



**IPICYT**

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**“Simbiontes Cultivables de la Grana Cochinilla  
(Hemiptera:Dactylopiidae)”**

Tesis que presenta

**Olmo Jaime Campos Juárez**

Para obtener el grado de

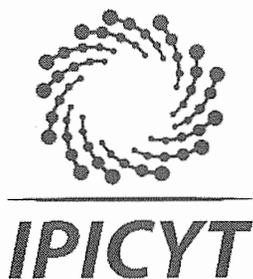
**Maestro en Ciencias en Biología Molecular**

**Codirectores de la Tesis:**

**Dr. Luis Antonio Salazar Olivo**

**Dra. Sandra Pérez Miranda**

**San Luis Potosí, S.L.P., enero de 2019**



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Simbiontes cultivables de la grana cochinilla (Hemiptera:Dactylopiidae)**" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Olmo Jaime Campos Juárez** y aprobada el veinticuatro de enero del dos mil diecinueve por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

**Luis Antonio Salazar Olivo**  
Codirector de la tesis

**Dra. Sandra Perez Miranda**  
Codirectora de la tesis

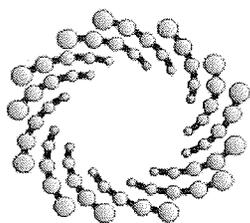
**Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. y en el Laboratorio de Microbiología de Productos Naturales del Consorcio de Innovación, Investigación y Desarrollo para las Zonas Áridas, bajo la codirección del Dr. Luis Antonio Salazar Olivo y la Dra. Sandra Pérez Miranda. El escrito de tesis se redactó en el formato de un artículo de investigación original siguiendo las instrucciones para autor de la revista *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, editada por Elsevier B.V.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 609107).



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 187 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 24 días del mes de enero del año 2019, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Sandra Perez Miranda</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Luis Antonio Salazar Olivo</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Olmo Jaime Campos Juárez**

sobre la Tesis intitulada:

*Simbiontes cultivables de la grana cochinilla (Hemiptera:Dactylopiidae)*

que se desarrolló bajo la dirección de

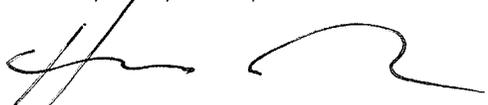
**Dra. Sandra Perez Miranda**  
**Dr. Luis Antonio Salazar Olivo**

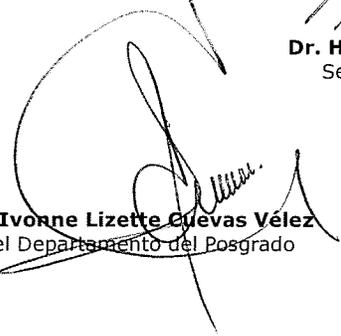
El Jurado, después de deliberar, determinó

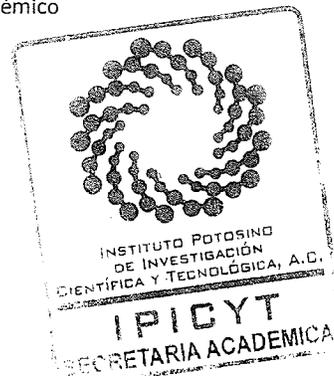
**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 18:48 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 24 días del mes de enero de 2019.

  
**Dr. Horacio Flores Zúñiga**  
Secretario Académico

  
**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado



## Dedicatorias

Al Dr. Luis, bajo su asesoría he logrado obtener conocimientos y habilidades que abarcan más allá de lo que refleja esta tesis.

A mi familia, que me ha apoyado incondicionalmente en cada paso para culminar éste proyecto.

Fitzya, desde que te conocí alegraste mis días. Este proceso no hubiera sido nada sin ti a mi lado, tengo una deuda infinita contigo.

Papá, miles de pláticas se han quedado en silencio así como ideas en el tintero. Siempre me harás falta.

Va por ustedes.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Al Dr. Luis A. Salazar Olivo y la Dra. Sandra Pérez Miranda, por la dirección y apoyo en este trabajo.

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, miembro de mi comité tutorial, por sus aportaciones a la tesis.

Al Dr. Carlos Barajas López, In Memoriam. Por su apoyo e interés en el proyecto.

A los profesores de la DBM, sus enseñanzas han forjado en mí una nueva concepción de la ciencia y el universo que intentamos explicar.

Al Ing. Joaquín Ortega Espinoza, por facilitarnos las muestras de grana fina. Y particularmente, al Dr. Santiago de Jesús Méndez Gallegos. Por su sincero interés y apoyo material e intelectual al proyecto. Es usted un ejemplo de compromiso con el avance del conocimiento tecnocientífico y ha sido un honor poder contar con el apoyo de una autoridad en el tema.

A la Dra. Angélica Montoya por su guía en el trabajo experimental de éste y más trabajos, pero principalmente por su amistad.

A Clara, Claudia y Viri; amigas y compañeras de laboratorio que hicieron mucho más amenos todos los días de trabajo, dentro y fuera del laboratorio.

Natalia, compañera y amiga desde el principio. Gracias por estar siempre allí. Alejandra, hermana de laboratorio y amiga por supuesto. Gracias por las inmensas pláticas, académicas o personales, todas han sido muy valiosas y necesarias. Ambas han sido parte esencial de éste recorrido.

Particularmente, quiero agradecer a mi familia. A mi madre por impulsarme siempre a alcanzar cada objetivo y ser siempre un apoyo incondicional. A mi hermano por sus conversaciones siempre llenas de curiosidad y siempre saber distraerme cuando más lo necesitaba.

Fitzya, literalmente desde el inicio de éste proyecto me diste palabras de aliento sin siquiera conocerme y no has dejado de apoyarme a cada instante. No exagero al decir que todo hubiera sido mucho más difícil y pesado sin ti a mi lado, no hay forma de agradecer por todo.

# Contenido

<b>Constancia de aprobación de la tesis</b>	<b>ii</b>
<b>Créditos institucionales</b>	<b>iii</b>
<b>Acta de examen</b>	<b>iv</b>
<b>Dedicatorias</b>	<b>v</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>vi</b>
<b>Contenido</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>ix</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>x</b>
<b>Resumen</b>	<b>xi</b>
<b>Abstract</b>	<b>xii</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>5</b>
<b>2. Metodología</b>	<b>12</b>
2.1 Muestreo de los insectos	12
2.2 Aislamiento y cultivo de endosimbiontes de Grana Cochinilla	12
2.2.1 Aislamiento de endosimbiontes	12
2.2.2 Aislamiento de exosimbiontes	14
2.2.3 Extracción de DNA, amplificación del gen 16S rRNA y secuenciación de los aislados	15
2.2.4 Alineamiento de secuencias del gen 16S rRNA	15
<b>3. Resultados</b>	<b>16</b>
3.1 Aislamiento de endosimbiontes	16
3.2 Identificación de Endosimbiontes	17
3.3 Aislamiento de exosimbiontes	18
3.4 Identificación de exosimbiontes	18
<b>4. Discusión</b>	<b>20</b>
4.1 Endosimbiontes de grana cochinilla silvestre	20
4.2 Endosimbiontes de grana cochinilla fina	21
4.3 Exosimbiontes de grana cochinilla fina	23
<b>5. Referencias</b>	<b>28</b>
<b>6. Tablas</b>	<b>37</b>
<b>7. Figuras</b>	<b>40</b>
<b>8. Pies de Figura.</b>	<b>55</b>

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Características de los microorganismos aislados de <i>Dactylopius</i> .	37
<b>Tabla 2.</b> Identidades sugeridas de los microorganismos aislados de <i>Dactylopius</i> .	38
<b>Tabla 3.</b> Microorganismos identificados para los aislados de <i>Dactylopius</i> .	39

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura del ácido carmínico.	40
<b>Figura 2.</b> Características macro y microscópicas de los aislados obtenidos a partir de grana cochinilla.	41
<b>Figura 3.</b> Alineamiento de la secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DsSe1.	42
<b>Figura 4.</b> Alineamiento de la secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DsSe2.	43
<b>Figura 5.</b> Alineamiento de la secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DcHe1.	45
<b>Figura 6.</b> Alineamiento de la secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DcHe2.	47
<b>Figura 7.</b> Alineamiento de la secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DcHse1.	48
<b>Figura 8.</b> Alineamiento de la secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DcCse1.	50
<b>Figura 9.</b> Alineamiento de la secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DcCse2.	51
<b>Figura 10.</b> Alineamiento de la secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DcLse1.	52

## Abreviaturas

<b>AC</b>	Ácido Carmínico
<b>DsSe1</b>	<i>Dactylopius</i> sp. Sobrenadante estéril 1
<b>DsSe2</b>	<i>Dactylopius</i> sp. Sobrenadante estéril 2
<b>DcHe1</b>	<i>Dactylopius coccus</i> Costa Homogenizado estéril 1
<b>DcHe2</b>	<i>Dactylopius coccus</i> Costa Homogenizado estéril 2
<b>DcHse1</b>	<i>Dactylopius coccus</i> Costa Homogenizado no estéril 1
<b>DcCse1</b>	<i>Dactylopius coccus</i> Costa Cera no estéril 1
<b>DcCse2</b>	<i>Dactylopius coccus</i> Costa Cera no estéril 2
<b>DcCse3</b>	<i>Dactylopius coccus</i> Costa Cera no estéril 3
<b>DcLse1</b>	<i>Dactylopius coccus</i> Costa Lavado no estéril 1
<b>PBS</b>	Amortiguador de fosfatos

## Resumen

### **Simbiontes Cultivables de la Grana Cochinilla (Hemiptera:Dactylopiidae)**

El ácido carmínico (AC) es un pigmento rojo brillante obtenido de las hembras de *Dactylopius* (Hemiptera:Dactylopiidae), particularmente de *Dactylopius coccus* Costa, popularmente llamado grana cochinilla. La alta estabilidad del AC a temperaturas y pH extremos y su uso autorizado como aditivo en alimentos, cosméticos y medicamentos lo convierten en un colorante natural con alto potencial tecnológico. Sin embargo, el AC todavía se produce principalmente mediante técnicas tradicionales, lo que resulta en producciones de cantidad limitada y calidad variable y desalienta su uso industrial. Además, los mecanismos de síntesis del AC en *Dactylopius* son aún desconocidos. Aunque se ha propuesto que el AC podría sintetizarse, al menos parcialmente, por endosimbiontes del insecto, hasta la fecha solo se han reportado tres posibles endosimbiontes en *Dactylopius*, basados en análisis metagenómicos, pero ninguno de ellos ha sido aislado o cultivado. En el presente trabajo, aislamos tres endosimbiontes y cuatro exosimbiontes de hembras de *Dactylopius coccus* Costa y dos endosimbiontes de *Dactylopius* sp. Presentamos las características morfológicas y bioquímicas de los microorganismos aislados, así como su posible identidad basada en análisis moleculares. Este es el primer informe de simbiontes cultivables aislados de *Dactylopius*, lo que podría ser útil para avanzar en el conocimiento del insecto y su producción del AC.

**PALABRAS CLAVE:** Grana cochinilla, *Dactylopius*, simbiontes, secuenciación del gen 16SrRNA

## Abstract

### **Culturable Symbionts from Cochineal Insect (Hemiptera:Dactylopiidae)**

Carminic acid (CA) is a bright red pigment obtained from the females of *Dactylopius* (Hemiptera:Dactylopiidae), particularly from *Dactylopius coccus* Costa, popularly called cochineal. The high stability of CA to extreme pH and temperatures and its authorized use as an additive in foods, cosmetics and drugs make it a natural colorant with the greatest technological potential. However, CA is still mostly produced by traditional techniques, which results in productions of limited quantity and variable quality and discourages its industrial use. In addition, the mechanisms of CA synthesis of in *Dactylopius* are yet unknown. Although it has been proposed that CA could be synthesized, at least partially, by endosymbionts present in the insect, to date only three possible endosymbionts have been reported in *Dactylopius*, based on bioinformatic analyses, but none of them had been isolated or cultured. In the present work, we isolate three endosymbionts and four exosymbionts from *Dactylopius coccus* Costa females and two endosymbionts from *Dactylopius* sp. females. We present the morphological and biochemical characteristics of the isolated microorganisms, as well as their possible identity based on molecular analyses. This is the first report of cultured symbionts isolated from *Dactylopius* species which could be useful to advance in the knowledge of the insect and its production of CA.

KEY WORDS: Cochineal, *Dactylopius*, culturable symbionts, 16SrRNA gene sequencing.

## **Simbiontes cultivables de la grana cochinilla (Hemiptera:Dactylopiidae)**

Olmo J. Campos Juárez<sup>a</sup>, Sandra Pérez Miranda<sup>b\*</sup> y Luis A. Salazar Olivo<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C., División de Biología Molecular, Camino a la Presa San José 2055 Col. Lomas 4a. Sección San Luis Potosí, SLP, 78216, México.

<sup>b</sup>CONACYT-IPICYT/Consortio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas, Camino a la Presa San José 2055 Col. Lomas 4a. Sección, San Luis Potosí, SLP, 78216, México.

\* Corresponding autor: Tel.: +52(444)8342000 Ext. 2054/7314

E-mail address: olivo@ipicyt.edu.mx, sperez@ipicyt.edu.mx

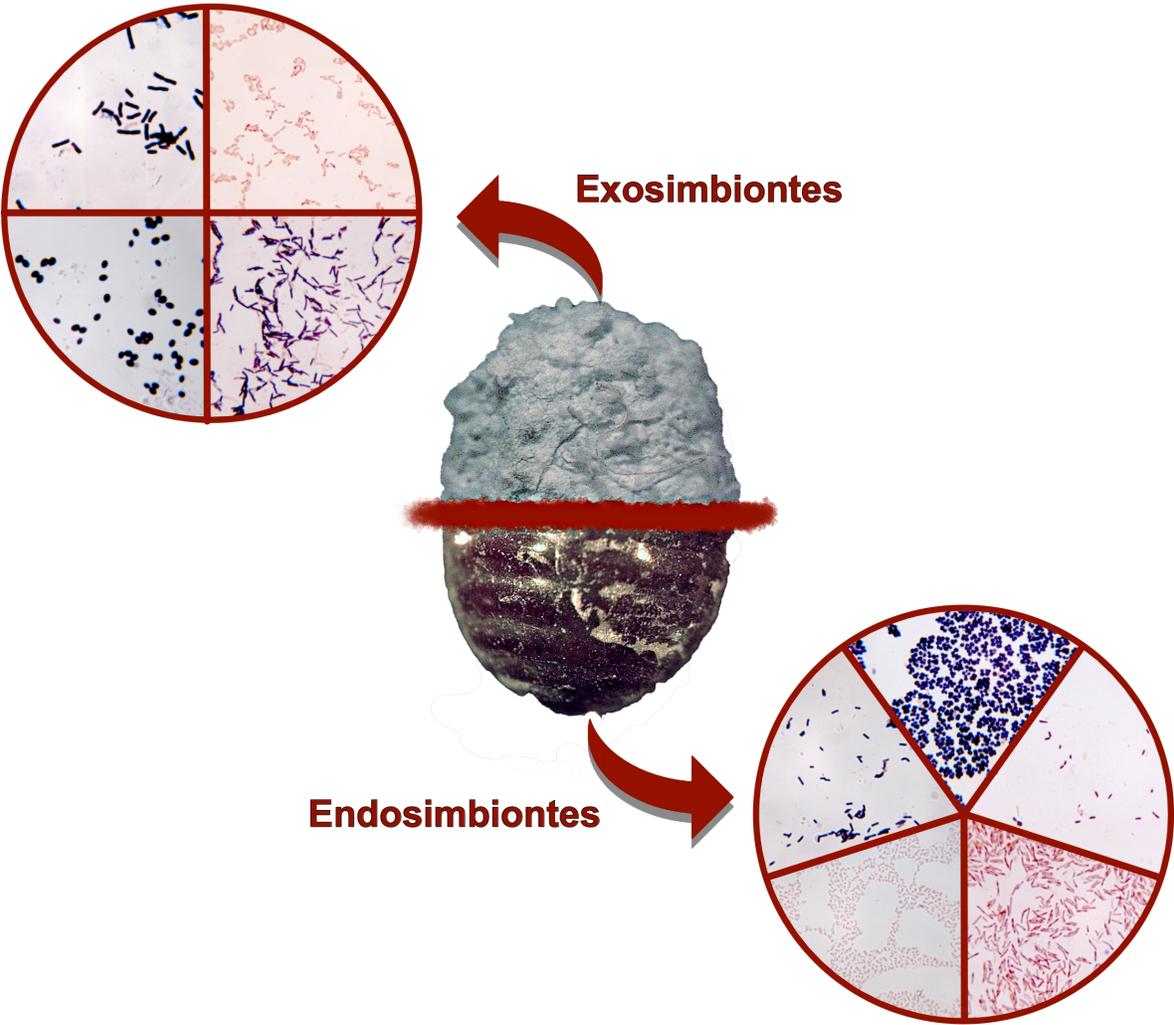
## Resumen

### Simbiontes cultivables de la grana cochinilla (Hemiptera:Dactylopiidae)

El ácido carmínico (AC) es un pigmento rojo brillante obtenido de las hembras de *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae), particularmente de *Dactylopius coccus* Costa, popularmente llamado grana cochinilla. La alta estabilidad del AC a temperaturas y pH extremos y su uso autorizado como aditivo en alimentos, cosméticos y medicamentos lo convierten en un colorante natural con alto potencial tecnológico. Sin embargo, el AC todavía se produce principalmente mediante técnicas tradicionales, lo que resulta en producciones de cantidad limitada y calidad variable y desalienta su uso industrial. Además, los mecanismos de síntesis del AC en *Dactylopius* son aún desconocidos. Aunque se ha propuesto que el AC podría sintetizarse, al menos parcialmente, por endosimbiontes del insecto, hasta la fecha solo se han reportado tres posibles endosimbiontes en *Dactylopius*, basados en análisis bioinformáticos, pero ninguno de ellos ha sido aislado o cultivado. En el presente trabajo, aislamos tres endosimbiontes y cuatro exosimbiontes de hembras de *Dactylopius coccus* Costa y dos endosimbiontes de *Dactylopius* sp. Presentamos las características morfológicas y bioquímicas de los microorganismos aislados, así como su posible identidad basada en análisis moleculares. Este es el primer informe de simbiontes cultivables aislados de *Dactylopius*, lo que podría ser útil para avanzar en el conocimiento del insecto y su producción del AC.

**PALABRAS CLAVE:** Grana cochinilla, *Dactylopius*, simbiontes, secuenciación del gen 16S rRNA.

**Resumen Gráfico**



## Ideas destacadas

- La capacidad de formar asociaciones simbióticas mutualistas ha permitido el éxito adaptativo de los insectos, incluso cuando dependen exclusivamente de dietas nutricionalmente restringidas.
- *Dactylopius* sp. (Hemiptera: Dactylopiidae), comúnmente llamada cochinilla, vive adherida y se alimenta de la savia del nopal, una fuente pobre de nutrientes.
- Se han reportado tres posibles endosimbiontes para *Dactylopius* sp. pero ninguno de ellos ha sido aislado o cultivado.
- Reportamos el aislamiento de cinco endosimbiontes y cuatro exosimbiontes cultivables a partir de hembras de *Dactylopius* spp. y su posible identidad con base en análisis moleculares.

## 1. Introducción

La grana cochinilla es un insecto que ha sido aprovechado como fuente de carmín, un colorante rojo intenso usado desde tiempos prehispánicos en Centro y Sudamérica. El carmín fue un producto de alto valor y gran demanda y llegó a ser el segundo producto de exportación de la Nueva España, después de los minerales preciosos (Chávez-Moreno et al., 2013; Coll-Hurtado, 1998; Donkin, 1977). México, que fue su más importante centro de producción, sufrió una pérdida casi total de la industria cuando aparecieron las anilinas sintéticas en la década de 1860 (Dapson, 2007).

La grana cochinilla pertenece al género *Dactylopius*, y a la familia unigenérica Dactylopiidae, que incluye 9 especies de insectos hemípteros fitófagos de 1-6 mm de largo. Estos se caracterizan por sus cuerpos coloridos y por secretar una cubierta cerosa blanca parecida al algodón, y se alimentan exclusivamente de nopales del género *Opuntia* sp. y *Nopalea* sp. (Chávez-Moreno et al., 2009).

*Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera:Dactylopiidae), comúnmente llamada grana fina, es la única especie del género cultivada para usos comerciales, debido a la calidad y alto contenido de colorante que posee (Chávez-Moreno et al., 2009). Las otras especies de *Dactylopius* se conocen genéricamente como grana silvestre y poseen menor tamaño y menor cantidad de colorante por lo que no se explotan comercialmente.

El ácido carmínico (AC), el principal componente colorante del carmín que se extrae de los cuerpos secos de las hembras de grana cochinilla, es una hidroxiantraquinona con una unidad de glucosa como sustituyente en su posición C7 (Figura 1), que posee un color rojo intenso (carmín) el cual le da su nombre. Su

color es modulado por el pH: a valores de pH menores a 4.5 tiene una apariencia naranja pálido; a pH 7.0–7.7 es rojo y rojo claro; y a pH superior a 12.0 su color es magenta-rojo (Dapson, 2007, 2005).

Debido a la posición de sus grupos carbonilo e hidroxilo, el AC es adecuado para formar enlaces de coordinación con iones metálicos (Dapson, 2007). La laca de aluminio del AC, comercialmente conocida como carmín es un colorante semisintético, es decir, un complejo de aluminio y AC. El carmín es soluble en soluciones alcalinas, pero insoluble en agua, alcohol, éter, benceno y ácidos débiles. El color del carmín depende menos del pH que el AC pues por debajo de pH 7.0, mantiene su color rojo intenso; sin embargo, precipita a pH inferiores a 3.5 (Dapson, 2007; Kendrick, 2012; Müller-Maatsch y Gras, 2016).

El AC y el carmín son extraordinariamente estables cuando se exponen al calor y la luz, en comparación con otros colorantes naturales que proporcionan tonos rojos (Gosetti et al., 2015; Müller-Maatsch y Gras, 2016). Parece que su principal limitante es la de seguir impartiendo su característico color rojo en pH menores a 3.5, por lo que recientemente se desarrolló el ácido 4-aminocarmínico, un derivado sintético del AC cuyo color rojo púrpura intenso es independiente del pH y es soluble en agua (Dapson, 2007; Müller-Maatsch y Gras, 2016).

La cochinilla y sus derivados, como ya mencionamos, tienen una larga historia como colorante para alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos y textiles; lo cual les permite su uso como aditivo en todos los mercados principales (Estados Unidos, Unión Europea, Japón, China y MERCOSUR). A excepción del ácido 4-aminocarmínico, cuya aplicación en alimentos no está permitida en Europa y

Japón, ya que su toxicología aún no se ha estudiado (Müller-Maatsch y Gras, 2016).

Todos los países destinatarios refieren al Codex Alimentarius como guía para la aplicación de la cochinilla y sus derivados como aditivo alimentario, farmacéutico y cosmético (Müller-Maatsch y Gras, 2016; Vandamme, 2011). El Codex Alimentarius utiliza el sistema de numeración internacional No. 120, así como el Índice de color (C.I.) con el nombre genérico C.I. Rojo Natural 4 y el número de constitución C.I. 75470 para todos los productos derivados de la cochinilla. Únicamente en la Unión Europea se utiliza la etiqueta E120 para referirse igualmente a los productos derivados de la cochinilla (Codex Alimentarius Commission, 2014; EFSA, 2015; JECFA, 2000a, 2000b; Kendrick, 2012; Müller-Maatsch y Gras, 2016).

Particularmente para México, los requisitos para los aditivos alimentarios están regulados por la Secretaría de Salud, a través de la Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios, que se publica en el “Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios”. En el artículo 22 del reglamento se establecen las normas para los aditivos, indicando que requieren el cumplimiento de las recomendaciones del Codex Alimentarius. Además, los requisitos para el extracto de cochinilla y carmín se especificaron en la NOM-119-SSA1-1994 titulada “Materias primas para alimentos, productos de perfumería y belleza. Colorantes orgánicos naturales, especificaciones sanitarias” (Müller-Maatsch y Gras, 2016; Secretaría de Salud, 2014, 1994).

Irónicamente, el factor que condujo a la desaparición de la cochinilla también es el responsable de su resurgimiento mundial. Los tintes sintéticos, especialmente los

rojos, se vincularon a varios problemas de salud en la década de 1980, particularmente en los Estados Unidos; Japón y Europa pronto se unieron para prohibir a muchos de ellos en alimentos, medicamentos y cosméticos (Dapson, 2007; Lokeshwari y Shantibala, 2010; Shahid et al., 2013).

Los tintes naturales han vuelto a ser una opción viable. Sin embargo, la variación en la calidad de la cochinilla es un problema grave para los usuarios, pues las diferencias en el clima, el tipo de suelo, la humedad, la estación y la geografía de donde se obtiene afecta su calidad y su composición (Méndez et al., 2004). De igual forma, el carmín muestra una considerable variabilidad de lote a lote, debido a la escasa estandarización de sus métodos de producción (Dapson, 2007). Por ello, recientemente se ha prestado mucha atención a la síntesis biotecnológica de colores, particularmente para el AC a través de microorganismos (Frandsen et al., 2018; Rasmussen et al., 2018; Revuelta et al., 2016; Vandamme, 2011).

Los insectos que dependen exclusivamente de dietas nutricionalmente restringidas, como la savia de las plantas para la grana cochinilla o la sangre de vertebrados y el material leñoso para otras especies de invertebrados, comúnmente poseen simbiosis mutualistas obligados, los cuales están involucrados en el suministro de nutrientes esenciales o la degradación de los materiales alimenticios (Kikuchi, 2009; Rosenblueth et al., 2017). Esto nos permite explicar que los insectos sean uno de los grupos de organismos vivos más exitosos de la tierra, comprendiendo aproximadamente el 95% de todas las especies de animales conocidas (Eleftherianos et al., 2013).

Los microorganismos mutualistas obligados en insectos se encuentran entre las simbiosis especializadas, estables y más altamente limitadas conocidas en el

mundo animal y ocurren en aproximadamente el 10-20% de las especies de insectos. Estas simbiosis son típicamente de naturaleza nutricional, ya que las bacterias a menudo complementan nutrientes específicos que faltan en la dieta del huésped pero también pueden realizar funciones más generales, como el reciclaje de nitrógeno (Wernegreen, 2012). Los endosimbiontes mutualistas obligados se encuentran principalmente en los bacteriocitos, que son células especializadas que proporcionan nutrientes a las bacterias, y se transmiten por vía materna (Baumann, 2005; Bright y Bulgheresi, 2010).

Los insectos han evolucionado conjuntamente con sus endosimbiontes mutualistas obligados durante varios millones de años; por lo tanto su relación es obligada, lo que significa que los insectos que carecen de sus bacterias no pueden crecer y reproducirse, y de igual forma las bacterias simbióticas no son viables en ausencia de su huésped, esto tiene como principal consecuencia que las bacterias mutualistas obligadas no son cultivables fuera de su huésped (Kikuchi, 2009).

Dadas las enormes restricciones funcionales y adaptativas de las bacterias mutualistas obligadas si su tasa de transmisión no es exactamente del 100% pueden llegar a perderse eventualmente. Esta presión evolutiva selectiva puede contrarrestarse mediante la transmisión horizontal de nuevos simbiosis, a los que llamaremos simbiosis facultativos.

Los simbiosis facultativos también dependen de insectos hospederos y confieren ventajas específicas como la protección contra enemigos naturales, la mejora de la nutrición del huésped y la tolerancia al estrés térmico; pero a diferencia de los mutualistas obligados, no son esenciales para la supervivencia o la fecundidad del hospedero, han desarrollado relaciones simbióticas más recientemente, no

muestran congruencia en las trayectorias evolutivas, pueden ser transitorios, a menudo infectan solo una fracción de una población anfitriona dada, se pueden encontrar en el hemocele (cavidad del cuerpo del insecto que contiene la hemolinfa y los órganos), pueden transmitirse horizontalmente, verticalmente o a través del entorno y son usualmente cultivables. Estas propiedades se han interpretado como indicador de que las bacterias facultativas están realmente en una etapa intermedia en la transición de vida libre a mutualistas obligadas (Eleftherianos et al., 2013; Kikuchi, 2009; Wernegreen, 2012).

Se han reportado tres microorganismos identificados a partir de la grana cochinilla: *Dactylopiibacterium carminicum* (Betaproteobacteria), *Wolbachia bourtzisii* wDacA (Alphaproteobacteria) y *Wolbachia pipientis* wDacB (Alphaproteobacteria) (Rosenblueth et al., 2017). Las bacterias del género *Wolbachia* han sido ampliamente reportadas como simbioses de insectos (Kikuchi, 2009; Pankewitz et al., 2007). Destaca principalmente, la más recientemente reportada *Dactylopiibacterium carminicum* pues se cree puede compensar la deficiencia de nitrógeno en la dieta de la cochinilla. Además, se especula que este simbiote puede proporcionar aminoácidos esenciales, reciclar el ácido úrico y aumentar la vida útil de la cochinilla (Vera-Ponce de León et al., 2017). Estos tres microorganismos parecen ser mutualistas obligados pues se encuentran presentes en todas las especies de grana cochinilla; sin embargo no han logrado ser cultivados (Ramírez-Puebla et al., 2016; Ramírez-Puebla et al., 2010; Vera-Ponce de León et al., 2017).

Se han identificado igualmente, mediante trabajos de metagenómica la presencia de organismos cercanos a las bacterias no simbióticas: *Massilia* sp.,

*Herbaspirillum* sp., *Acinetobacter* sp., *Mesorhizobium* sp. y *Sphingomonas* sp. a partir de muestras de grana silvestre (Ramírez-Puebla et al., 2010), las cuales parece tratarse más bien de simbiontes facultativos presentes únicamente en esas muestras en particular.

Dada la importancia que ha tomado recientemente el estudio de la grana cochinilla, donde se han logrado desde la identificación metagenómica de endosimbiontes mutualistas obligados hasta la identificación de enzimas clave para la síntesis del AC (Kannangara et al., 2017; Rasmussen et al., 2018), resulta sorprendente la falta de investigación sobre sus simbiontes facultativos cultivables pudiendo estos llegar a ser de interés académico e industrial por su papel en el metabolismo de la grana cochinilla e inclusive un posible papel en la síntesis del AC. Aquí reportamos el aislamiento de cinco endosimbiontes y cuatro exosimbiontes cultivables a partir de hembras de *Dactylopius* spp. y su posible identidad con base en análisis moleculares.

## **2. Metodología**

### **2.1 Muestreo de los insectos**

Especímenes de grana corriente (*Dactylopius* sp.; Ds) se obtuvieron de plantas de *Opuntia ficus indica* cultivadas en jardines públicos de la ciudad de San Luis Potosí. Los especímenes de grana fina (*Dactylopius coccus* Costa; Dc) fueron proporcionados por el Dr. Santiago de Jesús Méndez Gallegos del Colegio de Postgraduados, Campus San Luis Potosí; y el Ing. Joaquín Ortega Espinoza, asesor de producción de grana cochinilla de Granazac, Colorantes Naturales. Se realizaron 5 colectas de ambas muestras entre Enero de 2017 y junio de 2018 y se transportaron sobre los cladodios de la planta hospedera al laboratorio para su procesamiento.

### **2.2 Aislamiento y cultivo de endosimbiontes de Grana Cochinilla**

#### **2.2.1 Aislamiento de endosimbiontes**

Para el aislamiento de posibles microorganismos endosimbiontes se realizaron dos metodologías diferentes. En la primera metodología, dentro de un ambiente aséptico (campana de flujo laminar) las hembras oviplenas de ambas especies recién colectadas de su hospedero se sumergieron en etanol al 70% para remover su cubierta cerosa. Una vez libres de cera, su superficie se desinfectó primero con hipoclorito de sodio (NaClO) al 6% por 5 min y después con etanol al 70% por 5 min. Finalmente, las muestras se enjuagaron con amortiguador de fosfatos estéril (PBS) y el último lavado se inoculó en condiciones asépticas sobre medio LB por triplicado para corroborar la correcta sanitización de la muestra.

Las muestras de grana desinfectadas se maceraron con un homogenizador Potter-Elvehjem de vidrio con 4 mL de PBS estéril. Los restos de tejido se separaron mediante centrifugación (4,300 rpm/5 min) y se resuspendió en 4 mL de solución isotónica estéril (NaCl 0.9%). El sobrenadante se reservó en condiciones estériles. 100  $\mu$ L de la suspensión de tejido homogenizado (**He**) y de sobrenadante (**Se**) se inocularon por separado y triplicado en medios de cultivo LB (10 g/L peptona, 5 g/L extracto de levadura y 5 g/L NaCl), YPD (20 g/L peptona, 10 g/L extracto de levadura y 20 g/L glucosa), MMT (3.0 g/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1.0 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.025 g/L  $\text{MgSO}_4$ , 0.25 g/L  $\text{CaCl}_2$ , 0.025 g/L KCl, 0.2 g/L  $\text{FeSO}_4$ , 0.2 g/L extracto de levadura, 10.0 g/L glucosa y 5.0 g/L sacarosa), harina de soya-manitol (SFM; 20 g/L harina de soya y 20 g/L manitol), glicerol-asparagina (1.0 g/L asparagina, 10 g/L glicerol, 1 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 mg/mL solución sales trazas), medio mínimo (MM; 5 g/L peptona, 1 g/L extracto de levadura, 0.022 g/L ácido bórico, 0.06 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ , 10.0 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.08 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.4 g/L  $\text{CaCl}_2$ , 0.2 g/L KCl, 0.1 g/L  $\text{NaCO}_3$ , 1 g/L  $\text{NaSO}_4$ , y 5 g/L CaCl), agar nutritivo (AN; 5 g/L peptona, 3 g/L extracto de levadura y 8 g/L NaCl) y de Gaus (20.0 g/L almidón, 1.0 g/L  $\text{KNO}_3$ , 0.5 g/L NaCl, 0.5 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 g/L  $\text{MgSO}_4$  y 0.01 g/L  $\text{FeSO}_4$ ). Todos los medios de cultivo se incubaron a 28°C, junto con triplicados de cada medio sin inocular como control.

En la segunda metodología, se diseccionaron en un ambiente aséptico hembras oviplenas de *Dactylopius coccus* Costa para retirar su exoesqueleto y el tejido interno recuperado se homogenizó con solución isotónica estéril. Se inocularon por triplicado 100  $\mu$ L del homogenizado en agar nutritivo (**Hse**) y se incubaron a

28°C, junto con su control.

Todos los aislados obtenidos de ambas metodologías fueron observados al microscopio para asegurar que fueran cultivos axénicos, además se realizó tinción de Gram de cada cultivo para realizar una clasificación inicial y facilitar su visualización (Claus, 1992).

### **2.2.2 Aislamiento de exosimbiontes**

Para cada ensayo se realizaron dos tratamientos: uno en agar nutritivo sin antibióticos y otro en agar nutritivo adicionado con ácido nalidixico (50 µg/mL), polimixina s-β (10 µg/ml) y cicloheximida (200 µg/mL). Hembras ovíparas de *Dactylopius coccus* fueron colectadas en tubos estériles. En un ambiente estéril (campana de flujo laminar), se depositaron 3 insectos por caja de agar nutritivo y se hicieron rodar sobre la superficie del medio hasta saturarlo con la cera que recubre a la grana. Una vez saturada la superficie de la caja, los insectos se cambiaron a una nueva caja del mismo medio y se repitió el procedimiento; esto se repitió en el número de cajas necesario para retirar en su totalidad la cera, a estos tratamientos se les denominó cera sin esterilizar (**Cse**) y se realizó el número de veces necesario para tener cada tratamiento por triplicado.

Posteriormente, se recuperaron los insectos en un tubo estéril y se lavaron con agua estéril. 100 µL de los lavados se inocularon por triplicado en agar nutritivo (**Lse**). Todas las cajas se incubaron a 28°C, junto con un triplicado del mismo medio de cultivo sin inocular como control. Todos los aislados fueron observados al microscopio con la tinción de Gram para asegurar que fueran cultivos axénicos.

### **2.2.3 Extracción de DNA, amplificación del gen 16S rRNA y secuenciación de los aislados**

Se realizó la extracción del DNA genómico de los aislados (Yeates et al., 1998) y se usó como molde para la reacción de PCR usando los oligonucleótidos 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492R(5'-TACCTTG TTACGACTT) para el gen bacteriano 16S rRNA, con un amplicón teórico esperado de 1510 pb. La mezcla de reacción para PCR se preparó bajo el siguiente protocolo: 1µL de DNA, 2.5 µL de buffer, 13 µL de H<sub>2</sub>O, 2.5 µL de dimetil sulfóxido (DMSO), 1µL de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), 2.5 µL de mezcla de desoxinucleotidos trifosfato, 1µL de cada oligonucleótido y 0.5 µL de Taq polimerasa. Las mezclas de reacción se incubaron por 4 min a 94°C, seguido por 23 ciclos a 94°C por 1 min, 57°C por 1 min y 72°C por 1.5 min y una extensión final de 2 min a 72°C. Los productos amplificados se mandaron a secuenciar para su análisis posterior.

### **2.2.4 Alineamiento de secuencias del gen 16S rRNA**

Las secuencias obtenidas de los amplicones del gen 16S rRNA para cada aislado se curaron manualmente y, mediante la integración del forward y el reverse, se obtuvo una sola secuencia consenso por aislado. Esta secuencia consenso se alineó con la base de datos del gen 16S rRNA de GenBank, mediante el algoritmo MegaBlast usando el software Geneious, para identificar los posibles organismos correspondientes a cada aislado.

### **3. Resultados**

Se obtuvieron 71 aislados a partir de 5 colectas de muestra, de las cuales se seleccionaron 9 aislados que presentaban características tanto macroscópicas como microscópicas representativas de todos los aislados.

#### **3.1 Aislamiento de endosimbiontes**

De las muestras de *Dactylopius* sp. se obtuvieron dos cultivos axénicos de posibles endosimbiontes a partir de los tratamientos obtenidos de inocular los sobrenadantes (DsSe1 y DsSe2). El primer aislado (DsSe1) produjo colonias blancas, irregulares y de apariencia opaca, y al observarse al microscopio sus células tuvieron apariencia de bacilos y dieron un resultado positivo en la tinción de Gram (Figura 2A). El segundo aislado (DsSe2) presentó colonias color crema, circulares y opacas, y sus células presentaron forma de cocos en racimos y fueron también Gram positivo (Figura 2B).

A partir de los homogeneizados de *Dactylopius coccus* obtenidos mediante la primera metodología descrita se aislaron los cultivos DcHe1 y DcHe2, y uno más a partir de la segunda metodología (DcHse1). El aislado DcHe1 presentó colonias circulares, color crema y opacas y observada al microscopio presentó forma de bacilo y tinción de Gram positiva (Figura 2C). El aislado DcHe2 presentó colonias contrastantemente diferentes a las aisladas con el mismo tratamiento pues aunque también son circulares tienen color amarillo y apariencia brillante. A escala microscópica también difirieron pues se compuso de bacilos Gram negativo (Figura 2D). Y el aislado DcHse1 posee colonias circulares, blancas y brillantes, y células con forma de bacilo y Gram negativo (Figura 2E).

### 3.2 Identificación de Endosimbiontes

Mediante el alineamiento de las secuencias del gen 16S rRNA de cada aislado con la base de datos GenBank de NCBI se identificaron las especies bacterianas a las que pueden pertenecer los microorganismos obtenidos de *Dactylopius* sp. Para el aislado DsSe1, el fragmento secuenciado mostró una identidad del 78.5% con las especies *Bacillus nakamurai* (NR\_151897), *B. axarquiensis* (NR\_115929) y *B. halotolerans* (NR\_115063), así como una identidad del 78.3% con *B. mojavenis* (NR\_112725) y *B. atrophaeus* (NR\_112723; Figura 3), por mencionar únicamente los cinco mejores resultados. Los primeros cien resultados del alineamiento mostraron especies de *Bacillus* con una identidad superior al 78% con nuestro aislado. Por otro lado, el fragmento 16S rRNA del aislado DsSe2 presentó una identidad del 65% con las especies *Staphylococcus hominis* (NR\_036956), *S. haemolyticus* (NR\_113345), *S. devriesei* (NR\_116627), *S. petrasii* (NR\_118450), *S. edaphicus* (NR\_156818), *S. saprophyticus* (NR\_115607) y *S. lugdunensis* (NR\_024668; Figura 4).

En el caso de los posibles endosimbiontes aislados de *Dactylopius coccus*, el fragmento secuenciado para el aislado DcHe1 presentó una identidad del 88% con *Bacillus australimaris* (NR\_148787), *B. zhangzhouensis* (NR\_148786), *B. pumilus* (NR\_115334), *B. safensis* (NR\_113845), *B. xiamenensis* (NR\_148244), *B. stratosphericus* (NR\_118441), *B. aerius* (NR\_118439) y *B. altitudinis* (NR\_042337; Figura 5). Para el aislado DcHe2 se identificó una secuencia con identidad superior al 97% a las especies *Kosakonia oryzae* (NR\_116033), *Kosakonia arachidis* (NR\_116403), *Enterobacter massiliensis* (NR\_125600) y *Kosakonia radicincitans* (NR\_117704; Figura 6). Mientras que en el aislado DcHse1 se

identificó un fragmento con una identidad superior al 96% a las especies *Lysinibacillus mangiferihumi* (NR\_118146), *L. fusiformis* (NR\_112628), *L. pakistanensis* (NR\_113166), *L. sphaericus* (NR\_112627), *L. varians* (NR\_134074), *L. macroides* (NR\_114920) y *L. boronitolerans* (NR\_114207; Figura 7).

### **3.3 Aislamiento de exosimbiontes**

Paralelamente, se logró aislar y cultivar tres microorganismos a partir de la cera que recubre a la grana fina y un microorganismo de la superficie libre de cera de ésta. El aislado DcCse1 formó colonias circulares blancas y opacas, y de forma celular de bacilo, Gram negativo (Figura 2G). DcCse2, el segundo aislado exógeno, resultó ser el más peculiar de todos los obtenidos pues forma colonias circulares brillantes y de color rosado, y al observarlo al microscopio se ven células ovoides, levaduriformes, Gram positivas (Figura 2H). DcCse3, el último aislado de la cera, mostró colonias circulares, blancas y brillantes, y células con forma de bacilo y Gram positivas (Figura 2I). Finalmente, de los lavados realizados al exoesqueleto de la grana fina se aisló un microorganismo (DcLse1) con colonias circulares, color crema y opacas, y células con forma de bacilo y Gram positivas (Figura 2F).

### **3.4 Identificación de exosimbiontes**

En la identificación de los microorganismos obtenidos de la cera de *Dactylopius coccus* se obtuvieron las secuencias de los amplicones (mediante PCR) y se alinearon contra la base de datos del GenBank del gen 16S rRNA. Para el aislado DcCse1 se identificó un fragmento con una identidad mayor al 99% con *Bacillus*

*megaterium* (NR\_117473) y *B. aryabhatai* (NR\_115953; Figura 8), y para el aislado DcCse2 el fragmento obtenido presentó una identidad del 67% con *Sphingobium* sp. (LC133672) y *Sphingomonas* sp. (LC101917; Figura 9). Destaca que el tratamiento DcCse3 no arrojó ningún resultado (Tabla 2) bajo la misma metodología de identificación. Finalmente, DcLse1 el último aislado exógeno presentó una identidad del 83% con las especies *Bacillus safensis* (NR\_113945), *B. australimaris* (NR\_148787), *B. xiamenensis* (NR\_148244), *B. aerius* (NR\_118439), *B. pumilus* (NR\_112637), *B. altitudinis* (NR\_042337), *B. stratosphericus* (NR\_042336), *B. zhangzhouensis* (NR\_148786) y *B. atrophaeus* (NR\_112723; Figura 10).

## 4. Discusión

### 4.1 Endosimbiontes de grana cochinilla silvestre

El primer aislado obtenido a partir de grana cochinilla silvestre (DsSe1) tuvo identidad con diversas especies del género *Bacillus*, una bacteria con forma de bacilo y Gram positivo, lo que coincide con las características microscópicas observadas para nuestro aislado (Tabla 1). Por esto proponemos que DsSe1 es una bacteria del género *Bacillus*, probablemente cercana filogenéticamente a *B. nakamurai* (NR\_151897) pero cuya identidad precisa análisis adicionales.

Entre los organismos con los que DsSe1 mostró mayor grado de identidad (78.5%) se encuentran *Bacillus nakamurai* (NR\_151897) y *B. atropheus* (NR\_112723), microorganismos con capacidad de producir colonias de un característico color oscuro bajo determinadas condiciones de crecimiento (Dunlap et al., 2016), la cual es una de las características que hubiéramos deseado observar en alguno de nuestros aislados. Sin embargo, resulta complicada la idea de obtener un aislado que pueda sintetizar por sí mismo el AC pues este es un compuesto ubicuo en todas las especies de *Dactylopius* e incluso compartido con otras especies de hemípteros por lo que de ser un microorganismo el encargado de la síntesis tendría mayores probabilidades de tratarse de un mutualista obligado, complicado de lograr aislar.

El aislado DsSe2, también obtenido de muestras de grana silvestre, presentó una identidad relativamente baja (60%) con el género *Staphylococcus*, el cual suele ser relacionado como comensal de la piel humana (Natsis y Cohen, 2018) pero también ha sido reportado como bacteria endófito de plantas (Marag y Suman,

2018). Con los valores de identidad obtenidos es difícil asegurar que el aislado sea un organismo de la misma especie a los identificados (Tabla 2), pero comparando las características fenotípicas reportadas podemos encontrar una alta identidad, pues *Staphilococcus homini* (NR\_036956) posee células con forma de cocos en racimos y Gram positivo que forma colonias pequeñas (1-2 mm) de color blanco (Kloos et al., 1998). Por tanto, proponemos que DsSe2 puede ser un microorganismo del género *Staphylococcus*, pero lejano a *S. homini* (NR\_036956) o *S. haemolyticus* (NR\_113345) que han sido reportados como comensales humanos.

Para determinar con precisión la identidad de estos microorganismos deberán de realizarse otro tipo de metodologías de identificación molecular de microorganismos mediante fragmentos genómicos alternativos al 16S rRNA (Ercolini, 2004; Ishii y Sadowsky, 2009; Schmalenberger et al., 2001; Singhal et al., 2015) y en último caso secuenciar su genoma completo pudiendo tratarse de especies no reportadas previamente.

#### **4.2 Endosimbiontes de grana cochinilla fina**

A partir del tejido de grana cochinilla fina, homogenizado en condiciones estériles como se describió en la primera metodología, se obtuvieron dos aislados. El aislado DcHe1 se identificó con mayor identidad con los microorganismos *Bacillus australimaris* (NR\_148787), *B. zhangzhouensis* (NR\_148786), *B. pumilus* (NR\_115334) y *B. safensis* (NR\_13945), con una identidad del 88.5%. Estas cuatro bacterias forman parte del mismo clado filogenético y presentan una gran identidad en su genoma (Liu et al., 2016); además, sus células poseen forma de

bacilo y son Gram positivo, al igual que nuestro aislado (Tabla1), por lo que proponemos que DcHe1 se trata de una bacteria del género *Bacillus* cercano al mismo clado.

Para el aislado DcHe2 se identificó a *Kosakonia oryzae* (NR\_116033), con una identidad del 97.2%, como el organismo más relacionado. Bacterias del género *Kosakonia* han sido caracterizadas como simbioses de plantas fungiendo como fijadoras de nitrógeno. Particularmente, *K. oryzae* se aisló de las raíces de plantas de arroz, tiene forma de bacilo y es Gram negativo, forma colonias circulares, convexas, suaves y con márgenes enteros (Li et al., 2017), coincidiendo con las características tanto macro como microscópicas de nuestro aislado. Por lo tanto, proponemos que DcHe2 se trata de una bacteria del género *Kosakonia* íntimamente relacionada con *K. oryzae* y puede provenir de la relación simbiótica que tiene la grana cochinilla con su hospedero. Es importante resaltar que de ser ciertas ambas propuestas estamos encontrando un microorganismo previamente reportado como aislado en las raíces de diferentes plantas pero en esta ocasión como simbiote de un insecto que se alimenta exclusivamente del floema de una planta, de modo que podemos pensar en que la bacteria se puede encontrar en los fluidos de esta planta y así ser transmitida a la grana. Además, en trabajos previos se ha propuesto que algunos simbioses de la grana podrían tener la función de ayudar a la obtención de nitrógeno a partir del floema del nopal (Vera-Ponce De León et al., 2016) proponiendo hongos endosimbioses que pueden cumplir esta función, ésta sería la primera bacteria aislada con la misma capacidad.

El aislado DcHse1 posee una identidad del 97.9% con *Lysinibacillus mangiferihumi* (NR\_118146) y *L. fusiformis* (NR\_112628; Tabla 2). El primero fue aislado de la rizosfera de plantas de mango y el segundo de *Drosophila melanogaster*, por lo que ambas cepas parecen ser muy posibles candidatos a simbioses (Smith y Unckless, 2018; Yang et al., 2012). Sin embargo, existen diferencias fenotípicas pues sabemos que las colonias de *L. mangiferihumi* son circulares, con márgenes enteros y de un color amarillo pálido mientras que las de nuestro aislado son de color blanco y aún más contrastante es que tanto las células de *L. mangiferihumi* como *L. Fusiformis* son bacilos Gram positivo y nuestro aislado es un bacilo Gram negativo. De modo que encontramos información contradictoria que no nos permite asegurar que nuestro aislado forme parte siquiera del mismo género con el que se le identificó mediante alineamiento del gen 16S rRNA, requeriríamos realizar pruebas de confirmación de la tinción de Gram (Gregersen, 1978) y pruebas bioquímicas o una técnica de identificación molecular alternativa para asegurarnos de que se trate o no del mismo género; incluso podemos llegar a pensar en realizar secuenciación del genoma completo en caso de que sea necesario realizar una identificación de alguna especie diferente a las reportadas.

#### **4.3 Exosimbiontes de grana cochinilla fina**

De los tres aislados obtenidos a partir del recubrimiento ceroso de *Dactylopius coccus* Costa únicamente se pudo identificar a dos de ellos con la metodología utilizada. El aislado DcCse1 se identificó como *Bacillus megaterium* (NR\_117473) y *B. aryabhatai* (NR\_115953) con una identidad del 99.1%, ambas bacterias tienen forma de bacilo y son Gram positivo pero forman colonias bastante

diferentes entre sí, *B. megaterium* forma colonias circulares de 1-2 mm de diámetro, grises a amarillo pálido, convexas, márgenes enteros y apariencia granular o de vidrio molido mientras que *B. aryabhatai* forma colonias circulares de mayor tamaño, 5-8 mm, planas, margen entero y de color durazno; de modo tal que las colonias de nuestro aislado tendrían mayor cercanía con las de *B. megaterium* sin llegar a ser idénticas. Sin embargo, es a nivel microscópico donde encontramos la principal diferencia pues nuestro aislado es Gram negativo. De igual forma que para el aislado DcHse1, debemos realizar confirmación de la tinción de Gram, pruebas bioquímicas y probablemente secuenciación del genoma completo.

Para el aislado DcCse2 obtuvimos una identidad del 67.9% con *Sphingobium* sp. (LC133672) y *Sphingomonas* sp. (LC101917), géneros muy cercanos filogenéticamente entre sí y que han sido ampliamente reportados en aislados de suelo y plantas (Takeuchi et al., 2001; White et al., 1996). *Sphingobium* sp. LC133672 y KJ809146 fueron identificados en los aislados de muros de cavernas, así como en bacterias no cultivables de hongos micorrízicos arbusculares, respectivamente (Iffis et al., 2014); mientras que *Sphingomonas* sp. (LC101917) se aisló de muestras de suelo forestal (Mizukami-Murata et al., 2016). *Sphingobium* y *Sphingomonas* se caracterizan por tener forma de bacilos Gram negativo y colonias amarillas, únicamente *Sphingobium* ha presentado variaciones en la coloración de sus colonias llegando éstas a tener color marrón blanquecino (Takeuchi et al., 2001). En este caso, nuestro aislado además de tener muy baja identidad genotípica no tiene ninguna fenotípica pues microscópicamente lo consideramos levaduriforme, tuvo una respuesta positiva a la tinción de Gram y

forma colonias color rosa. Cabe resaltar que Ramírez-Puebla et al. (2010) han identificado mediante metagenómica a otro simbiote con identidad a *Sphingomonas* sp. en una muestra de grana silvestre pero más relevante es que en la identificación del endosimbionte de *Dactylopius* al que han llamado *Dactylopiibacterium carminicum*, reportaron que alineaba erróneamente con una identidad del 95% con *Sphingomonas* sp. A1 (Ramírez-Puebla et al., 2010; Vera-Ponce de León et al., 2017), esto junto con la coloración rosada de las colonias de nuestro aislado lo hace muy interesante; sin embargo, al realizar el alineamiento específico con el gen 16S rRNA de éste endosimbionte tenemos aún más bajos valores de identidad (Grade:19.4%, Bitscore:59.896 y cobertura del 14.11%; Figura 11) por lo que no podemos proponer que se trate de esta especie y deberíamos realizar alguna técnica alternativa de identificación molecular o secuenciación genómica para poder distinguir la identidad de éste interesante aislado.

Destaca que el tratamiento DcCse3 no arrojó ningún resultado (Tabla 2, I) pero en este caso parece deberse a la baja calidad de secuenciación del amplicón, pues al realizar un alineamiento más laxo (blastn) tampoco se obtuvieron resultados positivos, por lo que se propone repetir la secuenciación para poder realizar la identificación.

El último aislado obtenido, DcLse1 presentó una identidad del 83.5% con *Bacillus safensis* (NR\_113945), un aislado obtenido a partir de la rizósfera de la planta de comino y al que se considera una bacteria promotora del crecimiento de la planta (Kothari y Kothari, 2013). *B. safensis* posee forma de bacilo y es Gram positivo, forma colonias redondas, onduladas, con márgenes irregulares y opacas (Satomi

et al., 2006). DcLse comparte el mismo fenotipo a nivel microscópico y sus colonias difieren únicamente en los bordes lisos por lo que podemos suponer que el aislado DcLse1 se trate de una especie de *Bacillus* muy cercana a *Bacillus safensis*.

Cabe resaltar que mediante dos protocolos diferentes se aislaron dos microorganismos (DcHe1 y DcLse1) que parecen identificarse certeramente como bacterias del género *Bacillus* y de hecho poseen valores de identidad muy parecidos a las mismas especies. Por lo que puede tratarse de especies muy cercanas filogenéticamente entre sí aunque tengan diferencias fenotípicas. Su presencia al interior así como al exterior puede confirmarnos que se trate de un posible simbiote facultativo con un origen externo para él, es decir que sea obtenido de forma horizontal por el hospedero del insecto.

Este es el primer reporte de microorganismos cultivables aislados de la grana cochinilla. Aunque la búsqueda de endosimbiontes tuvo la finalidad de encontrar posibles participantes de la síntesis del AC, no se hallaron fenotipos que reflejaran dicha actividad. Dadas las características de los endosimbiontes facultativos, puede considerarse que los aislados de *Dactylopius* aquí reportados podrían participar parcialmente en la síntesis del AC o bien que esta sea realizada por un mutualista obligado, no cultivable bajo las condiciones empleadas en este trabajo. Sin embargo, esto no demerita a los aislados obtenidos pues pueden tener importantes papeles metabólicos para la grana cochinilla y por lo tanto un potencial biotecnológico. Destaca principalmente la presencia de un simbiote muy cercano a *Kosakonya oryzae* por su posible papel en la incorporación de nitrógeno en la dieta, que es una de las características que definen a los

endosimbiontes facultativos. Proponemos realizar secuenciaciones de genoma completo de algunos aislados para identificar con mayor certeza, pero además esto servirá para identificar actividades enzimáticas de interés pues pueden llegar a tener aplicaciones agronómicas o industriales.

## 5. Referencias

- Baumann, P., 2005. BIOLOGY OF BACTERIOCYTE-ASSOCIATED ENDOSYMBIONTS OF PLANT SAP-SUCKING INSECTS. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 155–189.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121041>
- Bright, M., Bulgheresi, S., 2010. A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 218–230.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2262>
- Chávez-Moreno, C.K., Tecante, A., Casas, A., 2009. The *Opuntia* (Cactaceae) y *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) in Mexico: a historical perspective of use, interaction and distribution. *Biodivers. Conserv.* 18, 3337–3355.  
<https://doi.org/10.1007/s10531-009-9647-x>
- Chávez-Moreno, C.K., Tecante, A., Fragoso-Serrano, M., Rogelio, P.-M., Casas, A., Claps, L.E., Ramírez-Puebla, S.T., Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E., 2013. the *Opuntia* (Cactaceae) and *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) in Mexico: a Historical Perspective of Use, Interaction and Distribution With Particular Emphasis on Chemical and Phylogenetic Aspects of the *Dactylopius* Species. *Acta Hortic.* 367–377.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.995.48>
- Claus, D., 1992. A standardized Gram staining procedure. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 451–452. <https://doi.org/10.1007/BF01198764>
- Codex Alimentarius Commission, 2014. Codex General Standard for Food Additives (GSFA, Codex STAN 192-1995).

- Coll-Hurtado, A., 1998. Oaxaca: Geografía histórica de la grana cochinilla. *Investig. Geográficas Boletín* 71–82.
- Dapson, R.W., 2007. The history, chemistry and modes of action of carmine and related dyes. *Biotech. Histochem.* 82, 173–187.  
<https://doi.org/10.1080/10520290701704188>
- Dapson, R.W., 2005. A method for determining identity and relative purity of carmine, carminic acid and aminocarminic acid. *Biotech. Histochem.* 80, 201–205. <https://doi.org/10.1080/10520290500485781>
- Donkin, R.A., 1977. Spanish Red An Ethnogeographical Study of Cochineal and the Opuntia Cactus. *Trans. Am. Philos. Soc.* 67, 1–84.
- Dunlap, C.A., Saunders, L.P., Schisler, D.A., Leathers, T.D., Naeem, N., Cohan, F.M., Rooney, A.P., 2016. *Bacillus nakamurai* sp. Nov., a black-pigment-producing strain. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 2987–2991.  
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001135>
- EFSA, 2015. Scientific Opinion on the re-evaluation of cochineal, carminic acid, carmines (E 120) as a food additive. *EFSA J.* 13, 2588.  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4288>
- Eleftherianos, L., Atri, J., Accetta, J., Castillo, J.C., 2013. Endosymbiotic bacteria in insects: Guardians of the immune system? *Front. Physiol.* 4 MAR.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00046>
- Ercolini, D., 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods* 56, 297–314.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.006>
- Frandsen, R.J.N., Khorsand-Jamal, P., Kongstad, K.T., Nafisi, M., Kannangara,

- R.M., Staerk, D., Okkels, F.T., Binderup, K., Madsen, B., Møller, B.L., Thrane, U., Mortensen, U.H., 2018. Heterologous production of the widely used natural food colorant carminic acid in *Aspergillus nidulans*. *Sci. Rep.* 8, 12853.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-30816-9>
- Gosetti, F., Chiuminatto, U., Mazzucco, E., Mastroianni, R., Marengo, E., 2015. Ultra-high-performance liquid chromatography/tandem high-resolution mass spectrometry analysis of sixteen red beverages containing carminic acid: Identification of degradation products by using principal component analysis/discriminant analysis. *Food Chem.* 167, 454–462.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.026>
- Gregersen, T., 1978. Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5, 123–127.  
<https://doi.org/10.1007/BF00498806>
- Iffis, B., St-Arnaud, M., Hijri, M., 2014. Bacteria associated with arbuscular mycorrhizal fungi within roots of plants growing in a soil highly contaminated with aliphatic and aromatic petroleum hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Lett.* 358, 44–54. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12533>
- Ishii, S., Sadowsky, M.J., 2009. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environ. Microbiol.* 11, 733–740. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01856.x>
- JECFA, 2000a. Carmines. *FAO Food Nutr. Pap.* 52 (Addendum 8).
- JECFA, 2000b. Cochineal Extract. *FAO Food Nutr. Pap.* 52 (Addendum 8).
- Kannangara, R., Siukstaite, L., Borch-Jensen, J., Madsen, B., Kongstad, K.T., Staerk, D., Bennedsen, M., Okkels, F.T., Rasmussen, S.A., Larsen, T.O.,

- Frandsen, R.J.N., Møller, B.L., 2017. Characterization of a membrane-bound C-glucosyltransferase responsible for carminic acid biosynthesis in *Dactylopius coccus* Costa. *Nat. Commun.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02031-z>
- Kendrick, A., 2012. Natural food and beverage colourings, in: *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings*. Woodhead Publishing Limited, pp. 25–40. <https://doi.org/10.1016/B978-1-84569-811-9.50002-5>
- Kikuchi, Y., 2009. Endosymbiotic Bacteria in Insects: Their Diversity and Culturability. *Microbes Environ.* 24, 195–204. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09140S>
- Kloos, W.E., George, C.G., Olgiate, J., Pelt, L. Van, Mckinnon, M.L., Zimmer, B.L., Eugene, M., Weinstein, M.P., Mirrett, S., Johnson, R.W., 1998. *Staphylococcus horninis* subsp. *novobiosepticus* subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D- glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *Int. J. Syst. Bacteriol.*
- Kothari, V., Kothari, R., 2013. Genome sequence of salt-tolerant *Bacillus safensis* strain VK, isolated from saline desert area of Gujarat, India. *Genome Announc.* 1, 2046. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75.3>.
- Li, Y., Li, S., Chen, M., Peng, G., Tan, Z., An, Q., 2017. Complete genome sequence of *Kosakonia oryzae* type strain Ola 51T. *Stand. Genomic Sci.* 12, 8–11. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0240-8>
- Liu, Y., Lai, Q., Du, J., Shao, Z., 2016. *Bacillus zhangzhouensis* sp. nov. and *Bacillus australimaris* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1193–1199.

<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000856>

Lokeshwari, R.K., Shantibala, T., 2010. A review on the fascinating world of insect resources: Reason for thoughts. *Psyche* (Stuttg). 2010.

<https://doi.org/10.1155/2010/207570>

Marag, P.S., Suman, A., 2018. Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays* L.). *Microbiol. Res.* 214, 101–113.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.05.016>

Méndez, J., González, M., Lobo, M.G., Carnero, A., 2004. Color Quality of Pigments in Cochineals (*Dactylopius coccus* Costa). Geographical Origin Characterization Using Multivariate Statistical Analysis. *J. Agric. Food Chem.*

52, 1331–1337. <https://doi.org/10.1021/jf0348929>

Mizukami-Murata, S., Sakakibara, F., Fujita, K., Fukuda, M., Kuramata, M., Takagi, K., 2016. Detoxification of hydroxylated polychlorobiphenyls by *Sphingomonas* sp. strain N-9 isolated from forest soil. *Chemosphere* 165, 173–182.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.127>

Müller-Maatsch, J., Gras, C., 2016. The “Carmine Problem” and Potential Alternatives, in: *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color*. Elsevier Ltd, pp. 385–428.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100371-8.00018-X>

Natsis, N.E., Cohen, P.R., 2018. Coagulase-Negative *Staphylococcus* Skin and Soft Tissue Infections. *Am. J. Clin. Dermatol.* 19, 671–677.

<https://doi.org/10.1007/s40257-018-0362-9>

Pankewitz, F., Zöllmer, A., Hilker, M., Gräser, Y., 2007. Presence of *Wolbachia* in

insect eggs containing antimicrobially active anthraquinones. *Microb. Ecol.* 54, 713–721. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9230-5>

Ramirez-Puebla, S.T., Ormeno-Orrillo, E., Vera-Ponce de Leon, A., Lozano, L., Sanchez, A., Rosenblueth, M., Martinez-Romero, E., 2016. Genomes of *Candidatus Wolbachia Bourtzisii wDacA* and *Candidatus Wolbachia Pipientis wDacB* from the Cochineal Insect *Dactylopius coccus* (Hemiptera: Dactylopiidae). *G3 & Genes|Genomes|Genetics* 6, 3343–3349. <https://doi.org/10.1534/g3.116.031237>

Ramírez-Puebla, S.T., Rosenblueth, M., Chávez-Moreno, C.K., Catanho Pereira de Lyra, M.C., Tecante, A., Martínez-Romero, E., 2010. Molecular Phylogeny of the Genus *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) and Identification of the Symbiotic Bacteria. *Environ. Entomol.* 39, 1178–1183. <https://doi.org/10.1603/EN10037>

Rasmussen, S.A., Kongstad, K.T., Khorsand-Jamal, P., Kannangara, R.M., Nafisi, M., Van Dam, A., Bennedsen, M., Madsen, B., Okkels, F., Gotfredsen, C.H., Staerk, D., Thrane, U., Mortensen, U.H., Larsen, T.O., Frandsen, R.J.N., 2018. On the biosynthetic origin of carminic acid. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 96, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.03.002>

Revuelta, J.L., Buey, R.M., Ledesma-Amaro, R., Vandamme, E.J., 2016. Microbial biotechnology for the synthesis of (pro)vitamins, biopigments and antioxidants: challenges and opportunities. *Microb. Biotechnol.* 9, 564–567. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12379>

Rosenblueth, M., Martínez-Romero, J., Ramírez-Puebla, S.T., Vera-Ponce de León, A., Rosas-Pérez, T., Bustamante-Brito, R., Rincón-Rosales, R.,

- Martínez-Romero, E., 2017. Endosymbiotic microorganisms of scale insects. TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas 21, 53–69.  
<https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.08.006>
- Satomi, M., La Duc, M.T., Venkateswaran, K., 2006. *Bacillus safensis* sp.nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 1735–1740. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64189-0>
- Schmalenberger, A., Schwieger, F., Tebbe, C.C., 2001. Effect of Primers Hybridizing to Different Evolutionarily Conserved Regions of the Small-Subunit rRNA Gene in PCR-Based Microbial Community Analyses and Genetic Profiling. Appl. Environ. Microbiol. 67, 3557–3563.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3557-3563.2001>
- Secretaría de Salud, 2014. Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios. D. Of. la Fed.
- Secretaría de Salud, 1994. Bienes y servicios Materias primas para alimentos, productos de perfumería y belleza. colorantes orgánicos naturales. especificaciones sanitarias (NOM – 119-SSA1-1994). D. Of. la Fed. 1–28.
- Shahid, M., Shahid-UI-Islam, Mohammad, F., 2013. Recent advancements in natural dye applications: A review. J. Clean. Prod. 53, 310–331.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.03.031>
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K., Viridi, J.S., 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Front. Microbiol. 6, 73–82.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Smith, B.R., Unckless, R.L., 2018. Draft Genome Sequence of *Lysinibacillus*

fusiformis Strain Juneja, a Laboratory-Derived Pathogen of *Drosophila melanogaster*. *Genome Announc* 6, e01571-17. <https://doi.org/10.1109/USNC-URSI.2016.7588521>

Takeuchi, M., Hamana, K., Hiraishi, A., 2001. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1405–1417. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-4-1405>

Vandamme, E.J., 2011. Natural colors... but of course! *SIM NEWS* 121–128.

Vera-Ponce de León, A., Ormeño-Orrillo, E., Ramírez-Puebla, S.T., Rosenblueth, M., Degli Esposti, M., Martínez-Romero, J., Martínez-Romero, E., 2017. *Candidatus Dactylopiibacterium carminicum*, a Nitrogen-Fixing Symbiont of *Dactylopius* Cochineal Insects (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae). *Genome Biol. Evol.* 9, 2237–2250. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx156>

Vera-Ponce De León, A., Sanchez-Flores, A., Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E., 2016. Fungal community associated with *Dactylopius* (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae) and its role in uric acid metabolism. *Front. Microbiol.* 7, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00954>

Wernegreen, J.J., 2012. Strategies of genomic integration within insect-bacterial mutualisms. *Biol Bull.* 223, 112–122. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

White, D.C., Suttont, S.D., Ringelberg, D.B., 1996. The genus *Sphingomonas*: Physiology and ecology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 301–306. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80034-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80034-6)

Yang, L.L., Huang, Y., Liu, J., Ma, L., Mo, M.H., Li, W.J., Yang, F.X., 2012.

*Lysinibacillus mangiferahumi* sp. nov., a new bacterium producing nematicidal volatiles. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 102, 53–59.

<https://doi.org/10.1007/s10482-012-9712-4>

Yeates, C., Gillings, M.R., Davison, A.D., Altavilla, N., Veal, D.A., 1998. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biol. Proced. Online* 1, 40–47.

## 6. Tablas

**Tabla 1. Características de los microorganismos aislados de *Dactylopius*.**

Hospedero	Aislado	Condición	Características de la colonia					Características microscópicas	
			Forma	Borde	Superficie	Color	Apariencia	Forma	Gram
<i>Dactylopius</i> sp.	DsSe1	Endosimbionte	Irregular	Ondulado	Pulvinada	Blanca	Opaca	Bacilo	+
	DsSe2	Endosimbionte	Circular	Liso	Convexo	Crema	Opaca	Coco	+
<i>Dactylopius</i> <i>coccus</i> Costa	DcHe1	Endosimbionte	Circular	Ondulado	Plana	Crema	Opaca	Bacilo	+
	DcHe2	Endosimbionte	Circular	Liso	Pulvinada	Amarillo	Brillante	Bacilo	-
	DcHse1	Endosimbionte	Circular	Liso	Convexa	Blanca	Brillante	Bacilo	-
	DcLse1	Exosimbionte	Circular	Liso	Elevada	Crema	Opaca	Bacilo	+
	DcCse1	Exosimbionte	Circular	Liso	Convexa	Blanca	Opaca	Bacilo	-
	DcCse2	Exosimbionte	Circular	Liso	Convexa	Rosada	Brillante	Levadura	+
	DcCse3	Exosimbionte	Circular	Liso	Convexa	Blanco	Brillante	Bacilo	+

**Tabla 2. Identidades sugeridas de los microorganismos aislados de *Dactylopius*<sup>1</sup>.**

Aislado	Calidad de secuenciación				Identificación			
	Forward		Reverse		Secuencia más relacionada en GenBank	NCBI ID	Bit-Score <sup>2</sup>	Grade <sup>3</sup> (%)
	pb	Calidad (%)	pb	Calidad (%)				
DsSe1	245	0.0	391	21.2	<i>Bacillus nakamurai</i>	NR_151897	617.901	78.5
DsSe2	234	4.3	252	0.0	<i>Staphylococcus hominis</i>	NR_036956	279.964	66.4
DcHe1	498	15.5	103	0.0	<i>Bacillus australimaris</i>	NR_148787	741.627	88.5
DcHe2	222	0.0	578	37.0	<i>Kosakonia oryzae</i>	NR_116033	891.205	97.2
DcHse1	329	30.7	174	0.0	<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i>	NR_118146	538.495	97.9
DcLse1	339	25.1	1049	50.6	<i>Bacillus safensis</i>	NR_113945	1604.01	83.5
DcCse1	609	34.6	153	0.0	<i>Bacillus megaterium</i>	NR_117473	1083.26	99.1
DcCse2	544	0.0	659	0.6	<i>Sphingobium</i> sp.	LC133672	208.674	67.9
DcCse3	221	0.0	156	0.0		NA <sup>4</sup>		

<sup>1</sup>Realizada mediante secuenciación del gen 16S RNAr

<sup>2</sup>Indica la calidad de alineamiento. Se calcula considerando el alineamiento de residuos similares o idénticos, así como cualquier gap introducido.

<sup>3</sup>Porcentaje calculado combinando la cobertura, el e-value y la identidad, asignándoles un peso de 0.5, 0.25 y 0.25 respectivamente.

<sup>4</sup>No aplica.

**Tabla 3. Microorganismos identificados para los aislados de *Dactylopius*<sup>1</sup>.**

Hospedero	Aislado	Condición	Secuencia más relacionada en GenBank
<i>Dactylopius</i> sp.	DsSe1	Endosimbionte	<i>Bacillus nakamurai</i>
	DsSe2	Endosimbionte	<i>Staphylococcus hominis</i>
<i>Dactylopius coccus</i> Costa	DcHe1	Endosimbionte	<i>Bacillus australimaris</i>
	DcHe2	Endosimbionte	<i>Kosakonia oryzae</i>
	DcHse1	Endosimbionte	<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i>
	DcLse1	Exosimbionte	<i>Bacillus safensis</i>
	DcCse1	Exosimbionte	<i>Bacillus megaterium</i>
	DcCse2	Exosimbionte	<i>Sphingobium</i> sp.
	DcCse3	Exosimbionte	NA <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Realizada mediante secuenciación del gen 16S RNAr

<sup>2</sup>No aplica.

## 7. Figuras

Figura 1. Estructura del ácido carmínico.

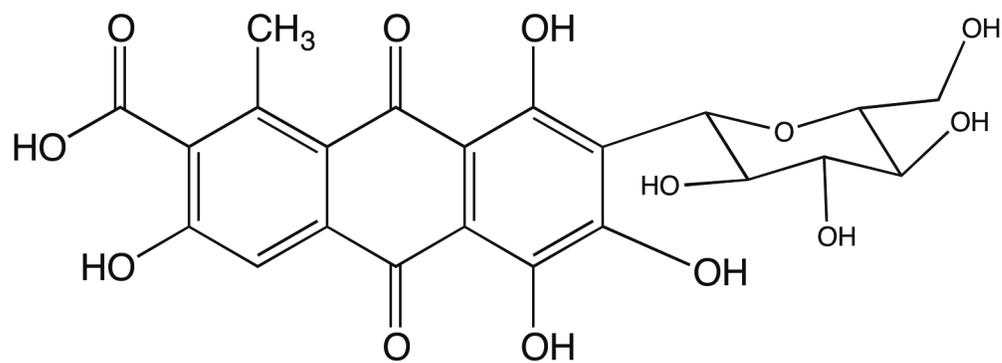


Figura 2. Características macro y microscópicas de los aislados obtenidos a partir de grana cochinilla.

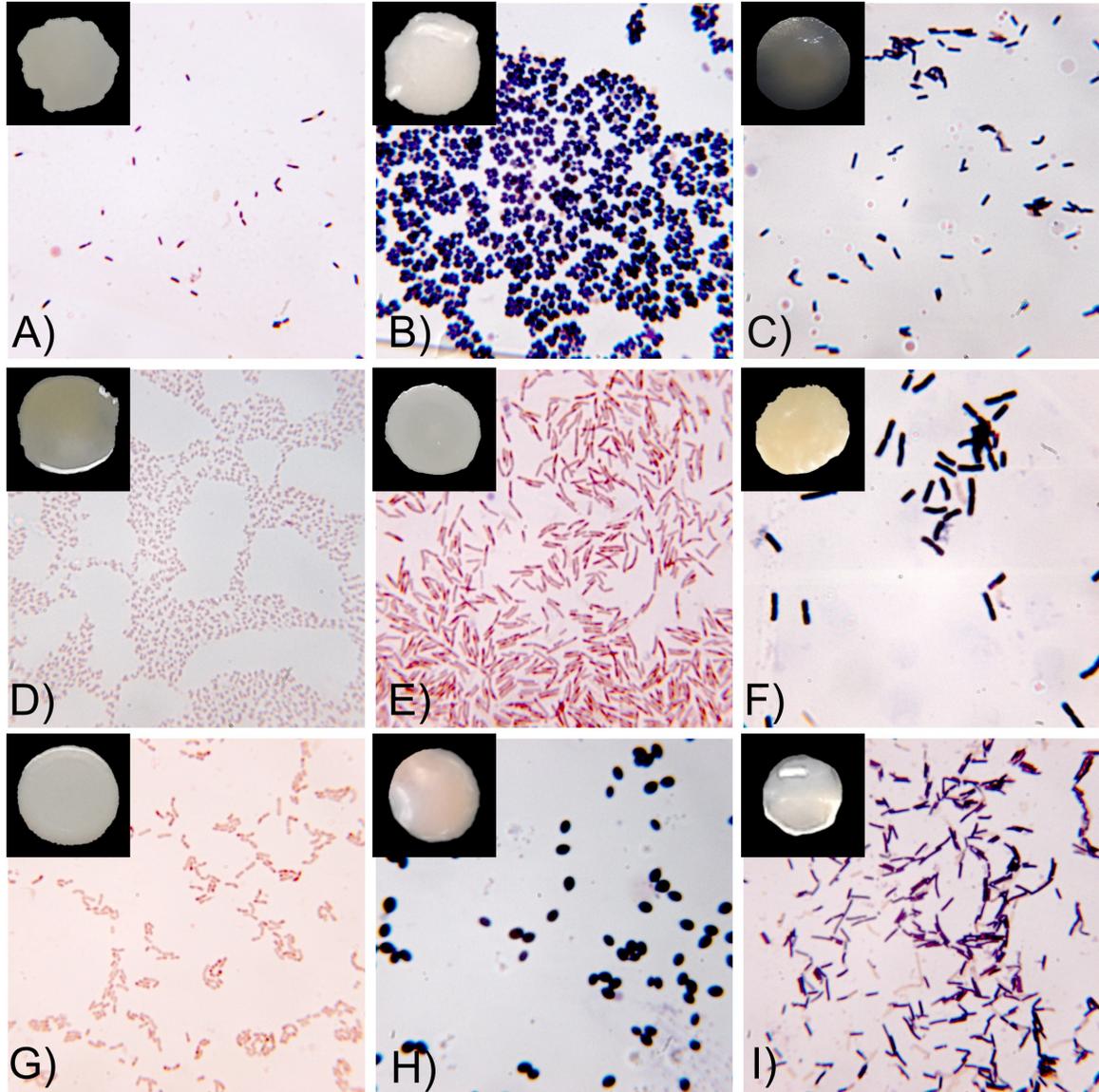


Figura 3. Alineamiento de la secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DsSe1.

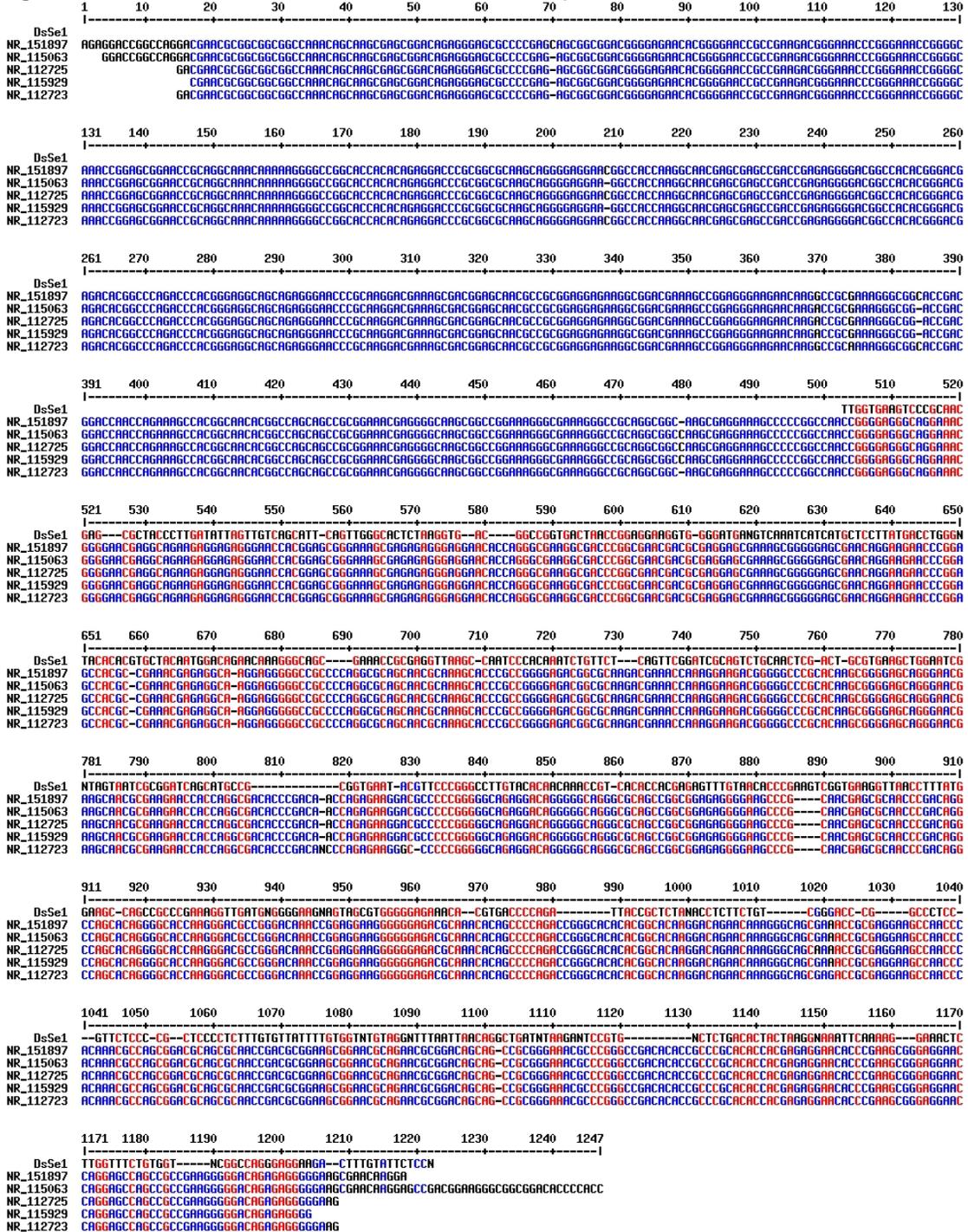
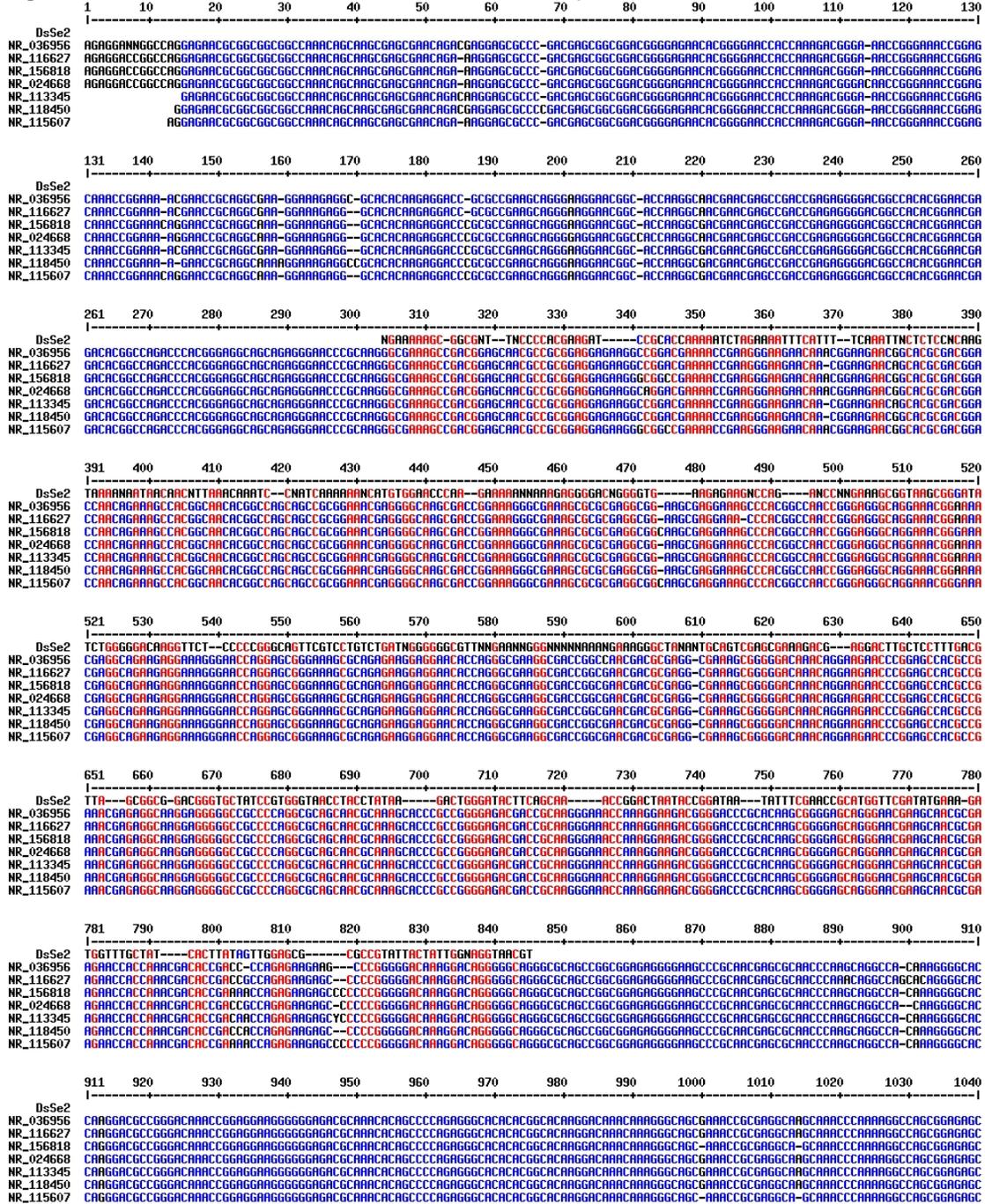


Figure 4. Alineamiento de la secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DsSe2.



1041 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170

DsSe2

NR\_036956 GCARCCGACACAGAGCGGAGCGAGACGAGACGAGCAGCAGGAAACGCCGGGCGACACACGCCCCGACACCCAGAGGAGACACCCGAGCCGGGGAGACCA-GGAGCAGCCGCGAGGGGGAC

NR\_115627 GCARCCGACACAGAGCGGAGCGAGACGAGACGAGCAGCAGGAAACGCCGGGCGACACACGCCCCGACACCCAGAGGAGACACCCGAGCCGGGGAGACCA-GGAGCAGCCGCGAGGGGGAC

NR\_156918 GCARCCGACACAGAGCGGAGCGAGACGAGACGAGCAGCAGGAAACGCCGGGCGACACACGCCCCGACACCCAGAGGAGACACCCGAGCCGGGGAGACCA-GGAGCAGCCGCGAGGGGGAC

NR\_024668 GCARCCGACACAGAGCGGAGCGAGACGAGACGAGCAGCAGGAAACGCCGGGCGACACACGCCCCGACACCCAGAGGAGACACCCGAGCCGGGGAGACCA-GGAGCAGCCGCGAGGGGGAC

NR\_113345 GCARCCGACACAGAGCGGAGCGAGACGAGACGAGCAGCAGGAAACGCCGGGCGACACACGCCCCGACACCCAGAGGAGACACCCGAGCCGGGGAGACCA-GGAGCAGCCGCGAGGGGGAC

NR\_118450 GCARCCGACACAGAGCGGAGCGAGACGAGACGAGCAGCAGGAAACGCCGGGCGACACACGCCCCGACACCCAGAGGAGACACCCGAGCCGGGGAGACCA-GGAGCAGCCGCGAGGGGGAC

NR\_115607 GCARCCGACACAGAGCGGAGCGAGACGAGACGAGCAGCAGGAAACGCCGGGCGACACACGCCCCGACACCCAGAGGAGACACCCGAGCCGGGGAGACCA-GGAGCAGCCGCGAGGGGGAC

1171 1180 1190 1200 1210 1220

DsSe2

NR\_036956 AAGAGGGGGAGCGAACAGGAGCCGACGGAGGGCGCGGACACCC

NR\_115627 AAGAGGGGGAGCGAACAGGAGCCGACGGAGGGCGCGGAC

NR\_156918 AAGAGGGGGAGCGAACAGGAGCCGACGGAGGGCGCGGACACCC

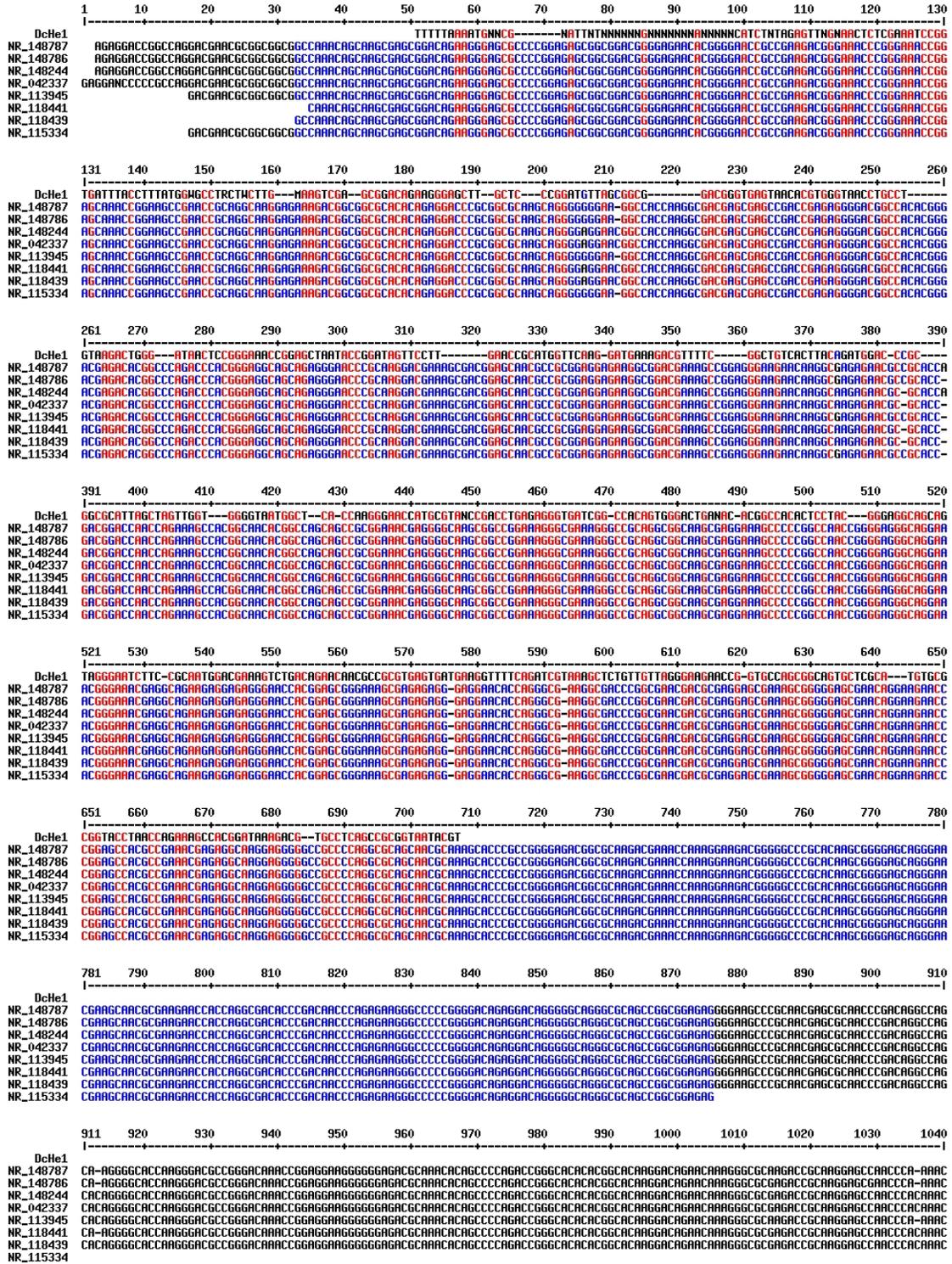
NR\_024668 AAGAGGGGG

NR\_113345 AAGAGGGGG

NR\_118450 AAGAGGGGGAGG

NR\_115607 AAGAGGGGG

Figura 5. Alineamiento de la secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DcHe1.



911 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040  
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

DeHe1  
 NR\_148787 CA-AGGGGACACAGGGGACGCCGGGACAAACCGGAGGAGGGGGGAGACGCAAAACACAGCCCCAGACCGGGGACACACGGGACAGGGACAGAACAAAGGGGCGAGAGCCGAGGGAGCCAAACCA-AAAC  
 NR\_148786 CA-AGGGGACACAGGGGACGCCGGGACAAACCGGAGGAGGGGGGAGACGCAAAACACAGCCCCAGACCGGGGACACACGGGACAGGGACAGAACAAAGGGGCGAGAGCCGAGGGAGCCAAACCA-AAAC  
 NR\_148244 CACAGGGGACACAGGGGACGCCGGGACAAACCGGAGGAGGGGGGAGACGCAAAACACAGCCCCAGACCGGGGACACACGGGACAGGGACAGAACAAAGGGGCGAGAGCCGAGGGAGCCAAACCA-AAAC  
 NR\_042337 CACAGGGGACACAGGGGACGCCGGGACAAACCGGAGGAGGGGGGAGACGCAAAACACAGCCCCAGACCGGGGACACACGGGACAGGGACAGAACAAAGGGGCGAGAGCCGAGGGAGCCAAACCA-AAAC  
 NR\_113945 CACAGGGGACACAGGGGACGCCGGGACAAACCGGAGGAGGGGGGAGACGCAAAACACAGCCCCAGACCGGGGACACACGGGACAGGGACAGAACAAAGGGGCGAGAGCCGAGGGAGCCAAACCA-AAAC  
 NR\_118441 CA-AGGGGACACAGGGGACGCCGGGACAAACCGGAGGAGGGGGGAGACGCAAAACACAGCCCCAGACCGGGGACACACGGGACAGGGACAGAACAAAGGGGCGAGAGCCGAGGGAGCCAAACCA-AAAC  
 NR\_118439 CACAGGGGACACAGGGGACGCCGGGACAAACCGGAGGAGGGGGGAGACGCAAAACACAGCCCCAGACCGGGGACACACGGGACAGGGACAGAACAAAGGGGCGAGAGCCGAGGGAGCCAAACCA-AAAC  
 NR\_115334

1041 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170  
 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

DeHe1  
 NR\_148787 GCCAGCGGACGACGCAACCGACGCGGAGCGGACGCAGAACGCGGACAGCAGCCGCGGGAAACGCCGGGCGACACACCGCCGACACACAGAGGGCAGAACCCGAGCGGGAGGAAACAGGAG  
 NR\_148786 GCCAGCGGACGACGCAACCGACGCGGAGCGGACGCAGAACGCGGACAGCAGCCGCGGGAAACGCCGGGCGACACACCGCCGACACACAGAGGGCAGAACCCGAGCGGGAGGAAACAGGAG  
 NR\_148244 GCCAGCGGACGACGCAACCGACGCGGAGCGGACGCAGAACGCGGACAGCAGCCGCGGGAAACGCCGGGCGACACACCGCCGACACACAGAGGGCAGAACCCGAGCGGGAGGAAACAGGAG  
 NR\_042337 GCCAGCGGACGACGCAACCGACGCGGAGCGGACGCAGAACGCGGACAGCAGCCGCGGGAAACGCCGGGCGACACACCGCCGACACACAGAGGGCAGAACCCGAGCGGGAGGAAACAGGAG  
 NR\_113945 GCCAGCGGACGACGCAACCGACGCGGAGCGGACGCAGAACGCGGACAGCAGCCGCGGGAAACGCCGGGCGACACACCGCCGACACACAGAGGGCAGAACCCGAGCGGGAGGAAACAGGAG  
 NR\_118441 GCCAGCGGACGACGCAACCGACGCGGAGCGGACGCAGAACGCGGACAGCAGCCGCGGGAAACGCCGGGCGACACACCGCCGACACACAGAGGGCAGAACCCGAGCGGGAGGAAACAGGAG  
 NR\_118439 GCCAGCGGACGACGCAACCGACGCGGAGCGGACGCAGAACGCGGACAGCAGCCGCGGGAAACGCCGGGCGACACACCGCCGACACACAGAGGGCAGAACCCGAGCGGGAGGAAACAGGAG  
 NR\_115334

1171 1180 1190 1200 1210 1217  
 |-----|-----|-----|-----|-----|

DeHe1  
 NR\_148787 CCAGCCGCCGAGGGGGGCGAGAGGGGGGAGCGAACAGGGAGCCGA  
 NR\_148786 CCAGCCGCCGAGGGGGGCGAGAGGGGGGAGCGAACAGGGAGCCGA  
 NR\_148244 CCAGCCGCCGAGGGGGGCGAGAGGGGGGAGCGAACAGGGAGCCGA  
 NR\_042337 CCAGCCGCCGAGGGGGGCGAGAGGGGGGAGCAAAA  
 NR\_113945 CCAGCCGCCGAGGGGGGCGAGAGGGGGGAGG  
 NR\_118441 CCAGCCGCCGAGGGGGGCGAGAGGGGGGAGCGAACAA  
 NR\_118439 CCAGCCGCCGAGGGGGGCGAGAGGGGGGAGCGAACAA  
 NR\_115334

Figura 6. Alineamiento de la secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DcHe2.

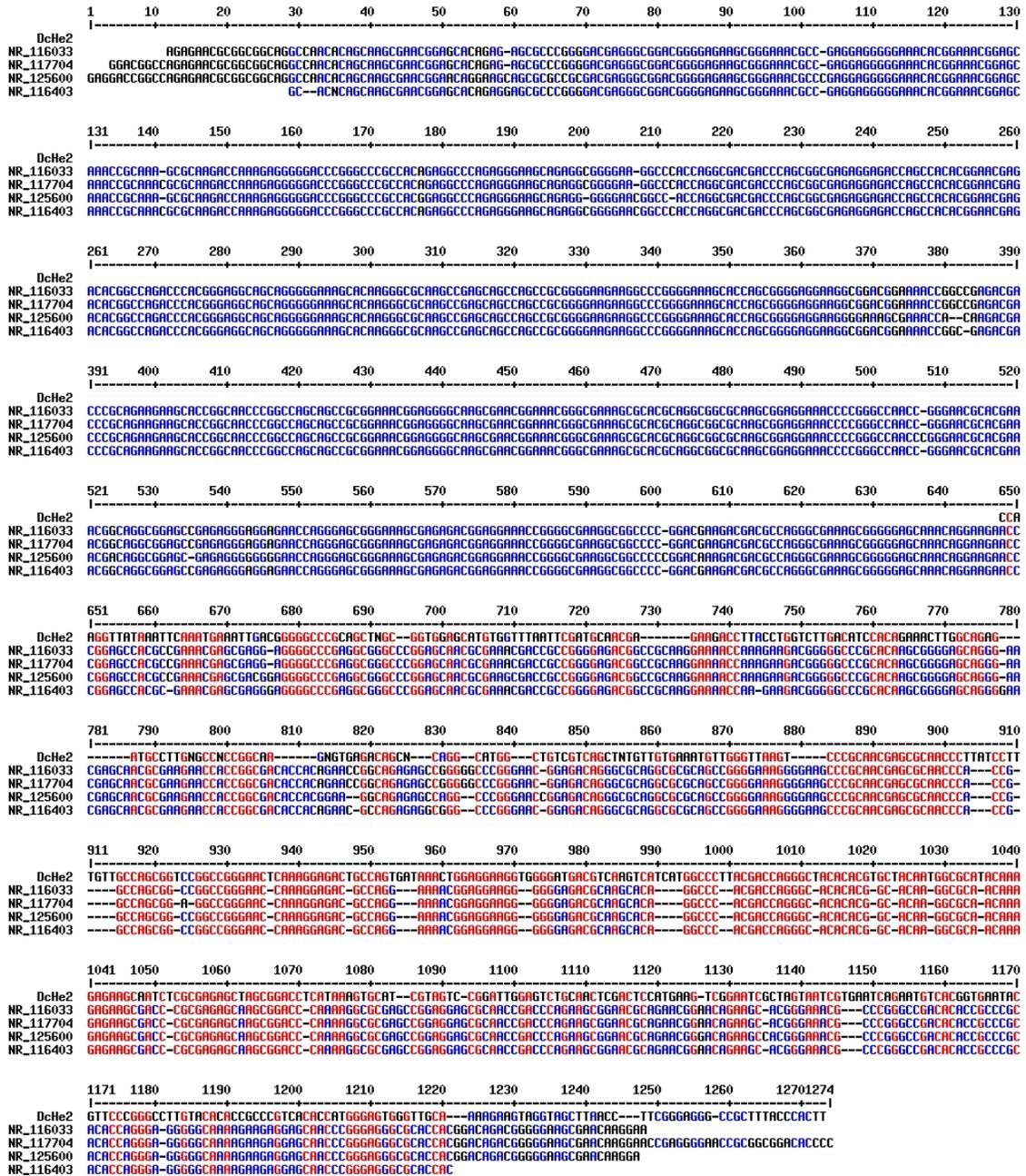
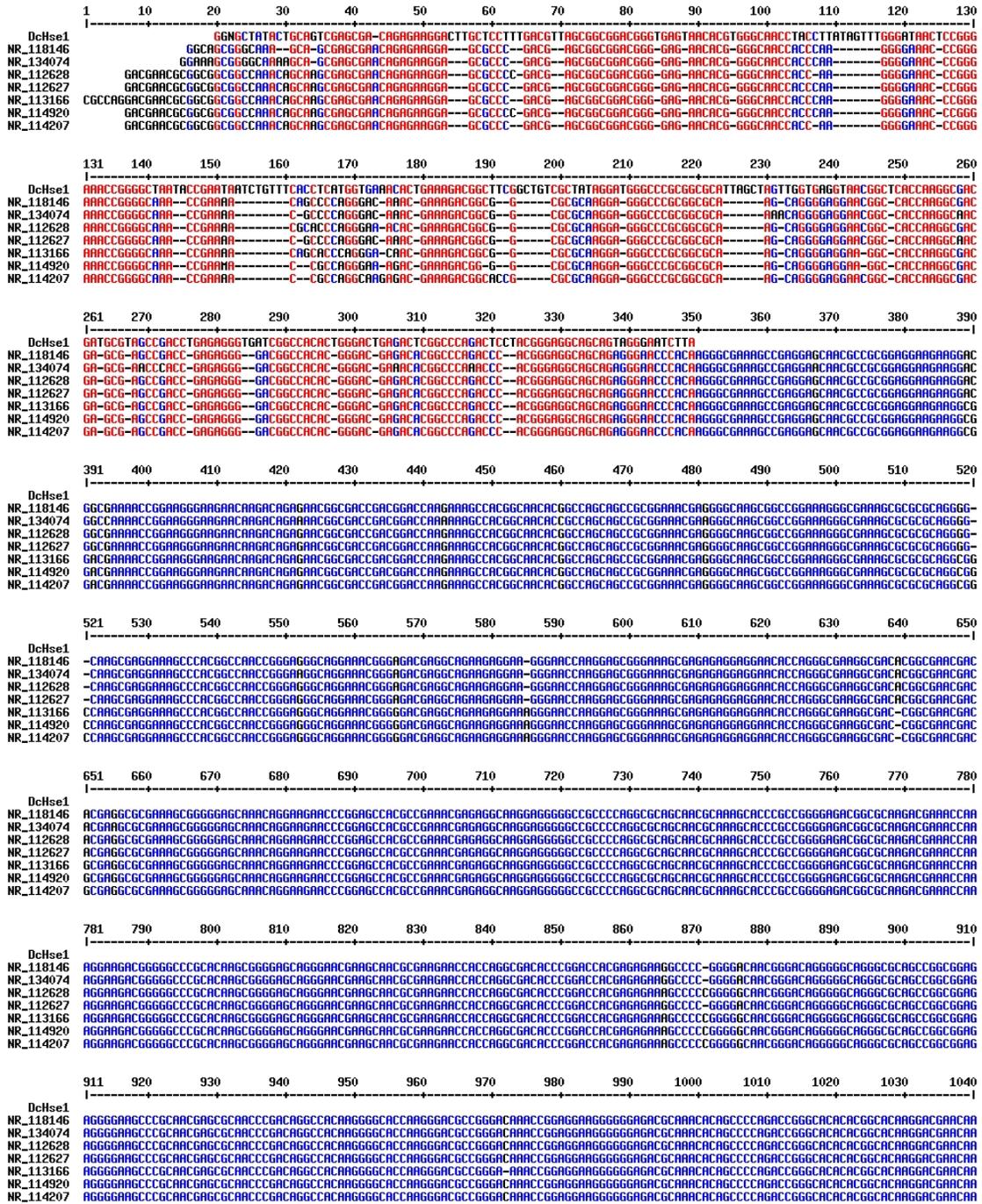


Figura 7. Alineamiento de la secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DcHse1.



```

1041 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170
|-----|
DcHseI
NR_118146 ACGGGCCAACCCGAGGGGAGCAACCGAARAGCGCCAGCGGAGGGCGCAACGCCACAGAGCCGGARCGAGAACGCGGACAGCGCCGGGGAACGCCGGGCCGACACACCGCCCGCACACCAC
NR_134074 ACGGGCCAACCCGAGGGGAGCAACCGAARAGCGCCAGCGGAGGGCGCAACGCCACAGAGCCGGARCGAGAACGCGGACAGCGCCGGGGAACGCCGGGCCGACACACCGCCCGCACACCAC
NR_112628 ACGGGCCAACCCGAGGGGAGCAACCGAARAGCGCCAGCGGAGGGCGCAACGCCACAGAGCCGGARCGAGAACGCGGACAGCGCCGGGGAACGCCGGGCCGACACACCGCCCGCACACCAC
NR_113166 ACGGGCCAACCCGAGGGGAGCAACCGAARAGCGCCAGCGGAGGGCGCAACGCCACAGAGCCGGARCGAGAACGCGGACAGCGCCGGGGAACGCCGGGCCGACACACCGCCCGCACACCAC
NR_114920 ACGGGCCAACCCGAGGGGAGCAACCGAARAGCGCCAGCGGAGGGCGCAACGCCACAGAGCCGGARCGAGAACGCGGACAGCGCCGGGGAACGCCGGGCCGACACACCGCCCGCACACCAC
NR_114207 ACGGGCCAACCCGAGGGGAGCAACCGAARAGCGCCAGCGGAGGGCGCAACGCCACAGAGCCGGARCGAGAACGCGGACAGCGCCGGGGAACGCCGGGCCGACACACCGCCCGCACACCAC

1171 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1255
|-----|
DcHseI
NR_118146 GAGAGGARCACCCGAGCGGGAGGACCGGAGCCAGCCGCCGAGGGGAGGAGG
NR_134074 GAGAGGARCACCCGAGCGGGAGGACCGGAGCCAGCCGCCGAGGGGAGGAGG
NR_112628 GAGAGGARCACCCGAGCGGGAGGACCGGAGCCAGCCGCCGAGGGGAGGAGGAGGAGG
NR_113166 GAGAGGARCACCCGAGCGGGAGGACCGGAGCCAGCCGCCGAGGGGAGGAGGAGGAGG
NR_114920 GAGAGGARCACCCGAGCGGGAGGACCGGAGCCAGCCGCCGAGGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
NR_114207 GAGAGGARCACCCGAGCGGGAGGACCGGAGCCAGCCGCCGAGGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG

```

Figura 8. Alineamiento de la secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DcCse1.

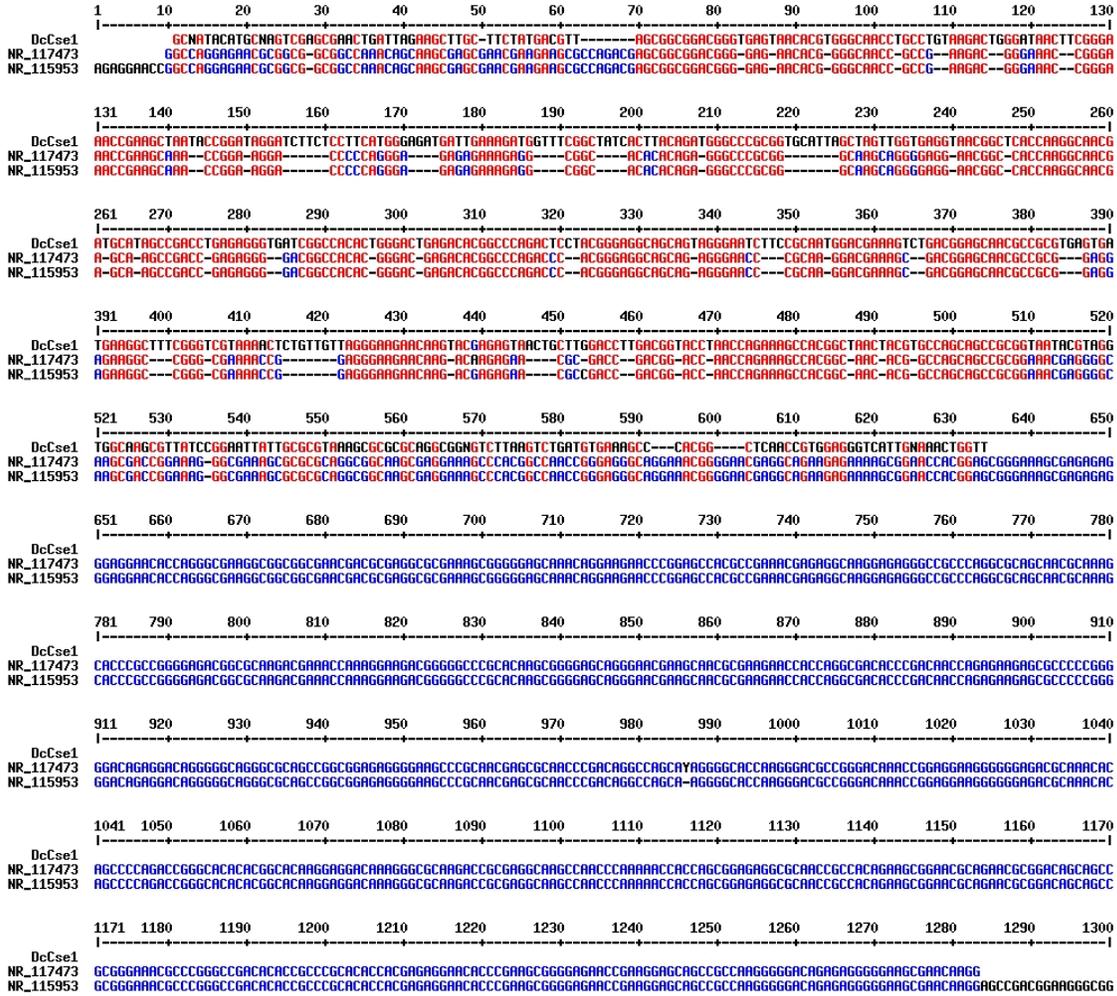
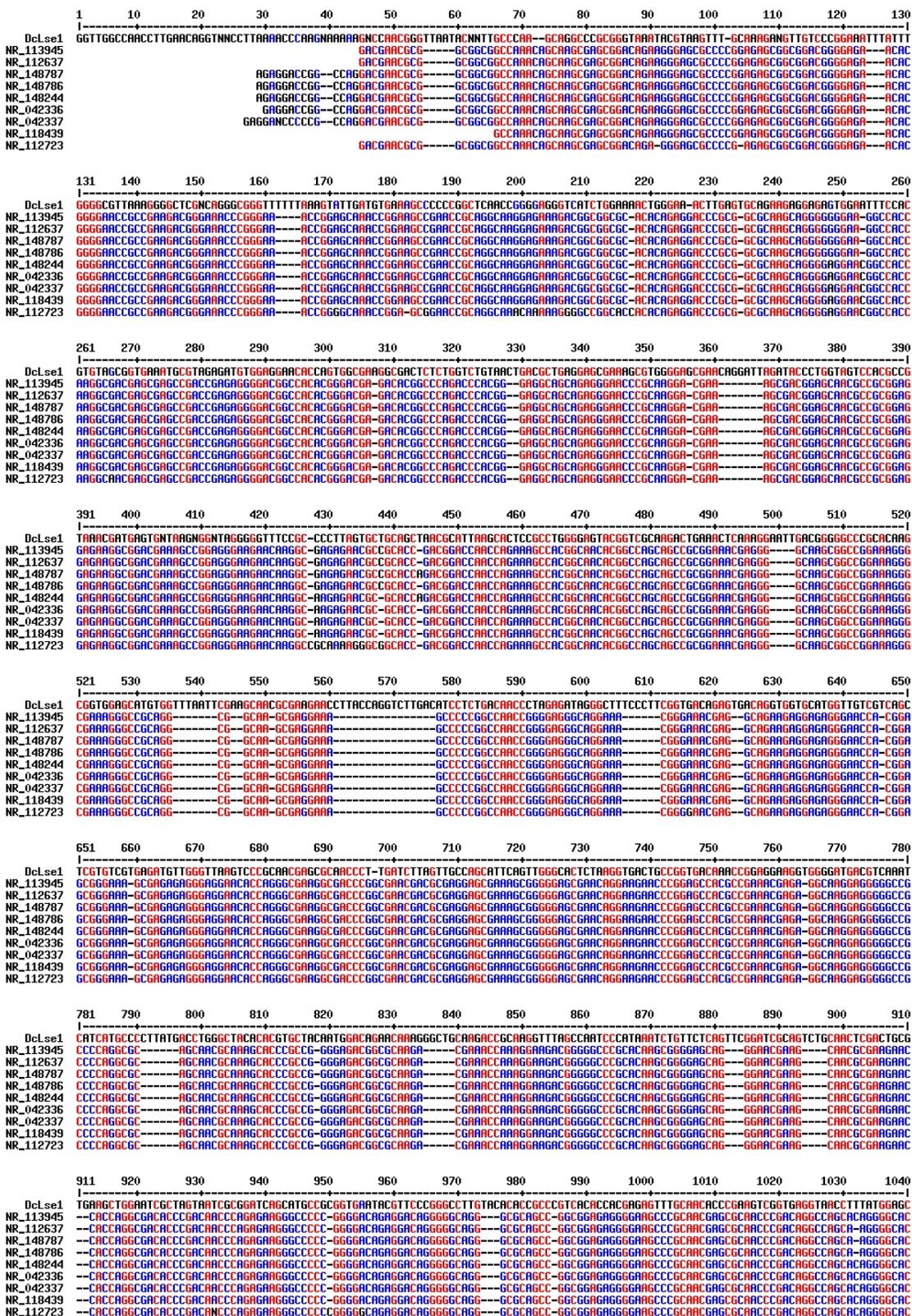


Figura 9. Alineamiento de la secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DcCse2.



Figura 10. Alineamiento de la secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DcLse1.



```

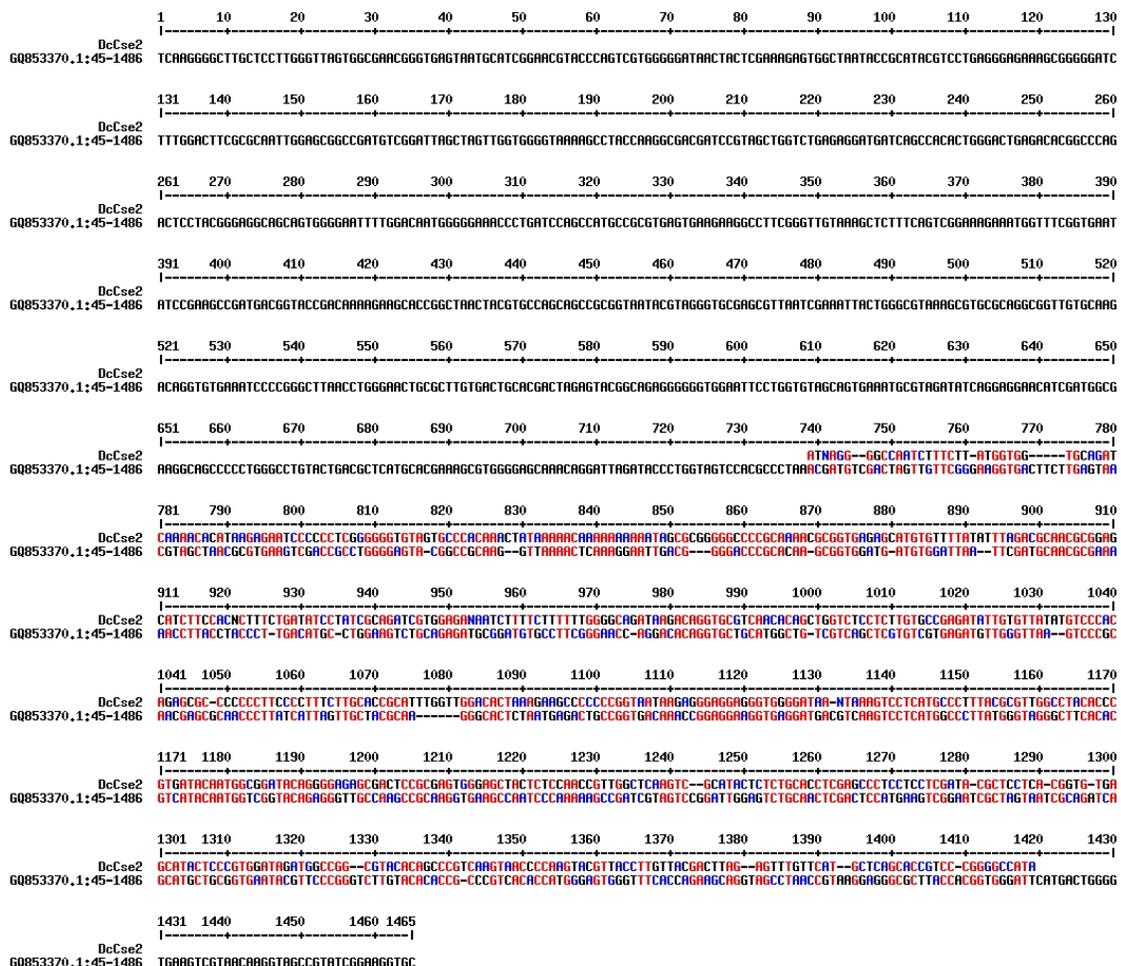
1041 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
DcLse1 CAGCCGCCGAGGNNNNANNGGNGCTATACNTGCACTGAGCGGACGAGAGGGAGCTTGCTCCGGATGTTAGCGGCGGCGGTTAGTARACAGTGGGTARCTGCTGTAGACTGGGATACT
NR_113945 CAGGGACGCCGGGACA--AACCGGAGG--AGGGGGGGAGACG--CAAAACCA----GCCAGACC6GGCAGCAGCGG--ACAGGACGAGACAAA--GGGC--GCAGACCCGAGGGA--G--CCAGCC
NR_112637 CAGGGACGCCGGGACA--AACCGGAGG--AGGGGGGGAGACG--CAAAACCA----GCCAGACC6GGCAGCAGCGG--ACAGGACGAGACAAA--GGGC--GCAGACCCGAGGGA--G--CCAGCC
NR_148787 CAGGGACGCCGGGACA--AACCGGAGG--AGGGGGGGAGACG--CAAAACCA----GCCAGACC6GGCAGCAGCGG--ACAGGACGAGACAAA--GGGC--GCAGACCCGAGGGA--G--CCAGCC
NR_148786 CAGGGACGCCGGGACA--AACCGGAGG--AGGGGGGGAGACG--CAAAACCA----GCCAGACC6GGCAGCAGCGG--ACAGGACGAGACAAA--GGGC--GCAGACCCGAGGGA--G--CCAGCC
NR_148244 CAGGGACGCCGGGACA--AACCGGAGG--AGGGGGGGAGACG--CAAAACCA----GCCAGACC6GGCAGCAGCGG--ACAGGACGAGACAAA--GGGC--GCAGACCCGAGGGA--G--CCAGCC
NR_042336 CAGGGACGCCGGGACA--AACCGGAGG--AGGGGGGGAGACG--CAAAACCA----GCCAGACC6GGCAGCAGCGG--ACAGGACGAGACAAA--GGGC--GCAGACCCGAGGGA--G--CCAGCC
NR_042337 CAGGGACGCCGGGACA--AACCGGAGG--AGGGGGGGAGACG--CAAAACCA----GCCAGACC6GGCAGCAGCGG--ACAGGACGAGACAAA--GGGC--GCAGACCCGAGGGA--G--CCAGCC
NR_118439 CAGGGACGCCGGGACA--AACCGGAGG--AGGGGGGGAGACG--CAAAACCA----GCCAGACC6GGCAGCAGCGG--ACAGGACGAGACAAA--GGGC--GCAGACCCGAGGGA--G--CCAGCC
NR_112723 CAGGGACGCCGGGACA--AACCGGAGG--AGGGGGGGAGACG--CAAAACCA----GCCAGACC6GGCAGCAGCGG--ACAGGACGAGACAAA--GGGCAGCAGACCCGAGGGAAG--CCAGCC

1171 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
DcLse1 CCGGGAAACCGAGCTARTACCGGATAGTTCTTGAACCCGATGTTCAAGGATGAAAGAGGGTTTCGGCTGTACTTACGGATGGACCCGCGGGCGATTAGTATGTTGGTGGGTARTGGCTACCCAGC
NR_113945 CA--AAACGCCAGCGGACGAGCGCAACCGACGCGGAAAGCGGACGAGAACGCGGACAGCG--CCGCGGAAACGCCCGGGCCGACACACCGCCCGACACACAC--GAGAGGCA--CAC--CCGAA
NR_112637 CA--AAACGCCAGCGGACGAGCGCAACCGACGCGGAAAGCGGACGAGAACGCGGACAGCG--CCGCGGAAACGCCCGGGCCGACACACCGCCCGACACACAC--GAGAGGCA--CAC--CCGAA
NR_148787 CA--AAACGCCAGCGGACGAGCGCAACCGACGCGGAAAGCGGACGAGAACGCGGACAGCG--CCGCGGAAACGCCCGGGCCGACACACCGCCCGACACACAC--GAGAGGCA--CAC--CCGAA
NR_148786 CA--AAACGCCAGCGGACGAGCGCAACCGACGCGGAAAGCGGACGAGAACGCGGACAGCG--CCGCGGAAACGCCCGGGCCGACACACCGCCCGACACACAC--GAGAGGCA--CAC--CCGAA
NR_148244 CACAAACGCCAGCGGACGAGCGCAACCGACGCGGAAAGCGGACGAGAACGCGGACAGCG--CCGCGGAAACGCCCGGGCCGACACACCGCCCGACACACAC--GAGAGGCA--CAC--CCGAA
NR_042336 CACAAACGCCAGCGGACGAGCGCAACCGACGCGGAAAGCGGACGAGAACGCGGACAGCG--CCGCGGAAACGCCCGGGCCGACACACCGCCCGACACACAC--GAGAGGCA--CAC--CCGAA
NR_042337 CACAAACGCCAGCGGACGAGCGCAACCGACGCGGAAAGCGGACGAGAACGCGGACAGCG--CCGCGGAAACGCCCGGGCCGACACACCGCCCGACACACAC--GAGAGGCA--CAC--CCGAA
NR_118439 CACAAACGCCAGCGGACGAGCGCAACCGACGCGGAAAGCGGACGAGAACGCGGACAGCG--CCGCGGAAACGCCCGGGCCGACACACCGCCCGACACACAC--GAGAGGCA--CAC--CCGAA
NR_112723 CACAAACGCCAGCGGACGAGCGCAACCGACGCGGAAAGCGGACGAGAACGCGGACAGCG--CCGCGGAAACGCCCGGGCCGACACACCGCCCGACACACAC--GAGAGGCA--CAC--CCGAA

1301 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 13901394
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
DcLse1 GCGGATGCTACCCGACCTGAGAGGGTATGAGGCGACACTGGACTGAAACAGCGCCAGACTCTTACGGGAGG-CAGCAGTAGGGATCTT
NR_113945 GCGGGAG--GACCAAGGAGCCAGCCGCGAA--GGGGG--GCAGAGGGGGGAGCGAACAGGAGCCGA
NR_112637 GCGGGAG--GACCAAGGAGCCAGCCGCGAA--GGGGG--GCAGAGGGGGGAGCGAACAGGAGCCGA
NR_148787 GCGGGAG--GACCAAGGAGCCAGCCGCGAA--GGGGG--GCAGAGGGGGGAGCGAACAGGAGCCGA
NR_148786 GCGGGAG--GACCAAGGAGCCAGCCGCGAA--GGGGG--GCAGAGGGGGGAGCGAACAGGAGCCGA
NR_042336 GCGGGAG--GACCAAGGAGCCAGCCGCGAA--GGGGG--GCAGAGGGGGGAGCGAACAGGAGCCGA
NR_042337 GCGGGAG--GACCAAGGAGCCAGCCGCGAA--GGGGG--GCAGAGGGGGGAGCGAACAGGAGCCGA
NR_118439 GCGGGAG--GACCAAGGAGCCAGCCGCGAA--GGGGG--GCAGAGGGGGGAGCGAACAGGAGCCGA
NR_112723 GCGGGAG--GACCAAGGAGCCAGCCGCGAA--GGGGG--GCAGAGGGGGGAGCGAACAGGAGCCGA

```

Figura 11. Alineamiento entre el amplicón obtenido del gen 16S rRNA del aislado DcCse2.



## 8. Pies de Figura.

### Figura 1. Estructura del ácido carmínico.

### Figura 2. Características macro y microscópicas de los aislados obtenidos a partir de grana cochinilla. Fotografías de las colonias de los aislados y

micrografías de los microorganismos aislados a partir de Grana cochinilla, teñidos mediante la técnica de Gram y observados con un aumento 100x. A) *Dactylopius* sp. sobrenadante estéril 1 (DsSe1), B) *Dactylopius* sp. sobrenadante estéril 2 (DsSe2), C) *Dactylopius coccus* homogenizado estéril 1 (DcHe1), D) *Dactylopius coccus* homogenizado estéril 2 (DcHe2), E) *Dactylopius coccus* homogenizado sin esterilizar 1 (DcHse1), F) *Dactylopius coccus* lavado sin esterilizar 1 (DcLse1), G) *Dactylopius coccus* cera sin esterilizar 1 (DcCse1), H) *Dactylopius coccus* lavado sin esterilizar 2 (DcCse2) e I) *Dactylopius coccus* lavado sin esterilizar 3 (DcCse3).

**Figura 3. Análisis del amplicón 16s rRNA del aislado DsSe1.** La secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DsSe1 se analizó mediante el algoritmo MegaBlast usando el software Geneious y la base de datos del gen 16S rRNA del GenBank en NCBI. En rojo aparecen los nucleótidos con identidad mayor al 90%, en azul los de identidad mayor al 50% y en negro los que no presentaron identidad.

NR\_151897, *Bacillus nakamurai*; NR\_115929, *Bacillus axarquiensis*; NR\_115063, *Bacillus halotolerans*; NR\_112725, *Bacillus mojaviensis*; NR\_112723, *Bacillus atrophaeus*.

**Figura 4. Análisis del amplicón 16s rRNA del aislado DsSe2.** La secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DsSe2 se analizó mediante el algoritmo MegaBlast usando el software Geneious y la base de datos del gen 16S rRNA del GenBank en NCBI. En rojo aparecen los nucleótidos con identidad mayor al 90%, en azul los de identidad mayor al 50% y en negro los que no presentaron identidad.

NR\_036956, *Staphylococcus hominis*; NR\_113345, *Staphylococcus haemolyticus*;  
NR\_116627, *Staphylococcus devriesei*; NR\_118450, *Staphylococcus petrasii*;  
NR\_156818, *Staphylococcus edaphicus*; NR\_115607, *Staphylococcus saprophyticus*;  
NR\_024668, *Staphylococcus lugdunensis*.

**Figura 5. Análisis del amplicón 16s rRNA del aislado DcHe1.** La secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DcHe1 se analizó mediante el algoritmo MegaBlast usando el software Geneious y la base de datos del gen 16S rRNA del GenBank en NCBI. En rojo aparecen los nucleótidos con identidad mayor al 90%, en azul los de identidad mayor al 50% y en negro los que no presentaron identidad.

NR\_148787, *Bacillus australimari*; NR\_148786, *Bacillus zhangzhouensis*;  
NR\_115334, *Bacillus pumilus*; NR\_113845, *Bacillus safensis*; NR\_148244, *Bacillus xiamenensis*;  
NR\_118441, *Bacillus stratosphericus*; NR\_118439, *Bacillus aerius*;  
NR\_042337, *Bacillus altitudinis*.

**Figura 6. Análisis del amplicón 16s rRNA del aislado DcHe2.** La secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DcHe2 se analizó mediante el algoritmo MegaBlast usando el software Geneious y la base de datos del gen 16S rRNA del GenBank en NCBI. En rojo aparecen los nucleótidos con identidad mayor al 90%, en azul los

de identidad mayor al 50% y en negro los que no presentaron identidad.

*Kosakonia oryzae* (NR\_116033), *Kosakonia arachidis* (NR\_116403),

*Enterobacter massiliensis* (NR\_125600) y *Kosakonia radicincitans* (NR\_117704).

**Figura 7. Análisis del amplicón 16s rRNA del aislado DcHse1.** La secuencia

del amplicón 16s rRNA del aislado DcHse1 se analizó mediante el algoritmo

MegaBlast usando el software Geneious y la base de datos del gen 16S rRNA del

GenBank en NCBI. En rojo aparecen los nucleótidos con identidad mayor al 90%,

en azul los de identidad mayor al 50% y en negro los que no presentaron

identidad. *Lysinibacillus mangiferihumi* (NR\_118146), *Lysinibacillus fusiformis*

(NR\_112628), *Lysinibacillus pakistanensis* (NR\_113166), *Lysinibacillus sphaericus*

(NR\_112627), *Lysinibacillus varians* (NR\_134074), *Lysinibacillus macroides*

(NR\_114920) y *Lysinibacillus boronitolerans* (NR\_114207).

**Figura 8. Análisis del amplicón 16s rRNA del aislado DcCse1.** La secuencia

del amplicón 16s rRNA del aislado DcCse1 se analizó mediante el algoritmo

MegaBlast usando el software Geneious y la base de datos del gen 16S rRNA del

GenBank en NCBI. En rojo aparecen los nucleótidos con identidad mayor al 90%,

en azul los de identidad mayor al 50% y en negro los que no presentaron

identidad. *Bacillus megaterium* (NR\_117473) y *Bacillus aryabhatai* (NR\_115953).

**Figura 9. Análisis del amplicón 16s rRNA del aislado DcCse2.** La secuencia

del amplicón 16s rRNA del aislado DcCse2 se analizó mediante el algoritmo

MegaBlast usando el software Geneious y la base de datos del gen 16S rRNA del

GenBank en NCBI. En rojo aparecen los nucleótidos con identidad mayor al 90%, en azul los de identidad mayor al 50% y en negro los que no presentaron identidad. *Sphingobium* sp. (LC133672) y *Sphingomonas* sp. (LC101917).

**Figura 10. Análisis del amplicón 16s rRNA del aislado DcLse1.** La secuencia del amplicón 16s rRNA del aislado DcLse1 se analizó mediante el algoritmo MegaBlast usando el software Geneious y la base de datos del gen 16S rRNA del GenBank en NCBI. En rojo aparecen los nucleótidos con identidad mayor al 90%, en azul los de identidad mayor al 50% y en negro los que no presentaron identidad. *Bacillus safensis* (NR\_113945), *Bacillus australimaris* (NR\_148787), *Bacillus xiamenensis* (NR\_148244), *Bacillus aerius* (NR\_118439), *Bacillus pumilus* (NR\_112637), *Bacillus altitudinis* (NR\_042337), *Bacillus stratosphericus* (NR\_042336), *Bacillus zhangzhouensis* (NR\_148786) y *Bacillus atrophaeus* (NR\_112723).

**Figura 11. Análisis del amplicón 16s rRNA del aislado DcCse2.**

Alineamiento entre el amplicón obtenido del gen 16S rRNA del aislado DcCse2 y el gen 16S rRNA de *Candidatus Dactylopiibacterium carminicum*.