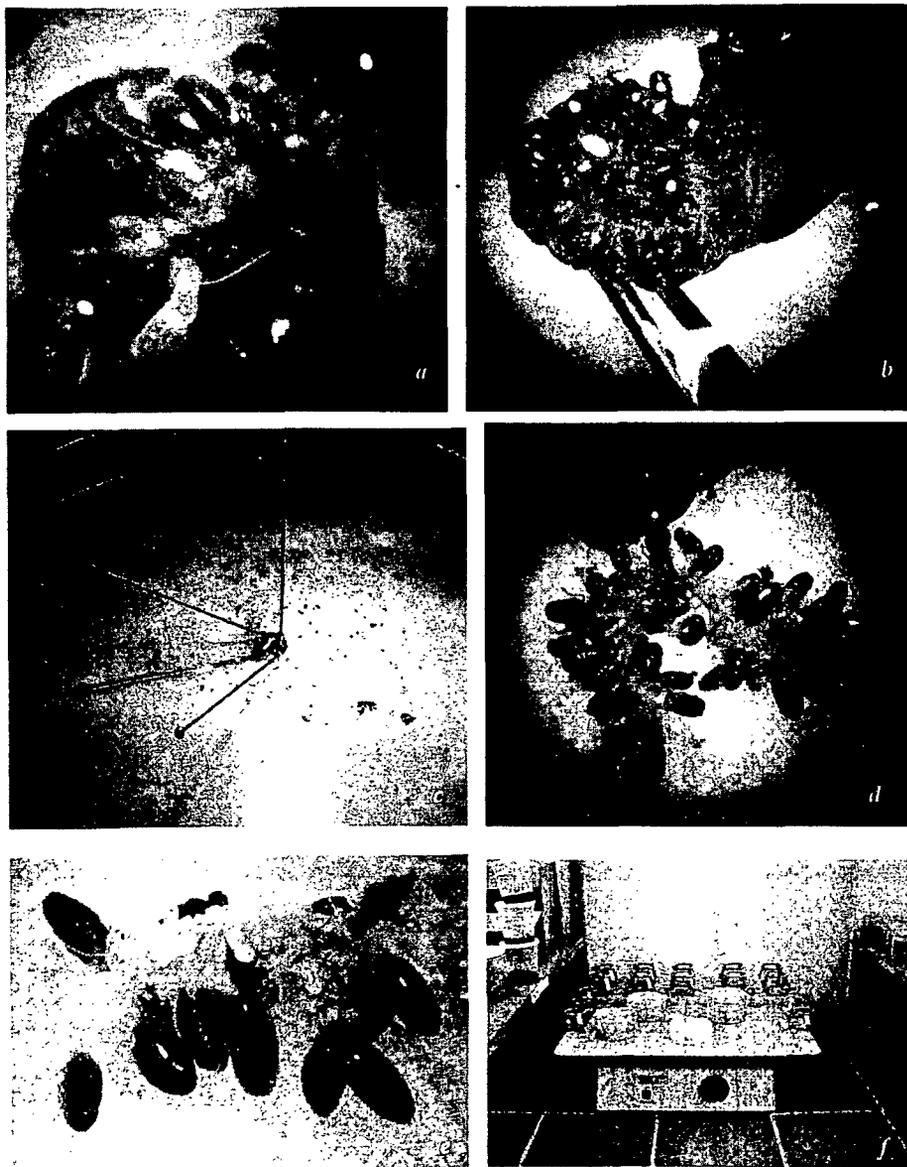


Figura 12: Pasos en la disección de la grana cochinilla: a) Corte dorso-longitudinal; b) Lavado del germinario; c) fijación del insecto con alfileres de disección; d) Germinario expuesto; e) Vista del germinario completo; f) Tejido en agitación.

6.3.2. Diseño Experimental

Los datos fueron examinados con un análisis de varianza (ANOVA) simple de triple interacción, con un nivel de significancia del 99% y prueba de Tukey. Con ayuda del programa SAS® (Ver 6.3, 1985).

Cada medio constituyó una variable, con dos estadios (Ninfa II y Adulta oviplena) con cuatro repeticiones cada una (Cuadro 4).

Cuadro 4. Diseño experimental empleado (Factorial 2 x 3).

<i>Estadios</i>	TIPOS DE MEDIO											
	RPMI 1640				Dulbecco's				Grace's Insect Medium			
<i>Ninfa II</i>	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>Adulta</i>	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

► NINFA II

El análisis de varianza (ANOVA) mostró una alta significancia estadística entre los días y las interacciones Contaminación (CONT), Pérdida del Pigmento (P/P) y Conservación del Tejido (CT) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza de triple interacción para el número de días, contaminación, pérdida de pigmento y conservación del tejido en ninfa II.

FUENTE	G. L.	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	Valor de F	P=0.01
DIAS	3	18.85000000	6.28333333	191.98	0.0001
CONT*SP	1	78.19193592	78.19193592	2389.08	0.0001
CONT*CT	1	4.81088496	4.81088496	146.99	0.0001
CONT*SP*CT	1	7.39588227	7.39588227	225.97	0.0001
Error	53	1.7346302	0.0327289		
Total	59	110.9833333			

• Prueba de Tukey para Contaminación del tejido

Con la prueba de Tukey (diferencia mínima significativa) con $p = .01$ (Ver apéndice) se observó que el medio RPML-1640 mostró menor cantidad de contaminación, seguido de Dulbecco's; a diferencia del medio Grace's, que presentó un mayor grado de agentes contaminantes (Figura 13). En lo referente a las interacciones fue evidente que la contaminación va estrechamente ligada a la pérdida de pigmento y consecuentemente a la desintegración del tejido. Asimismo los resultados arrojaron que a los 15 días la contaminación es mínima, y a los 30, 45, ó 60 días el cultivo presenta mayor contaminación, pues hay una presencia exponencial de agentes contaminantes en el mismo (Figura 14). La contaminación observada en la grana cochinilla en estadio de ninfa II, pudo estar relacionada con los efectos tóxicos provocados por la alta actividad de la Feniloxidasas (PO) (Surumaran y col., 2000) y la aglicona del ácido carmínico, la antraquinona. Este último compuesto es extensivamente usado por los insectos como disuasivo contra sus depredadores (Kunze y col., 1996) y como antibiótico contra microorganismos patógenos. La actividad de PO es muy tóxica para el mismo insecto por

lo que esta enzima normalmente se encuentra aislada en estructuras celulares especializadas (Sugumaran y col., 2000) que probablemente se rompieron por acción de algún compuesto del medio, o por la inmadurez del organismo, liberándolo, en condiciones *in vitro*, ocasionando que los cultivos degeneraran rápidamente por la elevada actividad de la feniloxidasas (PO) y la aglicona del ácido carmínico. Sin embargo, también es probable que algunos de los componentes del medio, o la alta acidez debido a la adición del ácido acetil-salicílico en interacción con los ácidos orgánicos, provocaran la inactivación tanto de la enzima, como una baja en la acción de la penicilina, permitiendo así una presencia mayor de agentes contaminantes. La contaminación por hongos fue la más recurrente (aún al agregar 10 ml de penicilina al medio), estos fueron particularmente reconocibles por presentar largas hifas que confieren a nivel macroscópico, un aspecto algodonoso (Morgan y Darling, 1995) (Figura 16 d y e).

- **Prueba de Tukey para pérdida de pigmento**

La pérdida de pigmento en el medio Dulbecco's (Figura 15) y Grace's (Figura 16) no presentó una diferencia significativa, mostrándose por lo tanto, no muy favorables para los objetivos del experimento. El medio RPMI-1640 (Figura 17) mostró la media más baja y, consecuentemente, una mayor conservación de la pigmentación en el tejido establecido (con 30 mg de AAS) (Ver apéndice) (Figura 13). Con respecto a la pérdida del pigmento en relación a los días transcurridos se observó, que entre los 15 y 30 días hubo una mejor conservación del pigmento en los tejidos de grana cochinilla ninfa II, y en los días posteriores a estos eventualmente se fue perdiendo (Figura 14 y 15). Existen pocos trabajos enfocados a la citología de la cochinilla, sin embargo, Aquino y col. (2002) mencionaron que los análisis citológicos sugieren que en los últimos 20 días del desarrollo de la hembra ocurren cambios significativos que afectan directamente la concentración del colorante. Aparentemente desde el periodo de hembra inmadura, la frecuencia de cromatocitos en las muestras de hemolinfa se incrementa considerablemente hasta su máxima frecuencia en el periodo de inicio de la embriogénesis (Aquino y col., 2002); tomando en cuenta que los cromatocitos cumplen una función de transporte, se intuye que el nivel de producción del pigmento va en aumento proporcional a la madurez de las células que componen la estructura encargada de la síntesis del metabolito (tomando el aparato reproductor como

posible lugar de producción) lo que podría explicar la duración del pigmento de la cochinilla ninfa II, en comparación con la adulta oviplena. Por otra parte, también se observó que algunas células son altamente reactivas a soluciones que contienen calcio, por lo que se especula que la pérdida de pigmento es por esta causa;

• *Prueba de Tukey para Conservación del tejido*

El tejido se conservó en mayor cantidad en el medio RPMI-1640, que mostró una media alta, seguido de Dulbecco's. En el medio Grace's, la conservación del cultivo fue mínima y por lo tanto no efectiva para el experimento (Figura 13). La desintegración del tejido se dio de forma exponencial, mostrando que a partir de los 15 días la conservación del tejido fue en decrecimiento, observándose que a los 60 días, en general, el tejido necrosó por completo (Figura 14). Es probable que algunos de los componentes del medio, o la alta acidez debido a la adición del ácido acetil-salicílico en interacción con los ácidos orgánicos normalmente encontrados, como lo son los asociados con el ciclo de los ácidos tricarbónicos provocaron la desintegración del tejido (Llanderal, s.f.). Otro de los factores que afectaron a los tejidos es la agitación constante en que se encontraban, pues aunada a la presencia de agentes contaminantes, se provocó una disgregación del tejido, puesto que estos se encuentran relacionados estrechamente con la conservación del cultivo. (Figura 15 e).

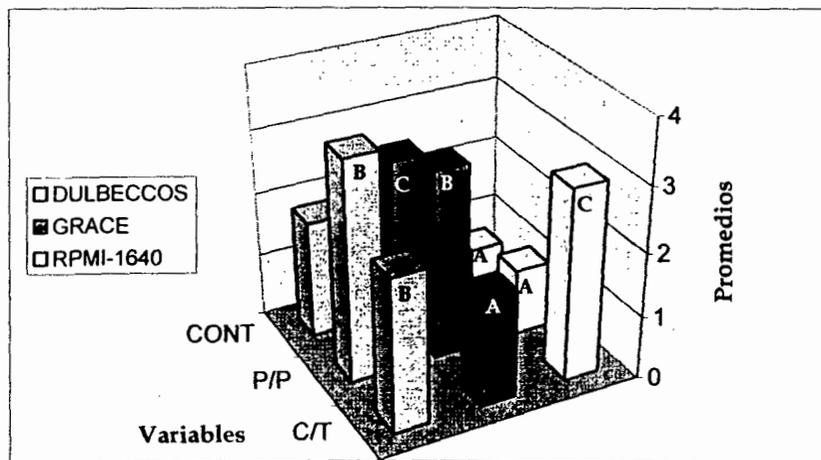


Figura 13: Prueba de Tukey para ninfa II en relación a la respuesta de los medios con los tejidos establecidos ($\alpha = 0.1$).

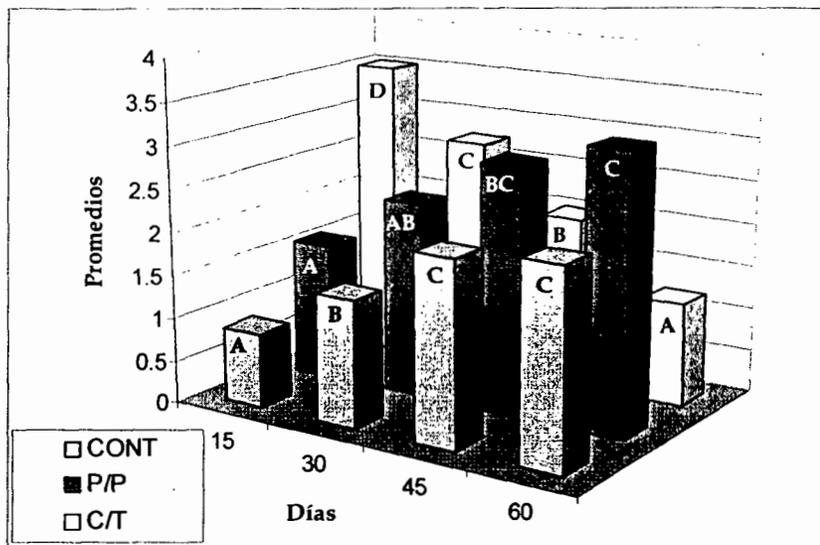


Figura 14. Prueba de Tukey para el establecimiento del tejido para ninfa II en relación a 15, 30, 45 y 60 días de establecido el tejido ($\alpha = 0.1$).

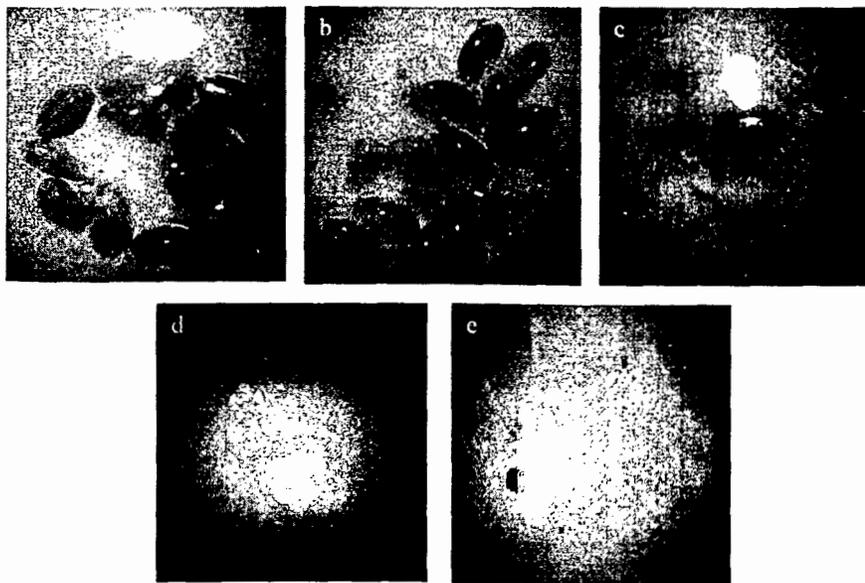


Figura 15. Vista del aparato reproductor de la hembra de *Dactylopius coccus* Costa (Ninfa II), en medio de cultivo Dulbecco's. a) segundo día; b) 15 días; c) 30 días; d) 45 días y e) 60 días después de establecido.

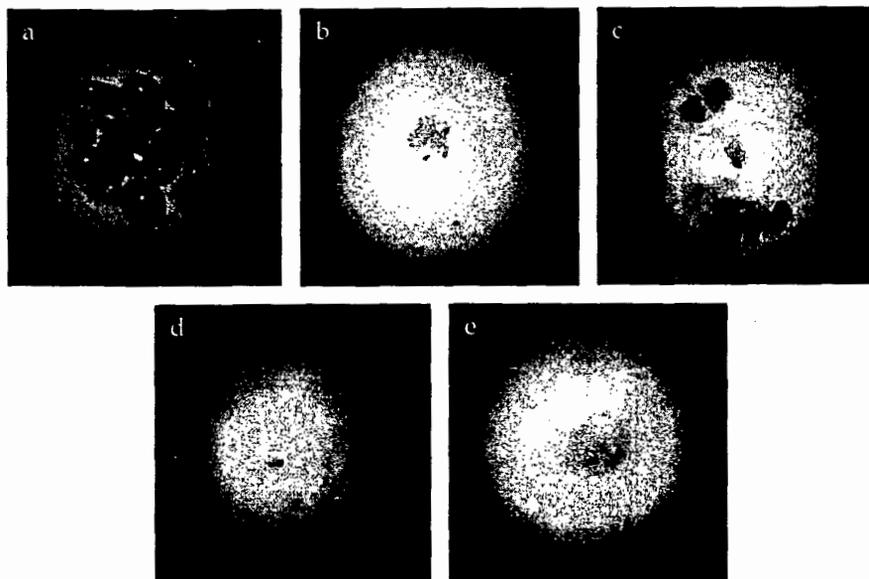


Figura 16. Vista del aparato reproductor de la hembra de *Dactylopius coccus* Costa (Ninfa II), en medio de cultivo Grace's. a) segundo día; b) 15 días; c) 30 días; d) 45 días y e) 60 días después de establecido.

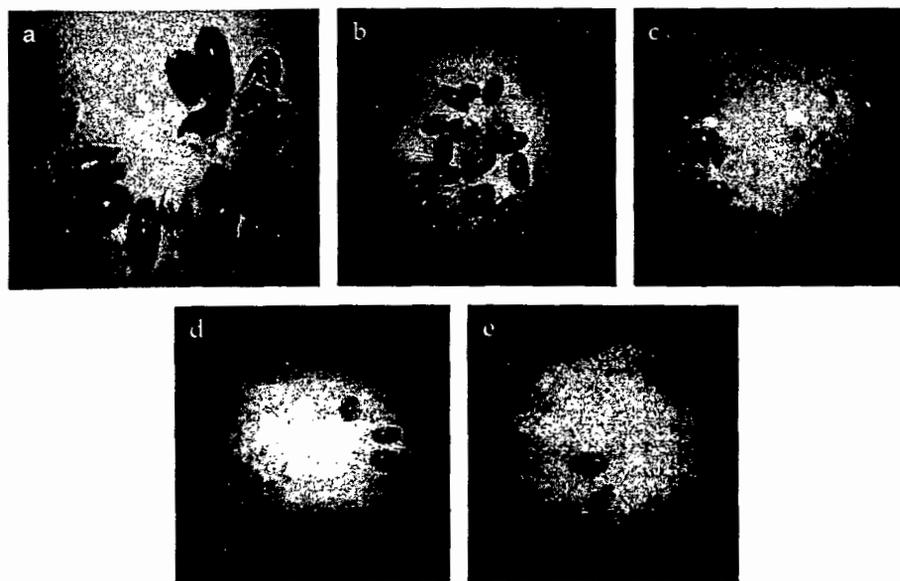


Figura 17. Vista del aparato reproductor de la hembra de *Dactylopius coccus* Costa (Ninfa II) en medio RPMI-1640. a) 6 días; b) 15 días; c) 30 días; d) 45 días y e) 60 días de establecido el tejido.

- **ADULTAS OVIPILENAS**

El análisis de varianza (ANOVA) mostró una alta significancia estadística entre los días y las interacciones Contaminación (CONT), Pérdida del Pigmento (P/P) y Conservación del Tejido (CT) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de varianza de triple interacción para el número de días, contaminación, pérdida de pigmento y conservación del tejido en adulta oviplena.

FUENTE	G.L.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	P=0.01F
Días	3	29.25000000	9.75000000	139.67	0.0001
Cont*SP	1	75.74270161	75.74270161	1085.03	0.0001
Cont*CT	1	13.43071240	13.43071240	192.40	0.0001
Cont*SP*CT	1	12.06015648	12.06015648	172.76	0.0001
Error	53	3.6997628	0.0698068		
Total	59	134.1833333			

- **Prueba de Tukey para Contaminación de tejido**

Utilizando la prueba de Tukey (Comparación múltiple de medias) utilizando $p = .01$ se determinó que el medio que mejores resultados arrojó con respecto al menor promedio de contaminación presente fue el medio RPMI-1640, aun sin agregar la cantidad de penicilina requerida (10 ml). En contraste, Grace's, con la media más alta, presentó una mayor cantidad de contaminación (aún al agregarle 10 ml de penicilina por caja de petri) y el periodo de vida de los tejidos fue corto en general. El medio Dulbecco's no fue viable para los fines buscados (Figura 18). La contaminación en los ejemplares de adultas oviplenas, fue en aumento conforme el transcurso de los días y hasta los 15 días, en general no se presentó contaminación o fue mínima en comparación a los días subsiguientes (30, 45 y 60 días) (Figura 19).

Descubrir el origen de la contaminación suele ser un proceso deductivo, pero es preferible que se lleve a cabo de forma sistemática para reducir al mínimo problemas a futuro (Morgan y Darling, 1995). Uno de los factores involucrados en la contaminación de los germinarios establecidos tal vez se debieron a un mal corte en la grana cochinilla o cochinilla sucia, además de la viabilidad del medio a nutrir estas células ajenas al tejido cultivado. Por otra parte resulta esencial conocer los diversos agentes contaminantes

(bacterias, hongos, levaduras y micoplasmas) para poder intervenir de manera adecuada. Algunos de los cultivos se tornaron amarillos o presentaron turbidez, a los que Morgan y Darling (1995) describen como colonias bacterianas, las cuales utilizan los nutrientes del medio y eliminan productos de desecho, volviendo al mismo extremadamente ácido. Asimismo se presentaron algunas contaminaciones por hongos, los cuales se diseminan por aire, y por tanto, es difícil evitar que se introduzcan en los cultivos una vez que han invadido la campana o la estufa.

- **Prueba de Tukey para Pérdida de Pigmento**

El medio RPMI-1640 presentó la media más baja [en comparación con Dulbecco's y Grace's, que demostraron por mucho ser los menos efectivos para preservar el pigmento (Figura 18)]; al agregarle 30 mg de ácido acetil-salicílico (AAS) se logró un mantenimiento del pigmento en el tejido establecido en este medio por un periodo de tiempo mayor, además de que se conservó el mismo en la mayoría de las células por el tiempo de vida que el tejido tuvo. Se observó que el medio Dulbecco's, al agregarle el ácido acetil-salicílico (30 mg) y la penicilina (10 ml), no fue viable para el mantenimiento del tejido, puesto que éste perdió el pigmento con facilidad (Figura 20). Por otro lado Grace's conservó el pigmento en el tejido por más tiempo que Dulbecco's, al agregarle 30 mg de ácido acetil-salicílico, el cual se pudo apreciar aún con el avance de la contaminación. Se observó que en los tejidos se generó un oscurecimiento gradual y finalmente el tejido necrosó (Figura 21).

Los datos analizados (ver apéndice) muestran con $p = .01$, que los 15 primeros días son ideales para la conservación del pigmento, y hasta los 30 días no existe gran diferencia de los promedios; en cambio, a 45 y 60 días la pérdida del pigmento es casi total (Figura 19).

Las observaciones hechas por de Aquino y col. (2002) podrían explicar la duración del pigmento en la cochinilla adulta oviplena, se menciona que el desarrollo de los ovocitos y huevos se acelera desde la fase de hembra sexualmente inmadura (de 12 a 18 días después de la segunda muda) a la hembra sexualmente madura. De esta fase a la de la hembra oviplena se observó una fuerte reducción de cromatocitos (de 11, 459 a 2, 509

células por mm^3), lo que podría interpretarse como una evidencia de la transferencia del colorante a los huevos. Además específicamente durante el desarrollo del huevo se pudo observar que de la etapa de máximo tamaño del germinario hasta su desaparición, el colorante en los huevos está también confinado dependiendo del estado de desarrollo del huevo, el confinamiento puede ser en vesículas libres o en vesículas agrupadas en bolsas grandes (Aquino y col., 2002).

- *Prueba de Tukey para Conservación del tejido*

De los medios utilizados, la media más baja para la conservación del pigmento la presentó el medio Grace's, seguido de Dulbecco's. Dejando al medio RPMI-1640 (Figura 22) como el más factible para preservar el tejido (Figura 18). Los resultados (ver apéndice) indican con $p = .01$, que entre los 15 y 30 días existe una conservación del tejido considerablemente alta, las medias entre estos días muestran que ambos son adecuados para este fin, sin embargo, a los 30 días ya comienza a haber una desintegración del tejido, aunque no considerable. Entre los 45 y 60 días las medias de ésta variable en particular resultaron bajas, lo que indica que estos dos periodos de tiempo no son viables para conservar el tejido completo (Figura 19).

La conservación del tejido está relacionada con la presencia-ausencia de agentes contaminantes, pues son estos los que ocasionan los cambios en el medio (tanto de pH como de los nutrientes contenidos en el mismo y esenciales para las células establecidas) que con el tiempo ocasionaran la disgregación del tejido por muerte celular (Morgan y Darling, 1995).

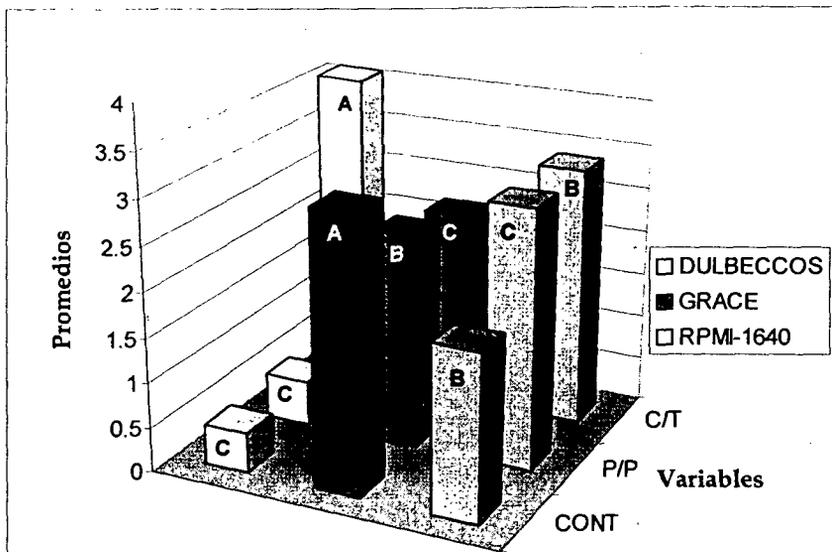


Figura 18. Prueba de Tukey para adultas oviplenas en relación a la respuesta de los medios con los tejidos establecidos ($\alpha = 0.1$).

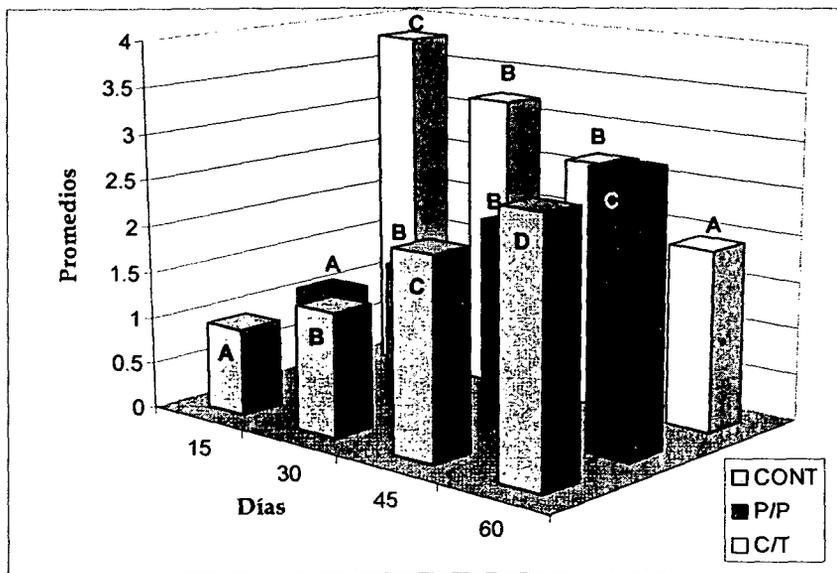


Figura 19. Prueba de Tukey para adultas oviplenas con respecto a los 15, 30, 45 y 60 días de establecido el tejido ($\alpha = 0.1$).

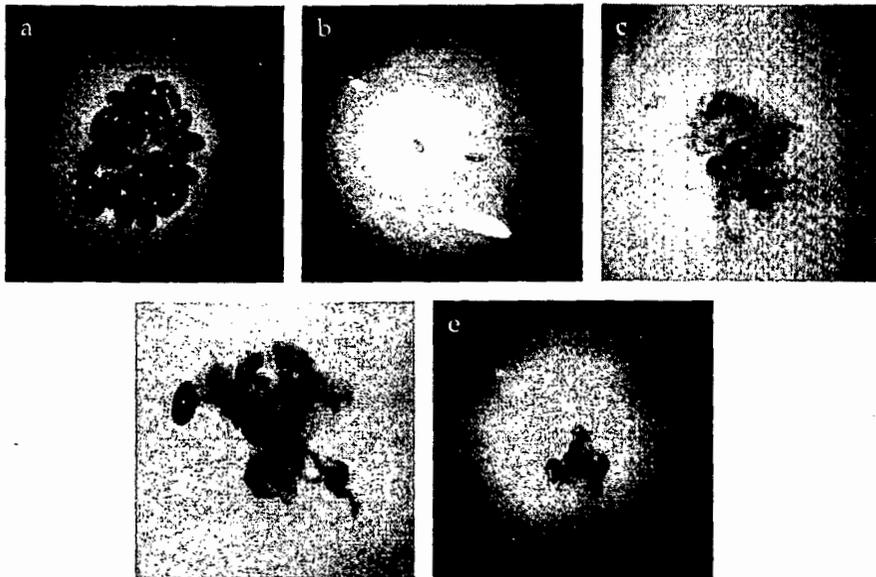


Figura 20. Germinario de grana cochinilla adulta oviplena en medio Dulbecco's. a) Al segundo día de establecido; b) 15 días después; c) 30 días; d) 45 días y e) 60 días.

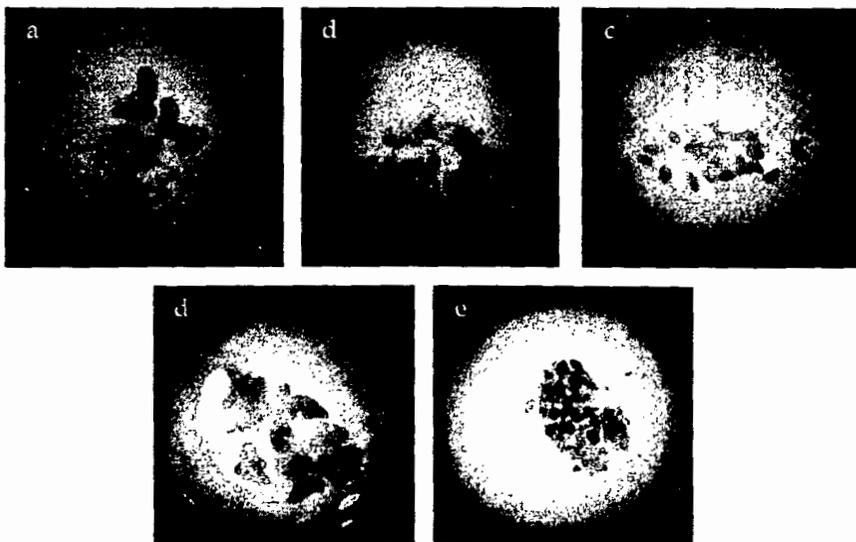


Figura 21. Germinario de grana cochinilla adulta oviplena en medio Grace's. a) Al segundo día de establecido; b) 15 días; c) 30 días; d) 45 días y e) 60 días de establecido.

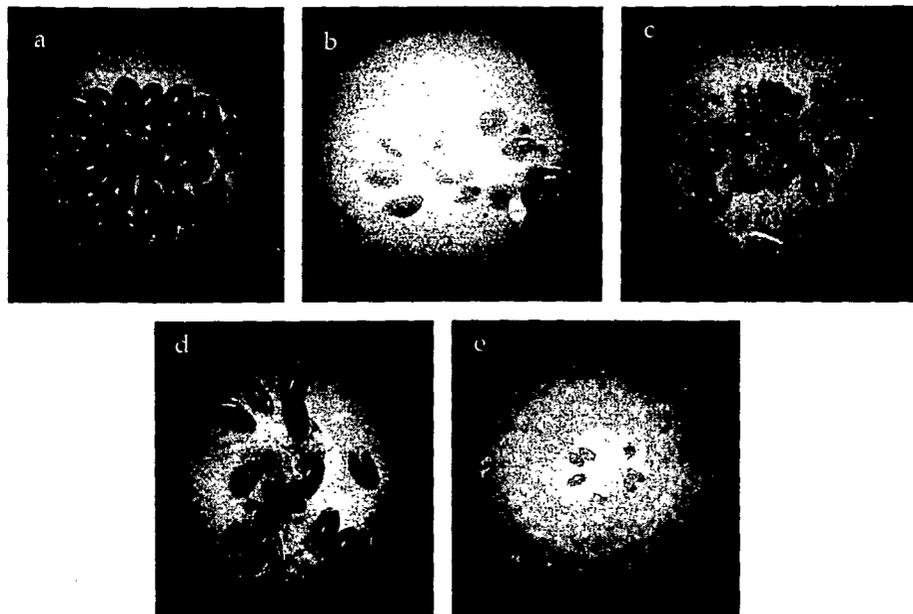


Figura 22: Medio RPMI-1640 en que se observa la conservación tanto del tejido como del pigmento hasta los 60 días. Asimismo no se observan agentes contaminantes en los tejidos. a) Segundo día; b) 15 días; c) 30 días; d) 45 días y e) 60 días.

El oscurecimiento que se presentó en los tejidos establecidos en los medios Dulbecco's y Grace's fue quizás debido al alto nivel de acidez que el medio generaba con el ácido acetil-salicílico sin embargo, en ausencia de éste, el pigmento se conservó sólo pocos días en el medio. Hablando específicamente de medio Grace's, se especula que ésta misma acidez provocó la degradación, en primera instancia del corion (dejando expuestos a los embriones en desarrollo) y posteriormente del germinario (Figura 23). Según Llanderal (2000), en algunos insectos los huevos provistos de materiales nutritivos son retenidos en el aparato genital de la hembra hasta que se encuentran en un estado avanzado de desarrollo y la eclosión tiene lugar muy poco tiempo antes de la ovoposición o durante ésta. El desarrollo de los embriones fue debido quizás a la ovoviviparidad del insecto aunado a una posible inducción de mitosis en las células establecidas por algunos de los componentes del medio, lo que provocó el desarrollo completo del embrión.

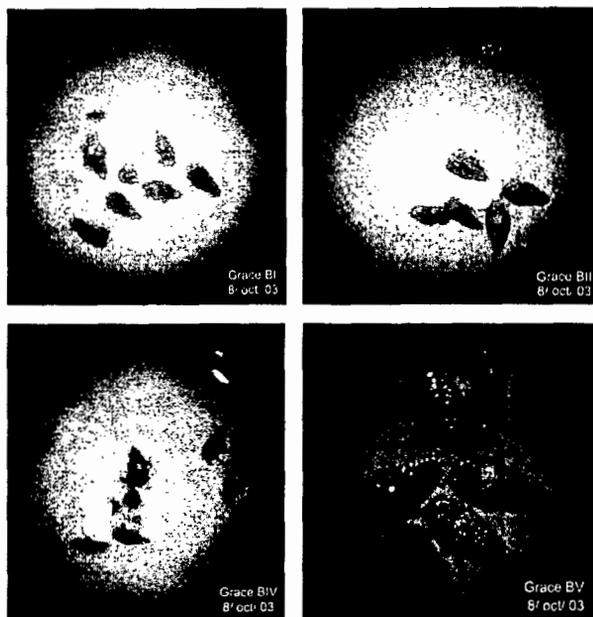


Figura 23: Medio Grace's en las que se observa la exposición del embrión en desarrollo debido a la degradación del corion.

En general, los tejidos establecidos en el medio RPMI-1640, presentaron una mejor conservación de las células, al permanecer el pigmento en la mayoría del tejido establecido. Empero, aunque el pigmento persistió por mucho más tiempo que en los otros medios utilizados, la pérdida del pigmento fue paulatina e inevitable. Sin embargo, al cabo de aproximadamente 60 días, en algunas de las células se conservó el pigmento intacto (Figura 24 b, c y d), incluso en algunas hubo un resurgimiento de coloración (después de 90 días de establecido el germinario), lo que podría indicar una producción autónoma (Figura 24 a y e).

Aunque son pocas las evidencias citológicas que sugieren que el colorante es sintetizado en el ovicito a partir de los precursores recibidos del germinario, Aquino *y col.* (2002) observaron ocasionalmente, algunos cromatocitos presumiblemente unidos al cuello del ovariolo, esto es entre el germinario y el ovocito, región del ovocito donde se

han detectado pequeños canales, y es en éste punto del ovocito donde Tremblay (1989) ha ubicado como el sitio de transferencia de los microorganismos simbioses a la siguiente generación de algunos insectos; tomando en cuenta lo dicho anteriormente y el fenómeno de resurgimiento de coloración que se observó en el medio RPMI-1640 después de tres meses de establecido el tejido, refuerza la teoría de que la producción del metabolito tiene relación con el aparato reproductor.

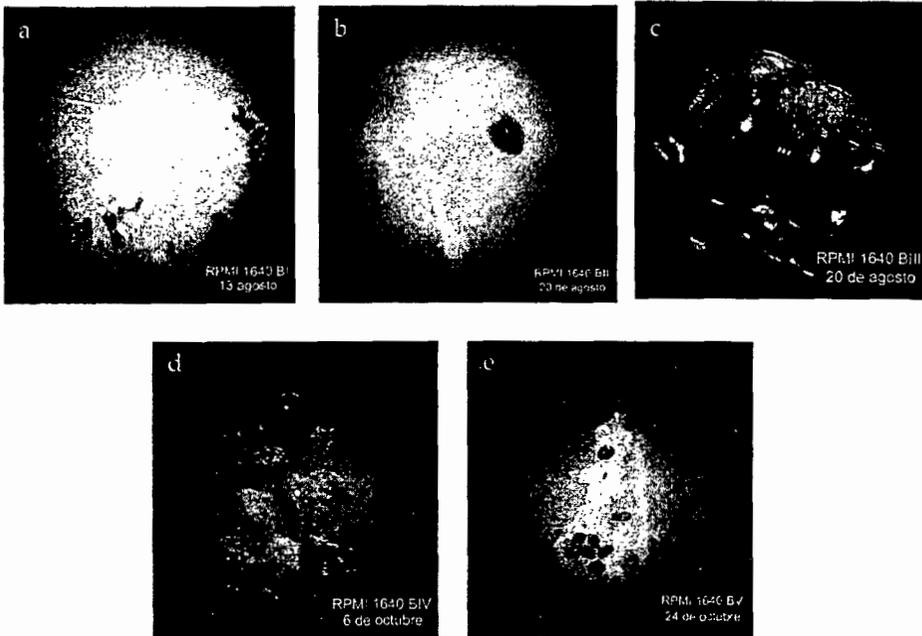


Figura 24: Medio RPMI-1640 después de dos meses aproximadamente de haberse establecido los tejidos (con 30 mg AAS). a) Primer bloque; se observa un resurgimiento de la pigmentación en algunas células y el tejido aun se encuentra en buenas condiciones. b) Se conserva el germinario completo con presencia del pigmento. c) y d) Se percibe como el pigmento se encuentra englobado dentro del corion con una producción tanto en la cochinilla preformada como en la matriz embrional y e) Se observa como algunas células presentan coloración que resurgió

8. CONCLUSIÓN

No se presenta diferencias relevantes en cuanto al estadio de la grana cochinilla utilizada (a excepción del oscurecimiento observado en el medio Grace's con el tejido obtenido de adulta oviplena). En general se concluye lo siguiente:

- ▼ El medio Grace's no es viable de utilizar para los fines buscados, ya que presentó un mayor índice de contaminación, una conservación del pigmento poco aceptable y nula conservación del tejido (aun agregando la cantidad de penicilina y ácido acetil-salicílico requeridas).
- ▼ El medio Dulbecco's es susceptible a la presencia de agentes contaminantes, con baja conservación del tejido y de pigmento (aun agregando la cantidad de penicilina y ácido acetil-salicílico requeridas).
- ▼ El medio RPMI-1640, aunque es un medio diseñado originalmente para el cultivo de células de invertebrados, al realizar las modificaciones como el agregar ácido acetil-salicílico y penicilina (mencionado en la metodología), se obtiene una respuesta favorable con respecto a la ausencia de agentes contaminantes, así como en la conservación tanto del tejido como del pigmento, fines buscados en el experimento. Los resultados indican que el medio RPMI-1640 (el cual cumplió mejor con los objetivos del experimento) funciona de una manera óptima con el tejido de la grana cochinilla oviplena.
- ▼ El fenómeno de resurgimiento de coloración en algunas regiones del tejido establecido muestra que en realidad hay una relación estrecha entre el aparato reproductor interno de la grana cochinilla y la producción del ácido carmínico, al menos en las condiciones manejadas en el presente trabajo.
- ▼ El estadio de ninfa II se mantuvo en el medio RPMI-1640, mas no arroja resultados relevantes.

Aunque los resultados ya han mostrado las variaciones de los medios, se considera que es necesario continuar con la experimentación para determinar las causas de estas diferencias y el tipo de función que podría tener cada uno de los medios. Cabe recalcar que es muy importante ahondar en las razones por las que en el medio RPMI-1640 se presenta el fenómeno de resurgimiento de la pigmentación, por medio de técnicas más específicas como lo son celulares y molecularès, lo anterior con el fin de determinar si es ocasionado por una producción autónoma en el tejido y, por ende, los procesos que se ven implicados en el mismo.

9. LITERATURA CITADA

- Alevi, P., M. Anastasia, S. Binham, P. Ciuffreda, A. Fiecchi, G. Cighetti, M. Muir, A. Scaa, y J. Tyman.** 1996. Síntesis of carminic acid, the colourant principle of cochineal. *Journal of chemical society., Pearking trans.* (1): 575-582.
- Aquino P., G., y N. M. Barcenás.** 1999. Cría de la cochinilla para la producción de grana y sus posibilidades de resurgimiento en México. *En: Aguirre R. J. R. y J. A. Reyes Agüero (eds.) VII Congreso Nacional y VI Internacional sobre el conocimiento y aprovechamiento del nopal.* Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Pp. 275. - 307.
- Aquino P., G., N. M. Barcenás C. y J. Valdez C.** 2002. Avances en la citología de la cochinilla del nopal en condiciones *in vivo* e *in vitro* y su biología reproductiva. *En: Portillo, L. Y A. L. Viguera (editores). Memoria del II Congreso Internacional de Grana Cochinilla y Colorantes Naturales y II Reunión Internacional del Grupo de Trabajo en Cochinilla, Castusnet - FAO.* Universidad de Guadalajara, México. Pp. 275. - 307.
- Aquino, G. y N. M. Bárcenas.** 2002. Reproductive biology and genetic of cochineal insect (*Dactylopius* ssp). *En: CACTUSNET Newsletter.* Issue No. 7. 2002. Pp. 6-8
- Bárcenas N. M. y G. Aquino.** 1997. In Vitro Culture of *Dactylopius Coccus* Costa (Homoptera: *Dactylopiidae*): Potential Production of the Natural Dye Carminic Acid. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* (33): 21.
- Bonilla B., G. A.** 1999. Cultivo de cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) (Homoptera: *Dactylopiidae*) en dos ambientes y tres métodos de infestación en Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. México. Tesis Profesional. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. México. 39p.

- Bustamante-Murillo, O. F.** 1997. Dactilocultura (cultivo de cochinilla), *Dactylopius coccus* Costa. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho, Perú. 40p.
- Brana, P.** 1964. Aboriginal dyestuff from Nueva España. *En: Memorias del XXXVI Congreso Internacional de Americanistas. Department of Geography. The University of Texas, Austin, Texas.* Pp 77-91.
- Briseño G., A.** 2001. Contenido de ácido carmínico en la grana cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) en relación con su edad y fecundación, e influencia de la clasificación y secado. Tesis Maestría, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. México. 80p.
- Chapman, R. F.** 1975. The insects structure and function. Elsevier. Londres, Inglaterra. 819p.
- Cremades I., I. y L. Romero Z.** 1997. Cultivo y Aprovechamiento de la grana cochinilla en México. *En: Memorias del VII Congreso Nacional, V Internacional sobre Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. Monterrey, Nuevo León, México.* Pp. 180-181.
- Cromartie, R. I. T.** 1959. Insect pigments. *En: Annual review of entomology.* (4): 59-61.
- Danzing, E. y Kerzhner, I.** 2001. Hemiptera, Homoptera, Sternorrhyncha. *En: Memorias del IX International Symposium on Scale Insect Studies. Padua, Italia.* Pp. 41-45.
- Dahlgren, B.** 1990. La grana cochinilla. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Investigaciones Antropológicas. México. Pp. 9-11.
- De Haro, M. E. y L. E. Claps.** 1998. Contribución para el aprovechamiento de la familia *Dactylopiidae* de la Republica Argentina. *En: Memorias del Primer Congreso*

Internacional de Grana Cochinilla y Colorantes Naturales. Oaxaca, México. Pp. 47-48.

Del Río D., I. 1992. Importancia Histórica y actual de la grana cochinilla. *En*: Memorias del V Congreso Nacional, III Internacional sobre Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, Estado de México. México. Pp. 68-72.

Eisner T., Ziegler, R., McCormick, J. L., Eisner, M., Hoebeke, E. R., y J. Meinwald. 1994. Defensive use of an acquired substance (carminic acid) by predaceous insect larvae. Cornell University, Ithaca. New York. Estados Unidos. Pp. 18-22.

Freshey, R. I. 2000. Cultura of animal cells. A manual of basic technique. 4th edition. CRC Department of medical oncology. University of Glasgow. Ed. Wiley - Liss. Canada. Pp. 10-12.

García, Fernando., H. Lanz., A. Rojas y F. Hernández. 2002. Efecto de inhibidores de la síntesis de prostaglandinas en la coagulación del homóptero *Dactylopius coccus* (cochinilla del nopal). Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. Pp 22-27.

Hernández A., O. R. 1998. Aprovechamiento de la grana o cochinilla del nopal (*Dactylopius coccus* Costa). Tesis profesional. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F. 59p.

Joshi, P. A. y P. L. Lambdin. 1996. The ultrastructure of haemocytes in *Dactylopius confusus* (Cockerell), and the role of granulocytes in the synthesis of cochineal dye. *En*: Protoplasma (192): 199-216.

Kunze, A., L. Witte, M. Aregullin, E. Rodriguez y P. Proksch. 1996. Anthraquinones in the leaf beetle *Trirhabda geminata* (Crysomelidae) Z. Naturforsch. (51): 249-252.

- Lambdin, P. L., G. P. Aquino, J. F. Green, y M. Soto-Hernández.** 2002. Synopsis of carmine acid biosynthesis. *En: CACTUSNET Newsletter.* (7): 11-13.
- Llanderal C., C.** 2000. Introducción a la fisiología de insectos. Colegio de posgraduados. Montecillo, Texcoco. México. Cap. 9. Pp. 163-184.
- Llanderal C. y R. Nieto H.** s.f. Programa analítico del curso de fisiología de insectos. Colegio de posgraduados. Montecillo, Texcoco. México. Cap. 9. 324p.
- Llanderal C., Almada C., Campos, M., Nieto, R., Palacios, C., García, M.** 2003. Investigación en grana cochinilla en México. *En: Memorias de la XLV Convención Nacional de Entomología.* Ayacucho, Perú. Pp. 177-180.
- Mann, J.** 1969. Cactus-feeding insects and mites. *En: U. S. National Museum Bulletin* (256): 137-150.
- Marin, L., R. y F. Cisneros.** 1977. Biología y morfología de la cochinilla del carmín, *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: *Dactylopiidae*). *Revista Peruana de Entomología* (20): 115-121.
- Maza B., Landy.** 1999. Aspectos biológicos de la grana cochinilla del nopal (*Dactylopius coccus* Costa) y métodos de infestación. México. Tesis de Residencia Profesional. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 29. 27p.
- Méndez G., S. J., G. Aquino P. y A. Moreno Q.** 1998. Producción de grana-cochinilla fina (Homoptera: Dactylopiidae: *Dactylopius coccus* Costa) bajo diferentes condiciones de sombreado en el Altiplano Potosino-Zacatecano. *En: Resúmenes de la IV Reunión Nacional Sobre conocimiento y Aprovechamiento del nopal. II Congreso Internacional.* Zacatecas, Zacatecas, México. Pp 46-52.

- Montiel R., M. Lucia.** 1995. Morfología de *Dactylopius coccus* Costa (Homóptera: *Dactylopiidae*), y su biología y reproducción en dos fotoperiodos. Tesis profesional. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. México. 74p.
- Mora I., A.** 1996. Extracto rojo de cochinilla: Estudio de las condiciones de extracción y su importancia como colorante natural. Tesis Profesional. Facultad de Química, UNAM. México. 47p.
- Morgan S. J., D. C. Darling.** 1995. Cultivo de Células Animales. Editorial Acribia, S. A. España. 155p.
- Morales, M. A.** 1994. Estudio del ciclo biológico de la cochinilla silvestre (*Dactylopius* sp.). Tesis profesional. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. México. 41p.
- Padro B., E. y Valdéz carrasco, J.** 1990. Morfología de insectos. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. México. 393p.
- Pereira de A., G. y J. F. Wuarumby.** 1998. Reproducción partenogénica de la cochinilla *Dactylopius coccus* (Homoptera: *Dactylopiidae*) para la producción de hembras. En: Memorias del I Congreso Internacional de Grana Cochinilla y Colorantes Naturales. Oaxaca, México. Pp 11-13.
- Pérez-Guerra, G., y Kosztarab.** 1992. Biosystematics of the family Dactylopiidae (HOMOPTERA: COCCIDEA) with emphasis on the life cycle of *Dactylopius coccus* Costa: Studies on the Morphology and Systematics of Scale Insects No. 16. Bulletin 92-1. Virginia Agricultural Experiment Station, Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia. Pp 90-101.
- Portillo, L.** 1992. Infestación óptima de cladodios aislados del nopal *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. con grana cochinilla *Dactylopius coccus* Costa. Tesis profesional, Facultad de Agronomía. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. México. 57p.

- Portillo, L. y A. L. Vigueras.** 2003. Cría de Grana Cochinilla. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. México. 51p.
- Quezada, Q. E.** 2001. Caracterización y frecuencia de estructuras celulares relacionadas con la producción del colorante rojo cármín, en la cochinilla del nopal *Dactylopius coccus* Costa. Tesis de Licenciatura. Universidad Tecnológica de Tecámac, Tecámac, Estado de México. 110p.
- Randich, J. A.** 1975. Ensayo tecnológico para la obtención del extracto de la cochinilla en polvo. Tesis profesional. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 158p.
- SAS Institute.** 1988. SAS/STAT user's guide, versión 6.03 ed. SAS Institute, Cary, NC.
- Sing de U., O. L.** 1997. Colorantes naturales. Fondo editorial. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, Perú. 274p.
- Sugumaran M., K. Nellaiappan y K. Valivittan.** 2000. A new mechanism for the control of phenoloxidase activity: Inhibition and complex formation with quinine isomerase. Archives of Biochemistry and Biophysics. (379): 252-260.
- Tremblay, E.** 1989. Coccoidea endocytobiosis. En: W: Schwemmler, G. Gassener (eds) Isect endocytobiosis: Morphology, Physiology, Genetics and Evolution. Boca Raton, Fla. Pp. 145-173.
- Varma, R., M. G.; Pudney, M.; y Leake, C. J.** 1979. Methods in mosquito cell culture. En: Practical Tissue Applications. Maramorosc. Estados Unidos de Norte America. Pp. 331-349.

- Vigueras G., A. L. 1992. Influencia de los macro y microelementos en el desarrollo, crecimiento y producción de la grana o cochinilla *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: *Dactylopiidae*). Tesis profesional. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. México. 75p.
- Vigueras G., A. L. 1998. Producción de cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) y condiciones de extracción del pigmento. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. México. 89p.
- Vigueras G., A. L., y L., Portillo M. 1995. La grana cochinilla, un recurso natural. *Agrocultura*. Vol. 6(35): 35-36.
- White R., Phillip. 1989. The cultivation of animal and plant cells. The Ronald Press Company. New York, Estados Unidos. Pp 70-77.
- Zapata, M. 1970. Entomología General. Universidad Nacional Agraria. La Molina. Lima, Perú. 557p.
- Zimmermann, H. G. 1989. The utilization of an invader cactus weed as arto for an integrated control approach. Proceedings of the VII Symposium on Biological Control of Weeds. Roma, Italia. Pp. 429-432.

10. LITERATURA CONSULTADA

- Aramayo, A. J. y Fernández R., R.** 1992. Planta de extracción de carmín a partir de la cochinilla. Tesis Profesional. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia. 102p.
- Aquino P., G.** 1991. Estudio cromosómico en cuatro tipos de cochinilla (*Dactylopius spp*) (Homóptera: *Dactylopiidae*) del nopal (*Opuntia ssp*). Tesis de maestría en ciencias. Colegio de postgraduados. Montecillo, México. 106p.
- Bojórquez I, E.** 1990. Colorantes naturales utilizados en alimentos. Tesis profesional. Facultad de química de la U.N.A.M. México. 74p.
- Brown Jn. K. S.** 1975. The chemistry of aphids and scale insects. Chemical Society Review. (4): 45-56.
- Bustamante-Murillo, O. F.** 1990. Manual de producción de la cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) por infestación artificial. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho, Perú. 42p.
- Cruz D., M.** 1990. Determinación de algunos aspectos biológicos de la grana o cochinilla del nopal *Dactylopius coccus* Costa (COCOIDEA: DACTYLOPIDAE) en Chapingo, México. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Chapingo. Texcoco, México. 85p.
- Llanderal C., C. y R. Nieto H.** 2001. Producción de grana cochinilla. Instituto de fitosanidad. Colegio de postgraduados. Montecillo, Texcoco. Estado de México. 140p.

- Medellin S., M. X.** 1994. Extracción del ácido carmínico a partir de la cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) Del nopal. Tesis profesional. Universidad Autónoma de Chapingo. Texcoco. México. 57p.
- Mendez G., D., G. Aquino P., P. Puga J., J. J. Martínez H.** 1997. Cultivo de Grana o cochinilla fina. Colegio de postgraduados. Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí. 17p.
- Nur U.** 1982. Destruction of specific heterochromatic chromosomes during spermatogenesis in the *Comstockiella* chromosomes systems (coccidea: Homoptera). *Chromosoma* (Ber.) Pp. 15-24.
- Zimmerman H. G. y V. C. Moran.** 1991. Biological control of prickly pear, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae), in South Africa. *Agric. Ecosystems and Environment* 37.

11. GLOSARIO

Colorante: Compuestos orgánicos que reflejan y absorben longitudes de onda de luz dentro del espectro visible.

Cladodio: Tallo comprimido o hasta laminar, de color verde, fotosintético de cactáceas.

Dimorfismo sexual. Se le denomina dimorfismo sexual a aquellas especies que presentan una diferencia morfológica marcada entre la hembra y el macho.

Estadio: Fases o etapas por las que pasa cada estado inmaduro durante el desarrollo de los insectos.

Ovariolos: Son tubos dentro de los cuales se desarrollan los oogonios en una serie longitudinal, de manera que el que empieza su desarrollo se encuentra en el extremo anterior que es agudo, y el más desarrollado en el extremo posterior

Parásito: Que vive a costa de otro de distinta especie, alimentándose de él y depurándolo sin llegar a matarlo.

Parasitoide: Insecto que parasita a otros organismos.

Partenogénesis. La partenogénesis o desarrollo de un huevo sin fertilizar se ha registrado para la mayoría de los órdenes de insectos, excepto Diplura, Protura, Odonata, Plecoptera, Dermaptera, Mecoptera y Siphonaptera. Aunque hay algunas similitudes entre los diferentes tipos de partenogénesis, parece que no hay un patrón de evolución, lo que sugiere un desarrollo independiente en los diferentes grupos y por ejemplo Hymenoptera y Homoptera presentan el máximo grado de desarrollo partenogénico. Desde un punto de vista ecológico, la partenogénesis se presenta en áreas donde las condiciones ambientales son menos predecibles y un incremento rápido de la población es ventajoso. La mortalidad en esas áreas es menos dependiente de la densidad debido a la falta de competencia.

Pigmento: Micropartículas de color de cualquier sustancia natural que colorea el tejido de un organismo.

Tampon. Líquido que resiste los cambios de pH.

12. APÉNDICE

NINFA II

❖ CONTAMINACIÓN

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	109.2487032	18.2081172	556.33	0.0001
Error	53	1.7346302	0.0327289		
Corrected Total	59	110.9833333			
R-Square	C.V.	Root MSE	CONT Mean		
0.984370	10.74720	0.180911	1.68333333		

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: CONTAMINACIÓN
 Alpha= 0.1 df= 53 MSE= 0.032729
 Critical Value of Studentized Range= 3.322
 Minimum Significant Difference= 0.1552

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	DIAS
A	2.2667	15	60
A	2.1333	15	45
B	1.4667	15	30
C	0.8667	15	15

❖ PÉRDIDA DE PIGMENTO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Model	6	90.98858549	15.16476425	14.89
Error	53	53.99474784	1.01876883	
Corrected Total	59	144.98333333		
R-Square	C.V.	Root MSE	P/P Mean	
0.627580	40.64460	1.009341	2.48333333	

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: PÉRDIDA DE PIGMENTO
 Alpha= 0.1 df= 53 MSE= 1.018769
 Critical Value of Studentized Range= 3.322
 Minimum Significant Difference= 0.8656

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	DIAS
A	3.200	15	60
B	2.867	15	45
B	2.267	15	30
C	1.600	15	15

❖ CONSERVACIÓN DEL TEJIDO

Source Pr > F	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Model 0.0001	6	101.4447721	16.9074620	29.39
Error	53	30.4885612	0.5752559	
Corrected Total	59	131.9333333		
	R-Square	C.V.	Root MSE	C/T Mean
	0.768909	32.04745	0.758456	2.36666667

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: CONSERV. DEL TEJIDO
 Alpha= 0.1 df= 53 MSE= 0.575256
 Critical Value of Studentized Range= 3.322
 Minimum Significant Difference= 0.6505
 Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	DIAS
A	3.533	15	15
B	2.733	15	30
C	2.000	15	45
D	1.200	15	60

ADULTAS OVIPLLENAS

❖ CONTAMINACIÓN

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	6	130.4835705	21.7472617	311.53	0.0001
Error	53	3.6997628	0.0698068		
Corrected Total	59	134.1833333			
R-Square	C.V.	Root MSE	CONT Mean		
0.972428	14.81551	0.264210	.78333333		

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: CONTAMINACIÓN
 Alpha= 0.1 df= 53 MSE= 0.069807
 Critical Value of Studentized Range= 3.322
 Minimum Significant Difference= 0.2266

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	DIAS
A	2.7333	15	60
B	2.1333	15	45
C	1.3333	15	30
D	0.9333	15	15

❖ PÉRDIDA DE PIGMENTO

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Model Pr > F				
Model	6	105.2384970	17.5397495	26.95
0.0001				
Error	53	34.4948364	0.6508460	
Corrected Total	59	139.7333333		
R-Square	C.V.	Root MSE	P/P Mean	
0.753138	41.72846	0.806750	1.93333333	

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: PÉRDIDA DE PIGMENTO
 Alpha= 0.1 df= 54 MSE= 0.356844
 Critical Value of Studentized Range= 2.965
 Minimum Significant Difference= 0.3961

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	MED
A	2.900	20	1
B	2.400	20	2
C	0.500	20	3

❖ CONSERVACIÓN DEL TEJIDO

Source Pr > F	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Model 0.0001	6	87.49036502	14.58172750	29.83
Error	53	25.90963498	0.48886104	
Corrected Total	59	113.40000000		
	R-Square	C.V.	Root MSE	CT Mean
	0.771520	24.10986	0.699186	2.90000000

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: CONSERV. DEL TEJIDO
 Alpha= 0.1 df= 53 MSE= 0.488861
 Critical Value of Studentized Range= 3.322
 Minimum Significant Difference= 0.5996

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	DIAS
A	3.800	15	15
B	3.200	15	30
B	2.667	15	45
C	1.933	15	60