

RENDIMIENTO Y CALIDAD DE ÁCIDO CARMÍNICO DE *Dactylopius coccus* Costa EN DIFERENTES ALTURAS DE LA NOPALOTECA

YIELD AND QUALITY OF CARMINIC ACID OF *Dactylopius coccus* Costa IN DIFFERENT HEIGHT LEVELS OF THE NOPALOTECA

José Rodolfo Zacarías-Alvarado¹, Clara Lourdes Tovar-Robles¹, Santiago de Jesús Méndez-Gallegos^{1*}, Rafael Magallanes-Quintanar², Gildardo Aquino-Pérez¹

¹Innovación en Manejo de Recursos Naturales. Campus San Luis Potosí. Colegio de Postgraduados. 78622, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, México. (jmendez@colpos.mx). ²Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ingeniería Eléctrica. Avenida Ramón López Velarde, 801, 98064, Zacatecas, Zacatecas, México.

RESUMEN

Dactylopius coccus es un insecto de importancia comercial como fuente de un colorante natural denominado ácido carmínico. Para su producción comercial en cautiverio, se ha promovido la cría en cladodios suspendidos a diferentes alturas, en un sistema denominado “nopaloteca”. Sin embargo, se desconoce si su calidad y rendimiento es uniforme en los diferentes niveles. El objetivo de este estudio fue determinar la influencia de la altura del nivel en una “nopaloteca” y el índice de cosecha en la concentración de ácido carmínico (CAC, %) y peso fresco (PF, g) de *D. coccus*. La crianza del insecto se realizó en una “nopaloteca” de madera (3x3 m), con cuatro niveles de altura (0.5, 1.0, 1.50 y 2 m). Durante el ciclo de cultivo se registró cada día la temperatura, la humedad relativa y la intensidad luminosa. Las hembras adultas se recolectaron en dos etapas del desarrollo: pre y postoviposición. La CAC más alta (19.2%) se obtuvo en 1.0 m de altura, aunque este nivel registró el PF más bajo con 3.5 g por cladodio, que expresa una correlación negativa entre la CAC y el PF. La recolección en postoviposición generó una CAC superior (18.8%), aunque el PF se redujo. Tanto la humedad relativa (HR) como la iluminación total, pero principalmente la temperatura que incidió en cada nivel, influyeron en la calidad y el rendimiento de *D. coccus*, aunque de manera diferencial sobre ambos factores, lo cual indica la presencia de límites óptimos de desarrollo. Bajo las condiciones del estudio, el sistema de cría en “nopaloteca” produjo en promedio 4.5 g de cochinilla por cladodio y una CAC de 17.5%. Los niveles evaluados causaron diferencias en rendimiento y calidad, pero sus valores más altos

ABSTRACT

Dactylopius coccus is an important insect for commerce, as the source of a natural dye called carminic acid. For its commercial production in captivity, rearing has been promoted in cladodes suspended at different heights in a system called “nopaloteca”. However, it is unknown whether insect quality and yield vary at different levels. The objective of this study was to determine the influence of height level in a “nopaloteca” and the harvest index of carminic acid concentration (CAC, %) and fresh weight (FW, g) of *D. coccus*. Insect rearing was carried out in a wooden “nopaloteca” (3x3 m) with four height levels (0.5, 1.0, 1.50 and 2 m). During the culture cycle, temperature, relative humidity, and luminous intensity were measured daily. Adult females were collected in two development stages: pre- and post-oviposition. The highest CAC (19.2%) was obtained at 1.0 m high, although at this level the lowest FW was recorded, 3.5 g per cladode, which expresses a negative correlation between CAC and FW. Post-oviposition harvest generated a higher CAC (18.8%), although FW decreased. Relative humidity and total illumination, but mainly temperature at each level, affected quality and yield of *D. coccus*, though the two factors were affected differentially, indicating the presence of optimal limits for development. Under the conditions of this study, the “nopaloteca” rearing system produced an average of 4.5 g cochineal per cladode and a CAC of 17.5%. The levels evaluated caused difference in yield and quality, but the highest values were registered in the intermediate levels (1.0 and 1.5 m). The recommended harvest index to obtain more CAC was the post-oviposition phase.

Key words: *Dactylopius coccus*, cochineal, harvest index, rearing, prickly-pear cactus.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: junio, 2019. Aprobado: febrero, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 705-716. 2020.

se registraron en los niveles intermedios (1.0 y 1.5 m). El índice de cosecha recomendado para obtener mayor CAC fue la etapa de postoviposición.

Palabras clave: *Dactylopius coccus*, cochinilla, índice de cosecha, cría, nopal.

INTRODUCCIÓN

La cochinilla *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae) es un insecto originario de regiones tropicales y subtropicales de América (Müller-Maatsch y Gras, 2016), en particular de México y Perú, y es un parásito específico de especies de *Nopalea* Salm-Dyck y *Opuntia* Mill (Chávez-Moreno *et al.*, 2009). Este insecto sintetiza un glucósido antraquinónico denominado ácido carmínico (AC) como defensa (Dettner, 2014). Por su estabilidad y capacidad de coloración se emplea en cosméticos, pinturas, biomedicina, alimentos y bebidas (Müller-Maatsch y Gras, 2016). El uso de AC y sus derivados está autorizado por la mayoría de los organismos reguladores que evalúan inocuidad y riesgo de los aditivos alimentarios en el mundo. La Agencia de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) de EE. UU., les reconoce como Natural Red 5, y la Unión Europea les asignó el código E120 (EFSA, 2015).

Ahora, *D. coccus* está distribuida en 15 países, ya sea introducida o naturalizada (Chávez-Moreno *et al.*, 2009). Aunque su sistema de cultivo varía en cada país y región (Müller-Maatsch y Gras, 2016) la crianza se puede realizar bajo dos modalidades: a cielo abierto y en condiciones semicontroladas (Aldama-Aguilera *et al.*, 2005). Sólo en España, Chile, Bolivia, Etiopía y Perú la cría es a cielo abierto (Anculle *et al.*, 2017), al disponer de condiciones agroecológicas para su desarrollo óptimo. En México, las precipitaciones altas, temperaturas extremas, vientos fuertes y radiación alta, así como la presencia de enemigos naturales limitan su crianza a campo abierto (Aldama-Aguilera *et al.*, 2005). Derivado de lo anterior, se han desarrollado e implementado alternativas para su cría masiva, las cuales incluyen desde estructuras de materiales rústicos, hasta invernaderos con cubiertas de vidrio o plástico.

Entre los sistemas de producción probados con éxito destacan las “nopalotecas”, las cuales reducen el impacto de los factores físicos y biológicos que limitan el desarrollo al insecto. Este sistema se probó en

INTRODUCTION

Cochineal, *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae), is an insect native to the tropical and subtropical regions of America (Müller-Maatsch and Gras, 2016), particularly Mexico and Peru. It is a specific parasite of species of *Nopalea* Salm-Dyck and *Opuntia* Mill (Chávez-Moreno *et al.*, 2009). This insect synthesizes an anthraquinone glycoside called carminic acid (CA) as a defense mechanism (Dettner, 2014). Because of CA stability and dying capacity, it is used in cosmetics, paints, biomedicine, food, and beverages (Müller-Maatsch and Gras, 2016). Use of CA and its derivatives is authorized by most regulating organisms worldwide that evaluate the safety and risk of food additives. The US Food and Drug Administration (FDA) recognizes it as Natural Red 5, and the European Union assigned it the code E120 (EFSA, 2015).

Dactylopius coccus is now distributed in 15 countries, introduced, or naturalized (Chávez-Moreno *et al.*, 2009). Although the system varies in each country and region (Müller-Maatsch and Gras, 2016), rearing has two modalities: in the open and in semi-controlled conditions (Aldama-Aguilera *et al.*, 2005). Only in Spain, Chile, Bolivia, Ethiopia, and Peru rearing is done in the open (Anculle *et al.*, 2017) because they have agroecological conditions for optimal development. In Mexico, high precipitation, extreme temperatures, strong winds and high radiation, as well as the presence of natural enemies, limit rearing in the open (Aldama-Aguilera *et al.*, 2005). For this reason, alternatives for mass rearing have been developed and implemented. These alternatives vary from structures made of rustic materials to greenhouses with glass or plastic covering.

Among the proven successful production systems, the “nopalotecas” are outstanding. The system reduces impact of physical and biological factors that limit the insect development. It has been tested in Argentina (Alonso *et al.*, 2013) and Peru (Hernández *et al.*, 2017), and it is now protected by the Spanish Office of Patents and Trademarks (Oficina Española de Patentes y Marcas-OEPM, 2019) with the registration number 2 351 752. Despite the viability of the system, few studies have confirmed whether the CA concentration (CAC) and yield are uniform throughout the levels of the “nopaloteca”, since

Argentina (Alonso *et al.*, 2013) y en Perú (Hernández *et al.*, 2017) y está protegido desde el 2011 por la Oficina Española de Patentes y Marcas (OEPM, 2019) con Registro 2 351 752. A pesar de la viabilidad del sistema, hay pocos resultados de investigación para confirmar si la concentración de AC (CAC) y el rendimiento, son uniformes en todos los niveles de la “nopaloteca”; ya que la distribución espacial de la temperatura, humedad relativa y la cantidad de luz, inciden de forma heterogénea de acuerdo con la altura en que se ubiquen los niveles para colocar cladodios.

Entre los factores que influyen en la CAC y el rendimiento de *D. coccus* destacan la edad y el estado nutricional del cladodio, así como la especie o cultivar del nopal hospedante (Méndez-Gallegos *et al.*, 2010), cantidad y tipo de luz (Tello y Vargas, 2015), temperatura, humedad relativa y la densidad de población del insecto en el cladodio (Rodríguez *et al.*, 2005). Aunque el AC está presente en todas las etapas de desarrollo (Briseño-Garzón y Llanderal, 2008) existen contradicciones respecto al índice de cosecha que produzca una mayor CAC. Müller-Maatsch y Gras (2016) recomendaron cosechar cuando las hembras son ovíparas (justo antes de la oviposición), mientras que Flores-Alatorre *et al.* (2014) afirmaron que se debe realizar después del periodo de oviposición.

A nivel internacional el precio de la cochinilla fluctúa constantemente porque su valor tiene relación directa con la CAC (Flores-Alatorre *et al.*, 2014), y hay productores dedicados a la comercialización de producto fresco, como pie de cría. Por lo tanto, es importante mantener y aumentar estas variables productivas para hacer más eficiente el sistema de cría. El objetivo del estudio fue determinar la influencia de la altura del nivel en la “nopaloteca” y el índice de cosecha en pre y postoviposición, sobre la calidad, en función de la CAC (%) y el peso fresco (PF, g) de *D. coccus*, que permitan optimizar su manejo en cautiverio. La hipótesis fue que alguno de los cuatro niveles evaluados o fase de desarrollo, o ambos, produce concentración de AC y peso fresco mayores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del sitio de estudio

La investigación se realizó de mayo a diciembre de 2018 en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, Campus San Luis Potosí (22° 37' 55.66" N, 101° 42' 42.96" O, y altitud de 2078 m)

spatial distribution of temperature, relative humidity, and light are heterogeneous depending on the height at which the cladodes are placed.

Outstanding among the factors that affect CAC and *D. coccus* yield are cladode age and nutritional status, as well as the species or cultivar of the hosting pear cactus (Méndez-Gallegos *et al.*, 2010), quantity and type of light (Tello and Vargas, 2015), temperature, relative humidity and insect population density in the cladode (Rodríguez *et al.*, 2005). Although CA is present in all the insect development stages (Briseño-Garzón and Llanderal, 2008), there are some contradictions regarding the harvest index that produces more CAC. Müller-Maatsch and Gras (2016) recommend harvesting when the females are full of eggs (just before oviposition), while Flores-Alatorre *et al.* (2014) assert that harvest should take place after oviposition.

Internationally, the price of cochineal fluctuates constantly because its value has a direct relationship with CAC (Flores-Alatorre *et al.*, 2014), and there are producers that commercialize it fresh, as rearing stock. Therefore, it is important to maintain and increase these production variables to make the rearing system more efficient. The objective of the study was to determine how height of the level in the “nopaloteca” and the harvest index in pre- and post-oviposition affect quality in function of CAC (%) and fresh weight (FW, g) of *D. coccus*, with the aim of optimizing its management in captivity. The hypothesis was that one of the four levels evaluated or the development phase, or both, produce higher CA concentration and fresh weight.

MATERIALS AND METHODS

Location of the study site

The study was conducted from May to December 2018 in the facilities of the Colegio de Postgraduados, Campus San Luis Potosí (22° 37' 55.66" N, 101° 42' 42.96" W, altitude 2078 m) in a glass greenhouse with a north-south orientation. The greenhouse was shaded with Spanish white (calcium hydroxide and water 2:1 v:v) to reduce light intensity on the “nopaloteca” during the day and conserve heat during the night.

Seed insects and host

In this study, 300 g of egg-filled females were used as biological material for initial propagation; these were provided

en un invernadero de cristal con orientación norte-sur, el cual se sombreó con blanco de España (hidróxido de calcio y agua 2:1 v:v) para reducir la intensidad luminosa sobre la “nopaloteca” en el día y conservar el calor durante la noche.

Simiente y hospedante

En este estudio se usaron 300 g de hembras ovíparas como material biológico para la propagación inicial, proporcionados por la empresa GranaZac S.P.R.R.L. (Villanueva Zacatecas, México). Como sustrato alimenticio se emplearon 120 cladodios de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. cv Villanueva, de entre 10 y 12 meses de edad. Estos se cepillaron con cuidado, antes de la infestación, para remover polvo y residuos, y prevenir la incidencia de inmaduros de cochinilla silvestre (*D. opuntiae*).

Técnica de propagación artificial

Para realizar la infestación los cladodios se distribuyeron horizontalmente en el piso y sobre éstos se colocaron dos tamices (40x40 cm); en cada tamiz se dispusieron 150 g de adultas grávidas (Figura 1A). A fin de obtener cladodios con densidad y distribución inicial homogénea de la progenie y tener cohortes de la misma edad, los cladodios con ninfas neonatas se sustituyeron cada dos días por cladodios nuevos. Después éstos se colgaron de manera invertida (acropétala), en el nivel respectivo dentro de la “nopaloteca” (Figura 1B). Los cladodios se colgaron de la base por medio de un gancho de alambre galvanizado calibre 12, para facilitar y asegurar la suspensión.

Sistema de cría

El sistema de crianza empleado fue el de “nopaloteca”. Ésta es una estructura de madera (9 m²) dividida en cuatro niveles de altura, con una separación de 0.50 m (el nivel 1 se ubicó a

by the enterprise GranaZac S.P.R.R.L. (Villanueva Zacatecas, Mexico). The feed substrate was 120 *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. cv Villanueva pear cactus cladodes 10 and 12 months old. These were brushed carefully before infestation to remove dust and residues and to prevent incidence of immature wild cochineal (*D. opuntiae*).

Artificial propagation technique

For infestation, the cladodes were distributed horizontally on the floor and covered with two meshes (40x40 cm); on each mesh 150 g of pregnant females were spread out (Figure 1A). In order to obtain initial homogeneous density and distribution of the progeny and to have cohorts of the same age, the cladodes with neonate nymphs were substituted every two days. These new cladodes were then hung upside down (acropetal) in the respective level in the “nopaloteca” (Figure 1B). The cladodes were hung from their base using a galvanized wire hook (caliber 12) to facilitate and assure suspension.

Rearing system

The rearing system used was the “nopaloteca”. This is a wooden structure (9 m²) divided into four height levels, with a separation of 0.50 m (level 1 was 0.50 m above the ground and level 4 was 2.0 m high). The structure was placed in the center of the greenhouse to assure the same conditions throughout.

Experimental procedure

Effect of level height and harvest index on concentration of carminic acid and *D. coccus* fresh weight.

For determining whether temperature, relative humidity and quantity of light affect CAC and *D. coccus* yield, in the central

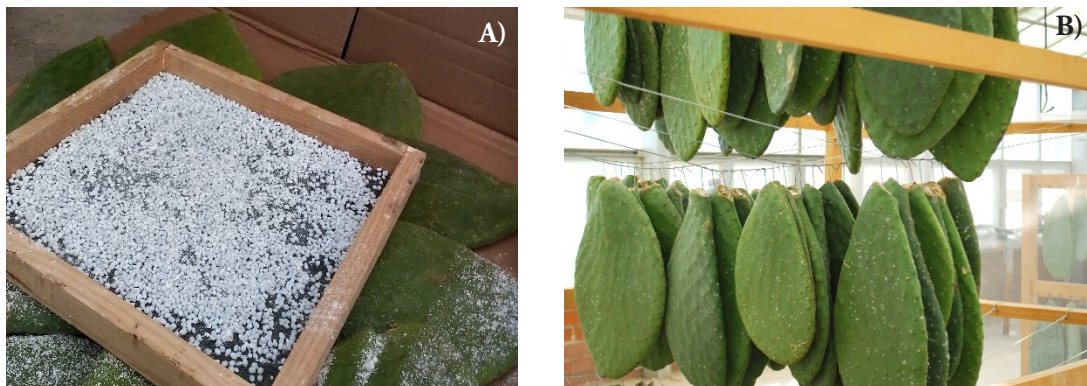


Figura 1. A) Infestación artificial de *D. coccus* B) Disposición de cladodios infestados en la estructura de la “nopaloteca”.
Figure 1. A) Artificial infestation of *D. coccus* B) Arrangement of infested cladodes in the “nopaloteca” structure.

0.50 m del suelo y el nivel 4 a 2.0 m). La estructura se colocó en el centro del invernadero para asegurar que recibiera las mismas condiciones.

Procedimiento experimental

Influencia de la altura del nivel y del índice de cosecha sobre la concentración de ácido carmínico y peso fresco de *D. coccus*

Para determinar si la temperatura, humedad relativa y cantidad de luz influyen en la CAC y rendimiento de *D. coccus*, se colocó en la parte central de cada nivel de la “nopaloteca” un sensor HOBO Pro v2 temp/RH onset USA®, con el cual se hizo un registro de temperatura (°C) máxima, promedio y mínima (TMAX, TPROM, TMIN) y de humedad relativa (%) máxima, promedio y mínima (HRMAX, HRPROM, HRMIN). Las lecturas se tomaron cada hora durante todo el ciclo biológico de *D. coccus*. La iluminación (lux) se cuantificó con un fotómetro EXTECH Instruments (Nashua, USA)® a las 09:00 h, 15:00 h y 18:00 h, un día por semana, la cantidad diaria cuantificada se acumuló durante todo el ciclo de desarrollo y se registró como iluminación total (ILTOTAL), para lo cual se tomaron lecturas de referencia en cada nivel, con el cuidado de realizarlas en el mismo punto siempre.

Para definir el índice de cosecha con la mayor CAC y rendimiento de *D. coccus*, se seleccionaron dos etapas de desarrollo: preoviposición y postoviposición. En la preoviposición se seleccionaron 15 cladodios de cada uno de los cuatro niveles (60 cladodios en total); se cosecharon a mano, con un pincel 73 d después de la infestación, cuando en promedio 5% de las hembras iniciaron la reproducción. Las hembras grávidas se recolectaron en un tamiz y se registró su peso fresco (PF, g) en una balanza analítica Explorer Pro® (NJ, USA) d=1/0.1 mg. Después, se colocaron en frascos de vidrio de 14 x 3.5 cm, los cuales se identificaron de acuerdo con el nivel de procedencia y luego se introdujeron en un congelador Maytag® a -10 °C por 3 d, para su sacrificio. Posteriormente, los insectos se sometieron a un proceso de secado natural dentro del invernadero durante 10 d (40.1, 19.6 y 28 °C, de temperatura máxima, mínima y promedio, respectivamente), removiendo los frascos dos veces por día para evitar su compactación.

En la segunda fase evaluada (postoviposición) se recolectaron las hembras contenidas en 15 cladodios restantes de cada nivel (60 cladodios en total), según el procedimiento para el secado ya señalado. El índice de cosecha fue el fin del periodo reproductivo (~130 d después de la infestación).

part of each level of the “nopaloteca” a sensor (HOBO Pro v2 temp/RH onset USA®) was placed to record maximum, average and minimum temperature (°C) (TMAX, TPROM, TMIN) and maximum, average and minimum relative humidity (%) (HRMAX, HRPROM, HRMIN). Readings were taken every hour during the entire biological cycle of *D. coccus*. Illuminance (lux) was quantified with an EXTECH Instruments® (Nashua, USA) photometer at 0.900 h, 15:00 h and 18:00 h, one day a week. The daily quantified amount was accumulated during the entire development cycle and registered as total illumination (ILTOTAL). Reference readings were taken in each level, taking care that it was always at the same point.

To define the harvest index with the highest CAC and *D. coccus* yield, two development stages were selected: pre-oviposition and post-oviposition. In pre-oviposition, 15 cladodes were selected from each of the four levels (60 cladodes total), and the cochineal was harvested manually with a paint brush 73 d after infestation when an average of 5% of the females began reproduction. These females were collected in a mesh and their fresh weight (FW, g) was recorded using an analytical balance Explorer Pro® (NJ, USA), d=1/0.1 mg. They were then placed in 14 x 3.5 cm glass jars, which were labeled by level and killed by placing them in a Maytag® freezer at -10 °C for 3 d. Later, the insects were subjected to a process of natural drying in the greenhouse for 10 d (40.1, 19.6 and 28 °C, maximum, minimum and average temperatures, respectively), shaking the jars twice a day to prevent compaction.

In the second evaluated phase (post-oviposition), the females contained in the 15 remaining cladodes of each level (60 cladodes total) were collected and subjected to the drying procedure described above. The harvest index was the end of the reproductive period (~130 d after infestation).

Determination of carminic acid

The females from the 15 cladodes corresponding to each level and of the two development stages were combined in a compound sample. Thus, there were a total of eight samples with 70 to 80 g of fresh cochineal. Once dried, each sample was ground in a Wiley mini Mill® (3383-L10 115 V, 60 Hz (Thomas Scientific Swedesboro, NJ 08085-0099-U.S.A.), which reduced them to particles that would sieve through a 40 mesh.

CAC was determined by the method proposed by Briseño-Garzón and Llanderal (2008). In a precipitation beaker, 100 mg of ground cochineal was mixed with 30 mL hydrochloric acid (HCl 2N). The mixture was boiled for 10 min and gauged to 1000 mL with distilled water; the entire sample was

Determinación de ácido carmínico

Las hembras de 15 cladodios correspondientes a cada nivel y de las dos etapas de desarrollo se conjuntaron en una muestra compuesta. Así hubo ocho muestras en total con 70 a 80 g de cochinilla fresca. Una vez secas, cada muestra se pulverizó en un molino Wiley Mini Mill® (3383-L10 115 V, 60 Hz (Thomas Scientific Swedesboro, NJ 08085-0099-U.S.A.), que las redujo a partículas de tamiz malla 40.

La CAC se determinó por el método propuesto por Briseño-Garzón y Llanderal (2008). En un vaso de precipitado se colocaron 100 mg de cochinilla molida, se agregaron 30 mL de ácido clorhídrico (HCl 2N) y se mezclaron. La mezcla hirvió por 10 min, se aforó a 1000 mL con agua destilada y se filtró toda la muestra para desechar los primeros 200 mL. El resto se usó para determinar la absorbancia a 494 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S VIS Thermo Scientific®. La CAC se calculó al sustituir los valores de la absorbancia en la ecuación de una curva de calibración realizada con AC al 90% de pureza (SIGMA®). Para cada muestra compuesta de *D. coccus*, se realizó la cuantificación por triplicado y se tomaron 10 lecturas de cada una.

Análisis estadístico

Con los datos se realizó un ANDEVA para determinar diferencia entre tratamientos (niveles y etapas de desarrollo), y en el caso de los niveles, las covariables fueron la temperatura, humedad relativa e iluminación, sobre las variables de CAC (%) y PF (g). El diseño experimental fue completamente al azar, con 15 repeticiones y la unidad experimental fue un cladodio. Para determinar diferencias estadísticas entre medias se usó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Asimismo, se realizó un análisis de correlación simple (r , coeficiente de Pearson) entre tratamientos, variables de respuesta y covariables. El proceso estadístico se realizó con el sistema R Versión 3.5.1 (R Core Team, 2018).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia de la altura del nivel y la fase de desarrollo de *D. coccus* sobre la concentración de ácido carmínico (CAC)

En la concentración de ácido carmínico (CAC) en *D. coccus*, criada bajo el sistema de “nopaloteca” en condiciones semicontroladas, influyeron altura del nivel ($gl=3$, $f=48.36$, $p \leq 0.01$), temperatura promedio ($gl=1$, $f=27.34$, $p \leq 0.01$) y fase de desarrollo en que se cosechó ($gl=1$, $f=311.30$, $p \leq 0.01$). La CAC mayor (19.2%) se registró en el nivel 2, a 1.0 m de altura, el cual tuvo diferencia estadística con la CAC

filtered, and the first 200 mL was discarded. The rest was used to determine absorbance at 494 nm in a GENESYS 10S VIS Thermo Scientific® spectrophotometer. CAC was calculated by substituting the absorbance values in the equation of a calibration curve constructed with 90% pure CA (SIGMA®). Each compound sample of *D. coccus* was quantified in triplicate and 10 readings were taken.

Statistical analysis

An ANOVA was performed on the data to determine differences between treatments (levels and development stages). In the case of levels, the covariables were temperature, relative humidity and illumination over the variables CAC (%) and FW (g). The experimental design was completely randomized with 15 replications, and the experimental unit was one cladode. To determine statistical differences between means, the Tukey test ($p \leq 0.05$) was used. Also, a simple correlation analysis (r , Pearson coefficient) was performed for treatments, response variables and covariables. The statistical process was carried out with R Version 3.5.1 (R Core Team, 2018).

RESULTS AND DISCUSSION

Influence of level height and development phase of *D. coccus* on carminic acid concentration (CAC)

The carminic acid concentration (CAC) in *D. coccus* reared in the “nopaloteca” system in semi-controlled conditions was affected by level height ($df=3$, $f=48.36$, $p \leq 0.01$), average temperature ($df=1$, $f=27.34$, $p \leq 0.01$) and the development phase in which it was harvested ($df=1$, $f=311.30$, $p \leq 0.01$). The highest CAC (19.2%) was found in level 2 at 1.0 m high and was statistically different from the CAC obtained in the other three levels. In contrast, the lowest average value (16.7%) was obtained in level 4 (Figure 2).

This trend contrasts with the results of Alonso *et al.* (2013), who recorded a higher CAC (17.5%) at 1.5 m, but it decreased at lower levels (16.9% at 1.0 m and 16.5% at 0.5 m); however, they tested three level instead of four. The behavior registered in our study could be associated with the cement floor used in the greenhouse. This type of floor causes an effect of radiation-convection of light and temperature at the lowest level, different from the effect of “Ground Cover” mesh floors.

International norms for classifying cochineal quality is diverse, and each enterprise that acquires

obtenida en los otros tres niveles; en contraste el valor promedio más bajo (16.7%) se obtuvo en el nivel 4 (Figura 2).

Esta tendencia contrasta con los resultados de Alonso *et al.* (2013) quienes registraron la CAC más alta en 1.5 m con 17.5%, pero disminuyó conforme la altura del nivel se redujo (16.9% a 1.0 m y 16.5% a los 0.5 m); aunque ellos probaron tres niveles, en lugar de cuatro. El comportamiento registrado en nuestra investigación podría asociarse con el piso de cemento usado en el invernadero de nuestro estudio. Este tipo de piso causa un efecto de radiación-convección de la luz y la temperatura en el nivel más bajo que difiere del obtenido en los invernaderos con piso de malla “Ground Cover”.

La normativa internacional para clasificar la calidad de la cochinilla es diversa, y ahora cada empresa adquiere el producto y establece su precio en función del contenido de AC, como criterio principal. En nuestra investigación, las CAC obtenidas en los niveles del 1 al 3 fueron superiores a las registradas por Alonso *et al.* (2013) en los mismos niveles de altura, pero son similares a las obtenidas en otros sistemas de producción. Por ejemplo, Méndez-Gallegos

the product establishes its price in function of the content of CA, as the principal criterion. In our study, the CAC obtained in levels 1 to 3 were higher than those reported by Alonso *et al.* (2013) at the same height levels but similar to those obtained in other production systems. For example, Méndez-Gallegos *et al.* (2010) reported that CAC oscillated between 15 and 19% in the laboratory. In the same conditions in Chile, Rodríguez *et al.* (2005) found average values of 16.9% to 19.1% in two rearing stations. Moreover, Aldama-Aguilera *et al.* (2005) obtained 19.4% in a micro-tunnel covered with transparent plastic during the period from August to December.

Each height level evaluated in the “nopaloteca” had its particular climatic conditions, although only temperature had a higher degree of influence in CAC ($p \leq 0.0001$). According to Campos Figueroa and Llanderal-Cázares (2003), this rearing system provides suitable conditions for establishment and development of the insect because it enables management of temperature oscillations (maximum 31 °C, minimum 12 °C and mean 20 °C), RH (95%) and ventilation. In this respect, Rodríguez *et*

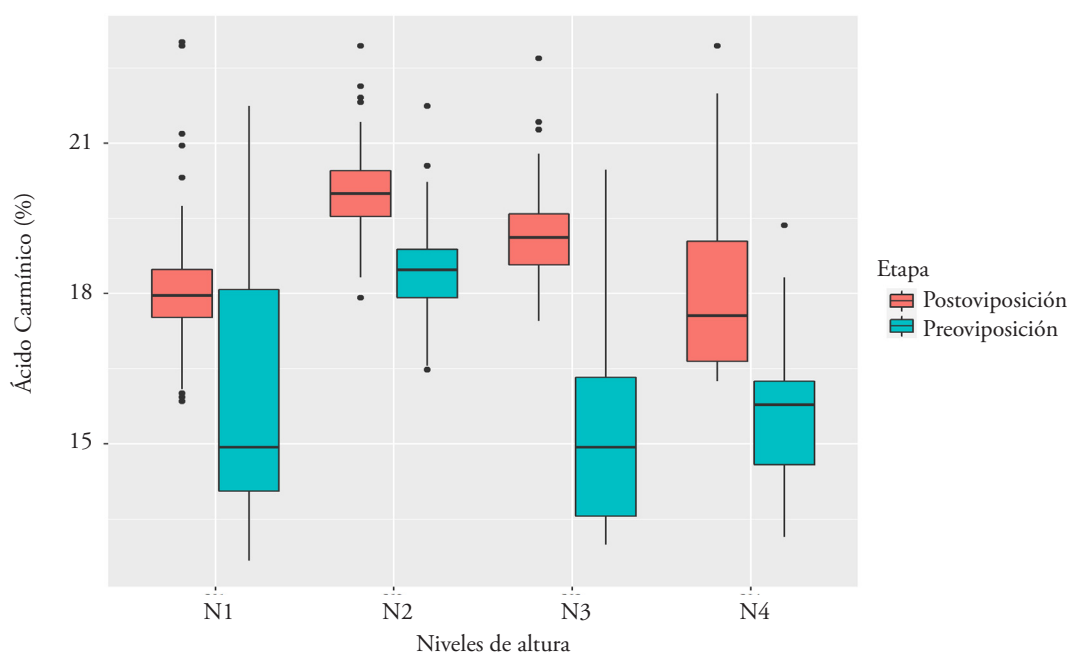


Figura 2. Concentración de ácido carmínico (CAC) en dos etapas de desarrollo de *D. coccus* criada en “nopaloteca” con cuatro niveles de altura.

Figure 2. Carminic acid concentration (CAC) in two development stages of *D. coccus* reared in a “nopaloteca” with four height levels.

et al. (2010) registraron que la CAC osciló entre 15 y 19%, en condiciones de laboratorio. En las mismas condiciones en Chile, Rodríguez *et al.* (2005) encontraron valores promedio de 16.9% a 19.1% en dos estaciones de crianza. Además, Aldama-Aguilera *et al.* (2005) obtuvieron 19.4% en microtúnel con plástico transparente en el periodo de agosto-diciembre.

Cada nivel de altura evaluado en la “nopaloteca” presentó condiciones climáticas particulares, aunque sólo la temperatura influyó en mayor grado sobre la CAC ($p \leq 0.0001$). De acuerdo con Campos-Figueroa y Llanderal-Cázares (2003) este sistema de cría proporciona condiciones adecuadas para el establecimiento y desarrollo del insecto, porque permite manejar las oscilaciones de temperatura (máxima 31 °C, mínima 12 °C y media 20 °C), HR (95%) y ventilación. Al respecto, Rodríguez *et al.* (2005) demostraron que tanto la temperatura, como el fotoperiodo son factores considerados influyentes sobre la CAC.

La CAC más alta ($p \leq 0.05$) se obtuvo en la fase de postoviposición con 18.8% y en preoviposición el valor promedio fue 16% ($p \leq 0.05$), ambos con diferencia estadística (Figura 2). En el índice de cosecha hubo resultados contrastantes. Rodríguez *et al.* (2005) encontraron que las hembras recolectadas en preoviposición, tuvieron una CAC promedio de 18%, pero Flores-Alatorre *et al.* (2014) observaron que hembras recolectadas en fase post reproductiva y hembras adultas estériles más pequeñas (CAC, 26.27%) producían concentraciones mayores de AC.

De manera similar, Aldama-Aguilera *et al.* (2005) observaron CAC de 19.4 a 22.9% en hembras recolectadas 15 d después de iniciada la reproducción. En hembras recolectadas cuando el 50% inició la oviposición, la CAC fue 23.6% con 16 h de luz (Tello y Vargas, 2015). Lo anterior sugiere que entre más tiempo se mantengan las hembras de *D. coccus* en reproducción sobre el cladodio, la CAC aumenta hasta en 3.8%. Sin embargo, lo anterior requiere obtener cosechas cada 120 d; es decir, solo tres de las cuatro esperadas por año (Campos-Figueroa y Llanderal-Cázares, 2003).

Influencia de la altura del nivel y de la fase de desarrollo sobre el peso fresco de *D. coccus*

Los factores que influyeron en el PF (g) de *D. coccus* fueron altura del nivel ($gl=3$, $f=17.57$, $p \leq 0.0001$), fase de desarrollo ($gl=1$, $f=47.61$,

et al. (2005) demonstrated that both temperature and photoperiod are factors considered to affect CAC.

The highest CAC ($p \leq 0.05$) was obtained in the post-oviposition phase, 18.8%, compared with the pre-oviposition phase with an average value of 16% ($p \leq 0.05$); the two values are statistically different (Figure 2). Rodríguez *et al.* (2005) found that females collected in pre-oviposition had an average CAC of 18%, but Flores-Alatorre *et al.* (2014) observed that females collected in the post-reproductive stages and smaller sterile adult females produced higher concentrations of CA (CAC, 26.7%).

Likewise, Aldama-Aguilera *et al.* (2005) observed CAC of 19.4 to 22.9% in females collected 15 d after initiating reproduction. In females reared with 16 h of light and collected when 50% had initiated oviposition, CAC was 23.6% (Tello and Vargas, 2015). This suggests that the longer *D. coccus* females remain in reproduction on the cladode, when *D. coccus* females remain in production longer on the cladode, CAC can increase by up to 3.8%. However, this requires harvesting every 120 d, that is, only three of the four expected harvests per year (Campos-Figueroa and Llanderal-Cázares, 2003).

Effect of height level and of development phase on *D. coccus* fresh weight

The factors that influenced *D. coccus* FW (g) were level height ($df=3$, $f=17.57$, $p \leq 0.0001$), development phase ($df=1$, $f=47.61$, $p \leq 0.0001$), average temperature ($df=1$, $f=192.70$, $p \leq 0.0001$) and maximum temperature ($df=1$, $f=7.90$, $p \leq 0.01$). Contrary to the behavior of CAC, level 2, 1 m high, had the lowest value of FW (3.5 g per cladode), while the highest value was recorded in level 3, 1.5 m high, with 4.9 g per cladode. It is worth mentioning that at this level, besides the highest value of FW, an adequate value of CAC was also obtained (Table 1).

The FW values obtained in our study were lower than those reported by Alonso *et al.* (2013), who also underlined that yield in function of FW per cladode decreases as the height of the level increases. In this respect, Campos-Figueroa and Llanderal-Cázares (2003) did not observe differences in FW among the three levels they tested, but they obtained a higher yield of fresh cochineal per cladode (7.8 g). The values obtained in our study (2.5 g) were higher than those reported by Tovar *et al.* (2005).

$p \leq 0.0001$), temperatura promedio ($gl=1$, $f=192.70$, $p \leq 0.0001$) y temperatura máxima ($gl=1$, $f=7.90$, $p \leq 0.01$). Contrario al comportamiento observado en CAC, el nivel 2 ubicado a 1 m de altura obtuvo el valor más bajo de PF (3.5 g por cladodio); mientras que el valor más alto se registró en el nivel 3, a 1.5 m, con 4.9 g por cladodio. Cabe señalar que en este nivel también se obtuvo un valor apropiado de CAC y el PF mayor (Cuadro 1).

Los valores de PF obtenidos en nuestro estudio fueron inferiores a los reportados por Alonso *et al.* (2013) quienes además destacaron que el rendimiento, en función del PF por cladodio, disminuye conforme la altura del nivel es mayor. Al respecto, Campos-Figueroa y Llanderal-Cázares (2003) no observaron diferencias respecto a PF entre los tres niveles que probaron, pero obtuvieron un rendimiento más alto de cochinilla fresca por cladodio (7.8 g). Los valores obtenidos en nuestro estudio (2.5 g) fueron mayores a los de Tovar *et al.* (2005).

Rodríguez *et al.* (2005) determinaron que la cochinilla con PF mayor presentó una CAC más baja, aunque pueden deponer un número mayor de huevos, lo cual supone una relación inversa entre la CAC y la fecundidad. Esta relación además sugiere la existencia de un compromiso fisiológico entre la asignación de recursos a reproducción o a defensa. La tendencia también podría estar relacionada a que un PF mayor brinda mejor protección a las ninfas “migrantes” para su establecimiento y desarrollo, en detrimento de la CAC. De manera similar, Méndez-Gallegos *et al.* (2010) determinaron que la cohorte con los valores de crecimiento poblacional más altos produjo la CAC más baja.

Otro aspecto importante es la competencia intraespecífica, porque una reducción del número de insectos en la superficie del cladodio podría reflejarse en un aumento de la CAC, como mecanismo de defensa (Aldama-Aguilera *et al.* 2005). Asimismo, se podría interpretar que al recibir poca luz las condiciones son adecuadas para la fijación y el desarrollo de *D. coccus*, pero hay un efecto negativo en la CAC, al reducirse la tasa fotosintética del hospedante (Nobel, 1998). De acuerdo con lo anterior, las diferencias en el PF de *D. coccus* se podrían atribuir a la distribución espacial de la iluminación y humedad relativa, pero principalmente de la temperatura en los niveles de la “nopaloteca”.

Cuadro 1. Valores promedio de peso fresco (g) de *D. coccus* criada en cuatro niveles de altura en “nopaloteca”.
Table 1. Average values of fresh weight (g) of *D. coccus* reared in four height levels in a “nopaloteca”.

Niveles y altura (m)	Peso fresco (g)
1 (0.5 m)	4.8 a [†]
2 (1.0 m)	3.5 b
3 (1.5 m)	4.9 a
4 (2.0 m)	4.4 a

[†]Valores promedio con letra diferente indican diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$). ♦ Average values with different letters are statistically different (Tukey, $p \leq 0.05$).

Rodríguez *et al.* (2005) determined that cochineal with the highest FW had the lowest CAC, even though they can have more eggs, which assumes an inverse relationship between CAC and fecundity. This relationship also suggests the existence of a physiological compromise in terms of resource allocation to reproduction or defense. The trend may also be related to better protection that a higher FW offers to the “migrant” nymphs for establishment and development, in detriment of CAC. Likewise, Méndez-Gallegos *et al.* (2010) determined that the cohort with the highest population growth values produced the lowest CAC.

Another important aspect is intraspecific competition. A reduction in the number of insects on the surface of the cladode could be reflected in an increase in CAC, as a defense mechanism (Aldama-Aguilera *et al.*, 2005). It could also be interpreted that, receiving little light, the conditions are adequate for establishment and development of *D. coccus*. But there is a negative effect on CAC when the host photosynthetic rate decreases (Nobel, 1998). It follows that the differences in *D. coccus* FW can be attributed to spatial distribution of illumination and relative humidity, but mainly of temperature, in the levels of the “nopaloteca”.

The FW obtained in this study in the pre-oviposition phase was high (4.9 g per cladode); this is associated with the weight of the eggs contained in the females. In contrast, those that concluded the reproductive process had only 3.9 g per cladode. This implies taking advantage of the reproductive process to obtain progeny for a successive generation of *D.*

El PF obtenido en este estudio en la fase de preoviposición fue superior (4.9 g por cladodio), lo cual se asocia con el peso de los huevos contenidos en las hembras. En contraste, aquellas que concluyeron el proceso reproductivo tuvieron solo 3.9 g por cladodio. Lo anterior implica que se puede aprovechar el proceso de reproducción para obtener progenie para una generación sucesiva de *D. coccus* y al mismo tiempo generar una CAC mayor. Los valores promedio de PF en nuestro estudio fueron bajos en comparación a los 9.6 g de cochinita fresca obtenidos en estudios en Perú con este mismo sistema (Hernández *et al.*, 2017).

El análisis de correlación (Pearson) se mostró significativo sólo para PF y CAC, lo cual indica que a menor peso fresco del insecto la CAC es más alta (Cuadro 2); un resultado similar al registrado por Alonso *et al.* (2013). Existen algunas tendencias destacadas que podrían explicar el comportamiento de las variables productivas (Cuadro 2). Por ejemplo, entre iluminación total (ILTOTAL), temperatura mínima (TMIN), humedad relativa promedio (HRPROM) y la CAC (CA) o entre la temperatura máxima (TMAX) e iluminación (ILTOTAL) y el PF. Todas las tendencias indican que CAC y PF aumentan en forma proporcional, cuando una de las dos variables se incrementa hasta cierto límite; lo cual sugiere que *D. coccus* tiene umbrales específicos para su desarrollo óptimo.

coccus and, at the same time, generate a higher CAC. The average values of FW in our study were low, compared with the 9.6 g of fresh cochineal obtained in studies in Peru with the same system (Hernández *et al.*, 2017).

The correlation analysis (Pearson) was significant only for FW and CAC, indicating that the lower the fresh weight of the insect, the higher the CAC (Table 2). A similar result was reported by Alonso *et al.* (2013). There are some outstanding trends that could explain the behavior of the productive variables (Table 2), for example, in total illumination (ILTOTAL), minimum temperature (TMIN), average relative humidity (HRPROM) and CAC (CA), or between maximum temperature (TMAX) and illumination (ILTOTAL) and FW. All the trends indicate that CAC and FW increase proportionally when one of the two variables, increases up to a certain limit. This suggests that *D. coccus* has specific thresholds for optimal development.

The results and trends obtained in this study indicate that both relative humidity and luminosity, but principally temperature, at each height level within the “nopaloteca” affected productivity (FW) and quality (CAC) of *D. coccus*. Therefore, and because cochineal producers use colonies of their own systems as rearing stock for successive generations of production or they commercialize them as seed

Cuadro 2. Matriz de correlación entre variables productivas y variables climáticas analizadas.

Table 2. Correlation matrix between the analyzed productive and climatic variables.

	AC [†]	PF	TMAX	TPROM	TMIN	HRMAX	HRPROM	HRMIN	ILTOTAL
	1.00	-0.38[‡]	0.21	0.06	0.26	-0.18	0.41	0.24	0.28
PF		1.00	-0.11	0.05	0.01	-0.03	-0.33	-0.10	-0.19
TMAX			1.00	0.89	-0.06	0.48	0.36	-0.80	0.94
TPROM				1.00	0.24	0.18	-0.05	-0.82	0.71
TMIN					1.00	-0.86	-0.34	0.29	-0.26
HRMAX						1.00	0.54	-0.60	0.59
HRPROM							1.00	0.04	0.53
HRMIN								1.00	-0.69
ILTOTAL									1.00

[†]AC = Concentración de ácido carmínico (%); PF = peso fresco (%); TMAX = temperatura máxima (°C); TPROM = temperatura promedio (°C); TMIN = temperatura mínima (°C); HRMAX = humedad relativa máxima (%); HRPROM = humedad relativa promedio (%); HRMIN = humedad relativa mínima (%); ILTOTAL = iluminación total (lux). [‡]Los valores en negrita son significativos (r, Pearson; $\alpha=0.05$). ♦ AC = Carminic acid concentration (%); PF = fresh weight (%); TMAX = maximum temperature (°C); TPROM = average temperature (°C); TMIN = minimum temperature (°C); HRMAX = maximum relative humidity (%); HRPROM = average relative humidity (%); HRMIN = minimum relative humidity (%); ILTOTAL = total illumination (lux). [‡]Values in bold type are significant (r, Pearson; $\alpha=0.05$).

Los resultados y tendencias obtenidos en esta investigación indican que tanto la humedad relativa y la luminosidad, pero principalmente la temperatura de cada nivel de cría dentro de la “nopaloteca”, influyeron en la productividad (PF) y calidad (CAC) de *D. coccus*. Por lo tanto, y debido a que los productores de cochinilla utilizan colonias de su propio sistema como pies de cría para las siguientes generaciones de producción o las comercializan como simiente, se sugiere seleccionar las hembras provenientes del nivel 3 (1.5 m) en la “nopaloteca”.

Con la finalidad de incrementar la CAC en *D. coccus* se recomienda dejar que las hembras concluyan su proceso reproductivo, aunque se requiera un número mayor de insectos por unidad de medida. Esta cantidad mayor se requiere por la reducción del peso corporal que implica el proceso reproductivo. Una ventaja adicional de esta opción es que la hembra muere de manera natural, y se evita su sacrificio.

CONCLUSIONES

El nivel (altura) más eficiente en la nopaloteca para la producción de ácido carmínico fue 1.0 m. Sin embargo, no proporciona las mejores condiciones para que las hembras de *D. coccus* generen peso corporal mayor. La parte media de la estructura brinda las condiciones adecuadas para incrementar tanto la productividad, como la concentración del ácido carmínico.

La etapa de postoviposición fue mejor para la recolecta de las hembras, en función de la concentración de ácido carmínico, la cual fue mayor cuando el peso fresco de la hembra se redujo. Estos resultados pueden facilitar a los productores la toma de decisiones, sobre las condiciones requeridas para mantener o incrementar la calidad y el rendimiento de la cochinilla en su sistema de cría, de acuerdo con sus objetivos (venta para colorante o pie de cría).

LITERATURA CITADA

- Aldama-Aguilera, C., C. Llanderal-Cázares, M. Soto-Hernández, y L. E. Castillo-Márquez. 2005. Producción de grana-cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) en plantas de nopal a la intemperie y en microtúneles. *Agrociencia* 39:161-171.
- Alonso, M., G. Palacios, S. P. Ortín, A. Talamo, R. Rojas, L. B. Lozano, M. E. Toncovich, and E. E. A. Cerrillos. 2013. Evaluation of carminic acid obtained from cochineal (*Dactylopius coccus* Costa) produced under protected conditions. *Acta Hort.* 995: 401-404.

insects, we suggest selection of females from level 3 (1.5 m) in the “nopaloteca”.

With the goal of increasing CAC in *D. coccus*, we recommend allowing the females to conclude their reproductive process, even though it requires a larger number of insects per unit of measure. This higher number is required because of the reduction in body weight that occurs in the reproductive process. An additional advantage of this option is that the females die naturally, and their sacrifice is avoided.

CONCLUSIONS

The most efficient height level in the “nopaloteca” for production of carminic acid was 1.0 m. However, this level does not provide the best conditions for *D. coccus* females to generate more body weight. The middle part of the structure provides adequate conditions for increasing both productivity and the concentration of carminic acid.

The post-oviposition stage was better for collecting the females, as a function of the concentration of carminic acid, which was higher when the fresh weight of the female was reduced. These results can facilitate decision-making by the producers regarding the conditions required to maintain or increase quality and yield of cochineal in their rearing systems, depending on their objectives (sale for dye or for rearing stock).

—End of the English version—

-----*

- Anculle, A. A., C. V. Castro, y O. A. Julca. 2017. Caracterización de fincas productoras de tuna (*Opuntia ficus-indica*) para la producción de cochinilla del carmín (*Dactylopius coccus*) en La Joya (Arequipa, Perú). *Aporte Santiaguino* 10: 245-258.
- Briseño-Garzón, A., y C. Llanderal. 2008. Contenido de ácido carmínico en hembras de grana cochinilla de diferentes edades. In: Llanderal C., D. H. Zetina, A. L. Viguera, y L. Portillo (eds). *Grana Cochinilla y Colorantes Naturales*. Colegio de Postgraduados. ISBN: 978-607-7533-10-8. Texcoco, México. pp:16-20.
- Campos-Figueroa, M. C., y C. Llanderal-Cázares. 2003. Producción de grana cochinilla *Dactylopius coccus* (Homoptera: Dactylopiidae) en invernadero. *Agrociencia*. 37: 149-155.
- Chávez-Moreno, C. K., A. Tecante, and A. Casas. 2009. The *Opuntia* (Cactaceae) and *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) in Mexico: a historical perspective of use, interaction, and distribution. *Biodivers. Conserv.* 18: 3337.

- Dettner, K. 2014. Toxins, defensive compounds, and drugs from insects. *In*: Hoffmann, K. (ed). Insect Molecular Biology and Ecology. 1st edition. eBook ISBN: 9780429156137. CRC Press. Boca Raton, FL. pp: 39-93.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2015. Scientific opinion on the re-evaluation of cochineal, carminic acid, carmines (E 120) as a food additive. Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. EFSA J. 13: 1-65.
- Flores-Alatorre, H. L., V. Abrego-Reyes, J. A. Reyes-Esparza, E. Ángeles, and F. Alba-Hurtado. 2014. Variation in the concentration of carminic acid produced by *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopidae) at various maturation stages. J. Econ. Entomol. 107: 1700-1705.
- Hernández, A. A. D., L. L. A. Matos, C. J. A. Rojas, V. A. P. Santa Cruz, L. A. A. Cortez, y D. L. A. Huayna. 2017. Utilización de la técnica nopaloteca para la crianza de *Dactylopius coccus* Costa bajo condiciones controladas. Rev. Infinitum 7:1-8.
- Méndez-Gallegos, S. de J., L. A. Tarango-Arambula, A. Carnero, R. Tiberi, y O. Díaz-Gómez. 2010. Crecimiento poblacional de la cochinilla *Dactylopius coccus* Costa criada en cinco cultivos de nopal *Opuntia ficus-indica* Mill. Agrociencia. 44: 225-234.
- Müller-Maatsch, J., and C. Gras. 2016. The "carmine problem" and potential alternatives. *In*: Carle, R. and R. Schweiggert (eds). Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages, Industrial Applications for Improving Food Color. 1st edition. eBook ISBN:9780081003923. Wood head Publishing, Elsevier Ltd. Cambridge, UK. pp: 385-428.
- Nobel, P. S. 1998. Los Incomparables Agaves y Cactus. Trillas. México. pp: 121-125.
- OEPM (Oficina Española de Patentes y Marcas). 2019. Proceso industrial de producción de cochinilla del carmín. España. <https://patentados.com/2011/proceso-industrial-de-produccion>. (Consulta: marzo 2019).
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. (Consulta: abril 2019).
- Rodríguez, L. C., E. Faúndez, J. Seymour, C. A. Escobar, L. Espinoza, M. Petroutsas, A. Ayres, y H. M. Niemeyer. 2005. Factores bióticos y concentración de ácido carmínico en la cochinilla (*Dactylopius coccus* Costa) (Homoptera: Dactylopiidae). Agric. Téc. 65(3):323-329.
- Tello, V., y J. Vargas. 2015. Efecto de la luz artificial a diferentes fotoperiodos sobre dos variables productivas de la grana cochinilla, *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae) para su cultivo bajo condiciones controladas. IDESIA (Chile) 33:23-30.
- Tovar A., M. Pando-Moreno, and C. Garza. 2005. Evaluation of three varieties of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller as hosts of the cochineal insect *Dactylopius coccus* Costa (Homoptera: Dactylopiidae) in a semiarid area of northeastern Mexico. Econ. Bot. 59: 3-7.