

MARCAJE DE LARVAS DE *Ceraeochrysa valida* (Banks) (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) CON COLORANTES LIPOSOLUBLES INCORPORADOS A LA DIETA

MARKING *Ceraeochrysa valida* (Banks) (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) LARVAE WITH LIPOSOLUBLE COLORS INCORPORATED IN THE DIET

Elba López-Duran¹, Juan A. Villanueva-Jiménez^{1*}, Mónica de la Cruz Vargas-Mendoza¹, Martín Palomares-Pérez²

¹ Campus Veracruz. Colegio de Postgraduados. 91690. Manlio Fabio Altamirano, Veracruz. (lopez.elba@colpos.mx), (javj@colpos.mx), (mvargas@colpos.mx), ²Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, SENASICA-DGSV, km 1.5 Carretera Tecomán-Estación FFCC, Colonia Tepeyac, Colima. 28110. México. (mpalomares@colpos.mx).

RESUMEN

Las técnicas de marcaje de insectos en estudios poblacionales se utilizan para seguir el desarrollo de los organismos. Por ello, los colorantes no deben afectar su biología, comportamiento o camuflaje, tal como los utilizados en coleópteros, lepidópteros, dípteros, isópteros e himenópteros. El objetivo del estudio fue evaluar la efectividad de dos colorantes liposolubles en el marcaje del neuróptero *Ceraeochrysa valida* (Banks) y su efecto en el desarrollo y supervivencia de larvas y pupas; bajo la hipótesis de que al menos uno de los colorantes marcaría bien al insecto sin afectar a los organismos para su evaluación. Los colorantes Sudan Red 7B (rojo) y Sudan Blue 670 (azul) se evaluaron mezclados en la dieta de las larvas, más un testigo sin colorante; se usaron 40 larvas recién eclosionadas por tratamiento. El número de insectos marcados y la duración de los periodos larvario y pupal se evaluaron, y esta información se analizó con la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de suma de intervalos de Wilcoxon. El porcentaje de supervivencia durante los periodos larval, de larva a pupa y de pupa a adulto se analizó con la prueba de Chi-cuadrada. Todas las larvas se marcaron adecuadamente con Sudan Blue 670 y el 98% lo hizo con Sudan Red 7B. La duración de los periodos larvario y pupal presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.0001$). Las larvas mostraron un desarrollo larval más prolongado cuando se alimentaron con el colorante rojo (mediana de 16 d) o azul (15.5 d), respecto al testigo (14 d; $p \leq 0.0004$). Sin embargo, el periodo pupal fue mayor con el colorante rojo (13 d) que con el colorante azul (11 d; $p = 0.0003$) o el testigo (11 d; $p \leq 0.0001$), sin diferencias entre estos dos últimos ($p = 0.42$). Los porcentajes de supervivencia de larvas, larvas a pupa, emergencia de adulto

ABSTRACT

Techniques for marking insects in population studies are used to follow the development of the organisms. For this purpose, dyes must not affect their biology, behavior, or camouflage; such as those utilized in coleopterans, lepidopterans, dipterans, isopterans and hymenopterans. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of two liposoluble dyes in marking the neuropteran *Ceraeochrysa valida* (Banks), and the effect of dyes on the development and survival of larvae and pupae; under the hypothesis that at least one of the two dyes would adequately mark the insects without affecting them for evaluation. The dyes Sudan Red 7B (red) and Sudan Blue 670 (blue) were evaluated mixed in the diet for larvae, plus a not dyed control; 40 recently hatched larvae were used per treatment. The number of marked insects and the duration of the larval and pupal periods were evaluated. This information was analyzed with the Kruskal-Wallis test and the Wilcoxon rank sum test. The percentage of survival as larva, from larva to pupa, and from pupa to adult periods was analyzed with the Chi-square test. All of the larvae were adequately marked with Sudan Blue 670 and 98% with Sudan Red 7B. The duration of the larval and pupal periods presented significant differences ($p \leq 0.0001$). Larvae showed a longer period of larval development when they were fed with the red dye (median of 16 d) or blue dye (15.5 d), compared to the control (14 d; $p \leq 0.0004$). However, the pupal period was longer with the red dye (13 d) than with the blue dye (11 d; $p = 0.0003$) or the control (11 d; $p \leq 0.0001$), with no differences between the latter two ($p = 0.42$). The percentages of survival of larvae, larva to pupa, emergence of adults, or larva to emergence of adult did not show significant differences among treatments ($p > 0.63$). Therefore, Sudan Blue 670 was the dye chosen for the evaluations of *C. valida* in the field; which gave an unequivocal color to the larvae.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: mayo, 2020. Aprobado: septiembre, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 55: 73-80. 2021.

o de larva a emergencia adulto no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.63$). Por tanto, Sudan Blue 670 fue el colorante de elección para las evaluaciones de *C. valida* en campo, además de aportar a la larva un color inconfundible.

Palabras clave: crisopa, *Ceraeochrysa valida*, desarrollo larval, liberación-recaptura, Sudan Blue, Sudan Red.

INTRODUCCIÓN

Dentro del orden Neuroptera, la familia Chrysopidae resalta por la capacidad de depredación de sus larvas sobre insectos de cuerpo blando (Giffoni *et al.*, 2007), los cuales incluyen plagas de importancia económica (Dhandapani *et al.*, 2016; Rodríguez-Palomera *et al.*, 2012). *Ceraeochrysa valida* (Banks) tiene una capacidad alta de depredación en laboratorio sobre *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Pacheco-Rueda *et al.*, 2015; Palomares-Pérez *et al.*, 2016), una de las plagas más dañinas de los cítricos por ser vector del Huanglongbing (HLB), enfermedad con gran potencial destructivo (Mora-Aguilera *et al.*, 2016).

Las larvas de *C. valida* presentan mandíbulas prognatas que sobresalen en la parte anterior del cuerpo, con las que atrapa y succiona el contenido de sus presas (Tauber *et al.*, 2000). Sus cuerpos campodeiformes presentan un exoesqueleto semitransparente que se oscurece sólo en algunas áreas quitinosas, lo cual permite ver el hemocele que presenta áreas blanquecinas formadas por lípidos (Monserrat, 2016). El tubo digestivo de las larvas no está conectado con el ano; por ello, los desechos alimenticios se acumulan en su desarrollo y sólo se excretan durante la metamorfosis (Ribera y Melic, 2015).

Pacheco-Rueda *et al.* (2015) y Jose-Pablo *et al.* (2017) estudiaron el ciclo biológico y la capacidad depredadora de *C. valida* en confinamiento, sin información sobre su movimiento y permanencia en campo tras su liberación (Palomares-Pérez *et al.*, 2016). Las investigaciones de la dinámica de insectos en campo se realizan principalmente con la técnica de marcado-liberación-recaptura, que permite evaluar su dispersión, comportamiento alimenticio y otras interacciones (Badii *et al.*, 2012). Para ello, se requiere un método de marcaje confiable y duradero, que no afecte la biología y comportamiento del insecto, ni cause toxicidad a otros organismos en el ambiente (Arredondo *et al.*, 2017).

Key words: green lacewing, *Ceraeochrysa valida*, larval development, release-recapture, Sudan Blue, Sudan Red.

INTRODUCTION

Within the order Neuroptera, the family Chrysopidae stands out for the predatory capacity of larvae on soft-bodied insects (Giffoni *et al.*, 2007), including economically important pests (Dhandapani *et al.*, 2016; Rodríguez-Palomera *et al.*, 2012). *Ceraeochrysa valida* (Banks) has a high predatory capacity in the laboratory on *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Pacheco-Rueda *et al.*, 2015; Palomares-Pérez *et al.*, 2016), one of the most damaging pests of citrus for being the vector of the Huanglongbing disease (HLB), which has highly destructive potential (Mora-Aguilera *et al.*, 2016).

The larvae of *C. valida* present prognathic jaws that protrude in the anterior portion of the body, with which they trap and suck the content of preys (Tauber *et al.*, 2000). A campodeiform body presents a semitransparent exoskeleton that darkens only in some chitinous areas; this makes it possible to observe the hemocele, which shows whitish areas formed by lipids (Monserrat, 2016). Larval digestive tube is not connected with the anus; therefore, the food waste accumulates along the larval development, and it is only excreted during metamorphosis (Ribera and Melic, 2015).

Pacheco-Rueda *et al.* (2015) and Jose-Pablo *et al.* (2017) studied the biological cycle and predatory capacity of *C. valida* in confinement, without information of movement nor permanence in the field after release (Palomares-Pérez *et al.*, 2016). Field research on insect dynamics is made principally with the marking-release-recapture technique, making it possible to evaluate their dispersion, feeding behavior, and other interactions (Badii *et al.*, 2012). For this purpose, a reliable and lasting marking method is required, which does not affect insect biology or behavior, nor cause toxicity to other organisms in the environment (Arredondo *et al.*, 2017).

The liposoluble dyes can be stored in the hemocele or insect adipose tissues after ingestion (Lindig *et al.*, 1980). Although there are molecular techniques for marking insects (Leung *et al.*, 2020), the addition of colorants in the diet is an inexpensive technique, which does not require much manipulation. Furthermore,

Los colorantes liposolubles se pueden almacenar en el hemocele o en los tejidos adiposos de los insectos después de ingerirlos (Lindig *et al.*, 1980). Aunque existen técnicas moleculares de marcaje de insectos (Leung *et al.*, 2020), la administración de colorantes en la dieta es una técnica de costo bajo, sin requerir gran manipulación del insecto. Además, los colores se identifican con facilidad y pueden permanecer durante varias etapas de su desarrollo (Arredondo *et al.*, 2017). Qureshi *et al.* (2005) informaron marcajes exitosos con tintes liposolubles en pruebas de marcaje-liberación con coleópteros, lepidópteros, dípteros, isópteros e himenópteros. Sin embargo, no se encontraron reportes sobre el uso de estos colorantes en neurópteros, ya que las investigaciones sobre comportamiento y depredación se realizan principalmente en laboratorio e invernadero.

Dentro del desarrollo de nuevas herramientas y estrategias de manejo integrado de plagas, el marcaje adecuado de *C. valida* es un instrumento que contribuirá al estudio de la ecología y el comportamiento depredador tras su liberación en campo. Por ello, es necesario conocer cuál colorante marca de manera adecuada a las larvas de *C. valida*, sin afectar la emergencia de adultos. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad de dos colorantes liposolubles en el marcaje de *C. valida* y su efecto en el desarrollo y supervivencia de larvas y pupas, hasta la emergencia de adultos; bajo la hipótesis de que al menos uno de los dos colorantes marcaría bien al insecto sin afectar a los organismos para su evaluación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, México. Larvas recién emergidas de primer estadio se tomaron de una cría de *C. valida* establecida en el laboratorio, y recolectada en un huerto cítrico local. Los colorantes liposolubles evaluados fueron Sudan Red 7B (CAS No. 6368-72-5) y Sudan Blue 670 (CAS No. 17354-14-2, Sigma-Aldrich® México), incorporados en la dieta de las larvas. La dieta se elaboró al mezclar 50 g de huevos de *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lepidoptera: Gelechiidae) mantenidos en congelación, con 1 g de colorante (Ostlie *et al.*, 1984) y 14 g de miel de abeja (Mudassar *et al.*, 2013). Para cada tratamiento se utilizaron 40 larvas. Cada larva se mantuvo en una caja de Petri de plástico (60 x 15 mm), con aproximadamente 5 g de alimento, dentro de un cuarto de cría mantenido a 25 ± 2 °C, 60 a 70% de humedad relativa y un fotoperiodo de 12 h luz. El alimento se sustituyó cada 4 d.

colors are easily identified and can remain during various stages of insect development (Arredondo *et al.*, 2017). Qureshi *et al.* (2005) reported successful markings with liposoluble dyes in marking-release trials with coleopterans, lepidopterans, dipterans, isopterans and hymenopterans. However, reports on the use of these dyes in neuropterans were not found, since research on behavior and predation are mainly carried out in laboratory and greenhouse.

On developing new integrated pest management tools and strategies, the adequate marking of *C. valida* is an instrument that will contribute to the study of their ecology and predatory behavior after releasing in the field. Therefore, it is necessary to know which dye adequately marks the larvae of *C. valida* without affecting the emergence of adults. Thus, the objective of this study was to evaluate the effectiveness of two liposoluble dyes in the marking of *C. valida* and their effect on the development and survival of larvae and pupae until they emerged as adults; under the hypothesis that at least one of the two dyes adequately would mark insects without affecting individuals for their evaluation.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted in the Laboratorio de Sanidad Vegetal of the Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, Mexico. Recently emerged larvae from the first instar were taken from a brood of *C. valida* established in the laboratory, after collected parental individuals in a local citrus orchard. The liposoluble dyes evaluated were Sudan Red 7B (CAS No. 6368-72-5) and Sudan Blue 670 (CAS No. 17354-14-2, Sigma-Aldrich® Mexico), incorporated in the diet of the larvae. The diet was elaborated by mixing 50 g of frozen-stored eggs of *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lepidoptera: Gelechiidae) with 1 g of dye (Ostlie *et al.*, 1984) and 14 g of honey (Mudassar *et al.*, 2013). Forty larvae were used in each treatment. Each larva was maintained in a plastic Petri dish (60 x 15 mm), with approximately 5 g of food, within a breeding room maintained at 25 ± 2 °C, 60 to 70% relative humidity, and a photoperiod of 12 h light. Food was replaced every 4 d.

Recently emerged adults were placed in transparent plastic rectangular boxes (2 L); water was supplied using a sponge submerged in a container of 15 mL, attached with Parafilm® paper. The rectangular boxes were covered with cheese-cloth. Adults food was a diet based on brewer's yeast (30 g), condensed milk (15 mL), sugar (20 g), egg (1 yolk + 2 whites), wheat germ (50 g), honey (30 g), and distilled water (45 mL) (Cañedo and Lizárraga, 1989).

Los adultos recién emergidos se colocaron en cajas rectangulares de plástico transparente (2 L); se les suministró agua por medio de una esponja sumergida en un recipiente de 15 mL, sostenida con papel Parafilm[®]. Las cajas rectangulares se cubrieron con gasa para pañal (cheese cloth). El alimento de los adultos fue una dieta base de levadura de cerveza (30 g), leche condensada (15 mL), azúcar (20 g), huevo (1 yema + 2 claras), germen de trigo (50 g), miel (30 g) y agua destilada (45 mL) (Cañedo y Lizárraga, 1989).

El número de larvas se contabilizó en las cuales se podía apreciar el marcaje abdominal a simple vista y se registró la duración en días de los estadios de larva y pupa. Dado que no se cumplieron los supuestos de normalidad de los datos, verificados por medio de la prueba de Shapiro-Wilk ($p \leq 0.05$), se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de suma de intervalos de Wilcoxon. Además, se realizaron observaciones para detectar cambios de apariencia o malformaciones. La supervivencia de las larvas se registró cada día. El porcentaje de supervivencia de las pupas se calculó a partir del número de adultos emergidos. La prueba de Chi-cuadrada se usó para comparar el porcentaje de supervivencia de larvas, de larvas a pupa, de pupa a la emergencia de adultos, y del número inicial de larvas a la emergencia de adultos. Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico R (STHDA, 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los dos colorantes permitieron el marcaje de las larvas a las 24 h de proporcionar la dieta. A simple vista se observó el color azul en el abdomen de todas las larvas alimentadas con la dieta adicionada con Sudan Blue 670. La dieta con Sudan Red 7B marcó de rojo el abdomen del 98% de las larvas que la recibieron (Figura 1).

The number of larvae was counted, wherein the abdominal marking was clearly visible; and the duration in days of the instars of larvae and pupae were registered. Since normality assumptions for data were not met, this was verified using the Shapiro-Wilk test ($p \leq 0.05$), then, the Kruskal-Wallis non-parametric test was used, followed by the Wilcoxon rank sum test. In addition, observations were made to detect changes in appearance or malformations. Larval survival was registered each day. Pupal survival percentage was calculated from the number of emerged adults. The Chi-square test was used to compare the survival percentage of larvae, from larva to pupa, from pupa to adult emergence, and of the initial number of larvae to adult emergence. The analysis of data was performed with the statistical software R (STHDA, 2020).

RESULTS AND DISCUSSION

Both dyes allowed the marking of the larvae 24 h after providing the diet. Blue color was visible with the naked eye in the abdomen of all of the larvae fed with the diet added with Sudan Blue 670. The diet with Sudan Red 7B marked in red the abdomen of 98% of the larvae that received it (Figure 1).

The marked larvae showed no evident alterations of appearance or malformations. With Sudan Red, 39 larvae obtained the expected coloring, although it was almost indistinguishable later in the adults. Furthermore, the red coloring of the marked larvae could be sometimes confused with the natural coloring of some larvae of *C. valida*. In contrast, Sudan Blue provided a blue coloring in the 40 larvae and was also observable until the adult stage. The blue color is clearly distinguishable, with no similarity to the natural coloring of the insect.

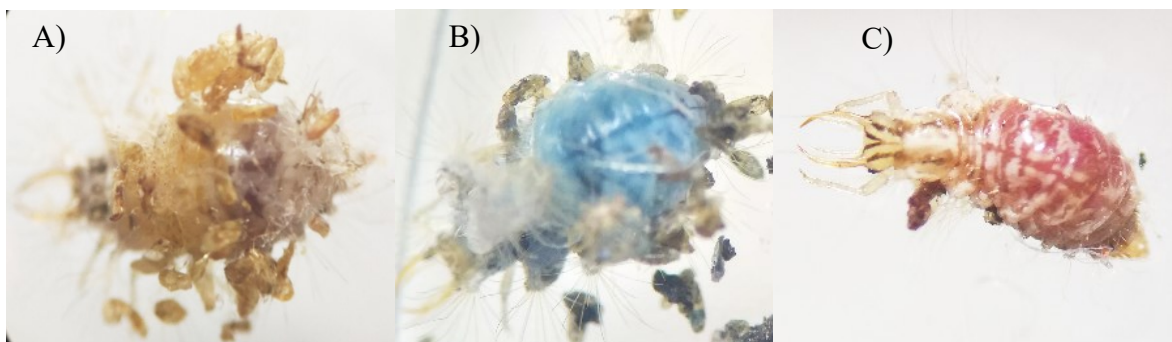


Figura 1. Larvas de *Ceraeobrysa valida* alimentadas con dieta mezclada con los tratamientos muestran la coloración del abdomen: A) testigo sin colorante, B) Sudan Blue 670, C) Sudan Red 7B.

Figure 1. Larvae of *Ceraeobrysa valida* fed with diet mixed with the treatments showing their abdomen coloration: A) control with no dye, B) Sudan Blue 670, C) Sudan Red 7B.

Las larvas marcadas carecieron de alteraciones evidentes de apariencia y no presentaron malformaciones. Con Sudan Red, las 39 larvas obtuvieron la coloración esperada, aunque después fue casi indistinguible en los adultos. Incluso, el color rojizo de las larvas marcadas puede confundirse en ocasiones con la coloración natural de algunas larvas de *C. valida*. En cambio, Sudan Blue proporcionó una coloración azul en las 40 larvas y se pudo observar también hasta la edad adulta. El color azul se distingue con claridad, sin semejanza con los matices del color natural del insecto.

El periodo larvario tuvo una duración de 14 a 16 d y presentó diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.001$). En el testigo, el desarrollo larval fue el más corto [mediana 14 d; $p \leq 0.0004$; media 14.00 ± 0.83 (D.E.) d], mientras que en los tratamientos con Sudan Red [16 d; media 16.09 ± 1.75 (D.E.) d] y Sudan Blue [15.5 d; media 15.47 ± 1.66 (D.E.) d] fue más prolongado (Figura 2). Sin embargo, los valores del desarrollo larval con las dietas con colorante, en ambos casos son menores a los 18.5 d registrados por Jose-Pablo *et al.* (2017), bajo condiciones similares de laboratorio y dieta, pero sin la adición de colorantes.

En la duración del periodo pupal hubo diferencias significativas ($p \leq 0.0001$). Las larvas alimentadas con la dieta roja presentaron un periodo pupal más prolongado [mediana 13 d; $p \leq 0.0004$; media 12.8 ± 0.80 (D.E.) d] (Figura 2), cercano al valor registrado por Barbosa *et al.* (2002) para *Ceraeochrysa everes* (Banks). Sin embargo, se observó un periodo pupal similar cuando se utilizó la dieta azul o la del testigo [mediana azul 11 d, $p = 0.42$, media 11.6 ± 1.42 (D.E.) d; mediana roja 11 d, media 11.3 ± 1.18 (D.E.) d]. Estos valores son menores que lo indicado por Jose-Pablo *et al.* (2017) para *C. valida*, e incluso para otras especies de *Ceraeochrysa* [*C. caligata* (Banks) (Castro *et al.*, 2009), y *C. paraguayaria* (Navás) (De Bortoll y Murata, 2007)].

En promedio, en este estudio sobrevivieron el 81.7% de las larvas de *C. valida*, de las cuales 88.8% se desarrolló a pupa, y 93.1% de las pupas se desarrolló al estado adulto, sin diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($p > 0.85$) (Cuadro 1). Los porcentajes de supervivencia de los estadios larvales, de larvas a pupa y de pupa a adulto no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.85$). La supervivencia del 86.6% de las larvas

The larval period had a duration of 14 to 16 d and showed significant differences among treatments ($p \leq 0.001$). In the control, larval development was the shortest [median 14 d; $p \leq 0.0004$; mean 14.00 ± 0.83 (SD) d], while in the treatments with Sudan Red [16 d; mean 16.09 ± 1.75 (SD) d] and Sudan Blue [15.5 d; mean 15.47 ± 1.66 (SD) d] it was longer (Figure 2). However, larval development values with the diets with dye, in both cases, were lower than the 18.5 d reported by Jose-Pablo *et al.* (2017), under similar conditions of laboratory and diet, but without the addition of dyes.

In the duration of the pupal period, there were significant differences ($p \leq 0.0001$). The larvae fed with the red diet showed a longer pupal period [median 13 d; $p \leq 0.0004$; mean 12.8 ± 0.80 (SD) d] (Figure 2), close to the value recorded by Barbosa *et al.* (2002) for *Ceraeochrysa everes* (Banks). However, a similar pupal period was observed when the blue diet was used or that of the control [median blue 11 d, $p = 0.42$, mean 11.6 ± 1.42 (SD) d; median red 11 d, mean 11.3 ± 1.18 (SD) d]. These values are lower than those indicated by Jose-Pablo *et al.* (2017) for *C. valida* and even for other species of *Ceraeochrysa* [*C. caligata* (Banks) (Castro *et al.*, 2009), and *C. paraguayaria* (Navás) (De Bortoll and Murata, 2007)].

On average, in this study, 81.7% of *C. valida* larvae survived, of which 88.8% developed to pupae, and 93.1% of the pupae developed to the adult stage, with no significant difference among treatments ($p > 0.85$) (Table 1). The percentages of survival as larva, from larva to pupa, and from pupa to adult stage did not show significant difference among treatments ($p > 0.85$). The 86.6% survival of the larvae that developed to pupa in the control of our study was similar to the value (81%) obtained by Jose-Pablo *et al.* (2017) for this species under similar laboratory conditions.

Also, it coincides with what was found by Walton and Colong (2008), who obtained 89% survival in larvae of *Eldana saccharina* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) marked with Sudan Red 7B. Furthermore, Qureshi *et al.* (2005) observed 90% survival in larvae of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) when using the dye Sudan Red 7B, although only 73% survived with Sudan Blue 670. Survival of adults fed with a diet containing red dye was 89.7%, similar to that obtained using the blue dye (94.1%). Although the survival of the initial number

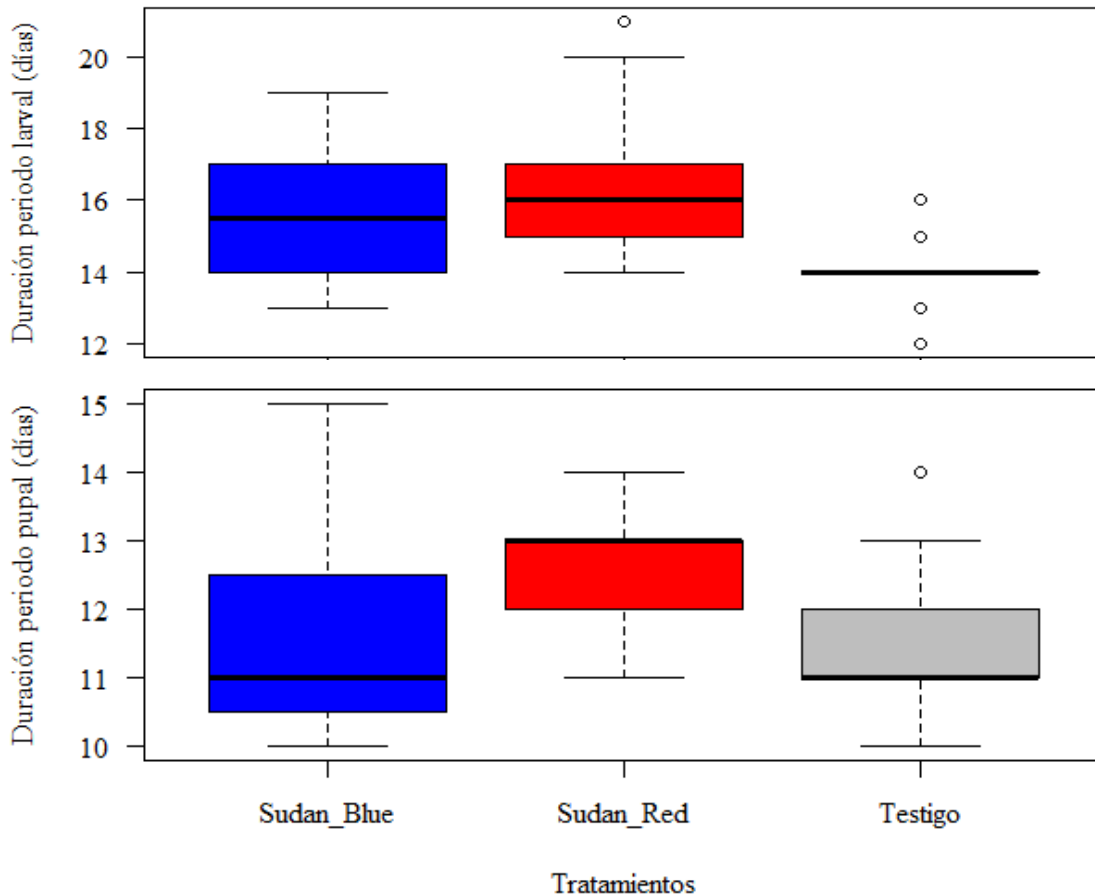


Figura 2. Comparación de la duración del periodo larval y pupal de *Ceraeochrysa valida* (Banks), alimentada con dos colorantes liposolubles incorporados en la dieta y un testigo. Línea oscura = mediana; bordes de las cajas = 25 y 75% de la muestra. Líneas extendidas desde la caja = valores mínimo y máximo. Puntos = valores atípicos.

Figure 2. Comparison of the duration of the larval and pupal periods of *Ceraeochrysa valida* (Banks), fed with two liposoluble dyes incorporated in the diet and a control. Dark line = median; edges of the boxes = 25 and 75% of the sample. Lines extended from the box = minimum and maximum values. Points = atypical values.

que pasaron a pupa en el testigo del presente estudio fue similar a la obtenida (81%) por Jose-Pablo *et al.* (2017) para esta especie en condiciones semejantes en laboratorio.

Además coincide con lo encontrado por Walton y Colong (2008) quienes obtuvieron 89% de supervivencia en larvas de *Eldana saccharina* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) marcadas con Sudan Red 7B. También, Qureshi *et al.* (2005) observaron 90% de supervivencia en larvas de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) al usar el colorante Sudan Red 7B, aunque sólo sobrevivió 73% con el Sudan Blue 670. La supervivencia de adultos alimentados con dieta con colorante rojo fue 89.7%, similar a lo obtenido con el uso del colorante azul (94.1%). A pesar de que la supervivencia del número inicial

de larvas until the emergence of adults was 80.0% for Sudan Blue, there was no significant difference ($p = 0.63$) respect to survival obtained with Sudan Red (65%) or the control (57.5%).

Both colorants were associated with the increase in the duration of the larval period (15.5 to 16 d) respect to the control (14 d). Values are close to those reported for this species under similar conditions. Some effects associated with this difference could influence the objectives of later use; however, the attainment of survival levels similar to the control implies a reduced effect of the colorants on insect physiology, which even permits development until reaching the adult stage.

According to Jose-Pablo *et al.* (2017), the larvae of *C. valida* are voracious predators that can consume

Cuadro 1. Supervivencia de larvas, larvas que pasaron a pupa y emergencia de adultos (%) de *Ceraeochrysa valida* alimentados con colorantes liposolubles incorporados en la dieta. Condiciones de cría: 25 ± 2 °C, 60-70 % H.R., fotoperiodo de 12:12 h L:O.

Table 1. Survival of larvae, larvae that pupated, and adult emergence (%) of *Ceraeochrysa valida* fed with liposoluble dyes incorporated in the diet. Breeding conditions: 25 ± 2 °C, 60-70 % H.R., photoperiod of 12:12 h L:D.

Tratamiento	Supervivencia de larvas (%)	Larvas que pasaron a pupa (%)	Emergencia de adultos (%)	Supervivencia de larva a emergencia de adulto (%)
[n ₀ = 40] [†]	[n ₁] [‡]	[n ₂] [§]	[n ₃] [¶]	[n ₀ a n ₃] [‡]
Sudan Red 7B	80.0 a ^{††} [32]	90.6 a [29]	89.7 a [26]	65.0 a
Sudan Blue 670	90.0 a [36]	94.4 a [34]	94.1 a [32]	80.0 a
Testigo	75.0 a [30]	86.6 a [26]	88.5 a [23]	57.5 a
	n.s. (p = 0.85)	n.s. (p = 0.97)	n.s. (p = 0.98)	n.s. (p = 0.63)
Promedio	81.7 (32.7)	88.8 (29.7)	93.1 (27.0)	67.5 %

[†]Número inicial de larvas [n₀] por tratamiento. [‡]Supervivencia de larvas [n₁] al último estadio larval, respecto a n₀. [§]Pupas formadas [n₂], respecto a n₁. [¶]Emergencia de adultos [n₃], respecto a pupas formadas [n₂]. [‡]Supervivencia de larva a emergencia de adulto [n₀ a n₃]. ^{††}Porcentajes con la misma letra en la misma columna no muestran diferencia significativa (Chi-cuadrada). ♦ [†]Initial number of larvae [n₀] per treatment. [‡]Survival of larvae [n₁] at the final larval instar, respect to n₀. [§] Formed pupae [n₂] respect to n₁. [¶]Emergence of adults [n₃] respect to formed pupae [n₂]. [‡]Survival of larvae to the emergence of adult [n₀ to n₃]. ^{††}Percentages with the same letter per column indicate no significant difference (Chi-square).

de larvas hasta la emergencia de adultos fue 80.0% para Sudan Blue, no hubo diferencias significativas (p=0.63) respecto a la supervivencia obtenida con Sudan Red (65%) o el testigo (57.5%).

Ambos colorantes se asociaron con el aumento en la duración del periodo larvario (15.5 a 16 d) respecto al testigo (14 d), los valores son cercanos a los documentados para esta especie en condiciones similares. Algunos efectos asociados con esta diferencia podrían influir en los objetivos de su uso posterior; sin embargo, el obtener niveles de supervivencia similares al testigo implica un efecto reducido de los colorantes en la fisiología del insecto, que incluso permite su desarrollo hasta alcanzar el estado adulto. De acuerdo con Jose-Pablo *et al.* (2017), las larvas de *C. valida* son depredadoras voraces que pueden llegar a consumir 153 ninfas-1 de *D. citri* en las primeras 6 h de exposición. En este contexto, un periodo larvario prolongado permitiría al depredador consumir un mayor número de presas y no representaría un inconveniente grave para el insecto. El fin es marcar a las larvas para después liberarlas y observar su comportamiento depredador en campo para su recaptura. Bajo esta premisa, el colorante Sudan Blue 670 mostró buen desarrollo larvario y pupal, con una supervivencia adecuada y una marca fácil de visualizar e inconfundible en condiciones de campo. Por lo tanto es factible que su uso facilite el marcaje

153 nymphs-1 of *D. citri* in 6 h of exposure. In context, a longer larval period would permit predators to consume larger numbers of prey, and it would not represent a problem for the insect. The goal is to mark the larvae to release them later and to observe their predatory behavior in the field before their recapture. Under this premise, the dye Sudan Blue 670 showed good larval and pupal development, with good survival and a mark that is easily visual and unequivocal under field conditions. Therefore, it is plausible that using dye facilitates the marking of *C. valida* larvae in marking-release-recapture studies.

CONCLUSIONS

The marking method was efficient; the coloring provided was persistent and easy to detect, especially the blue. Larvae showed a longer larval development when fed with the red (Sudan Red 7B) or the blue (Sudan Blue 670) dye, compared to the control.

Green lacewing pupal period was longer with the red dye than with the blue one or the control, with no significant differences between the latter two. Sudan Blue 670 was the colorant of choice for field evaluations of *Ceraeochrysa valida*.

—End of the English version—



de larvas de *C. valida* en estudios de marcado-liberación-recaptura.

CONCLUSIONES

El método de marcaje resultó eficiente, la coloración proporcionada fue persistente y fácil de detectar, en especial, el color azul. Las larvas mostraron un desarrollo larval más largo cuando se alimentaron con el colorante rojo (Sudan Red 7B) o el azul (Sudan Blue 670), respecto al testigo.

El periodo pupal de la crisopa fue mayor con el colorante rojo que con el colorante azul o el testigo, sin diferencias entre estos últimos. Sudan Blue 670 fue el colorante de elección para las evaluaciones de *Ceraeochrysa valida* en campo.

LITERATURA CITADA

- Arredondo, J., L. Ruiz, G. López, and F. Díaz-Fleischer. 2017. Visibility and persistence of marker dyes and effect on the quality and mating competitiveness of mass-reared flies (Diptera: Tephritidae): *Anastrepha obliqua* and bisexual and genetic sexing (Tapachula-7) strains of *A. ludens*. J. Econ. Entomol. 110: 1653-1657. <https://doi.org/10.1093/jee/tox154>
- Barbosa, R. L., S. de Freitas, and A. Machado. 2002. Biological aspects of the immature stages of *Ceraeochrysa everes* (Banks) (Neuroptera: Chrysopidae). Scient. Agric. 59: 581-583.
- Badii, M. H., A. Guillen, J. Landeros, E. Cerna, Y. Ochoa, y J. Valenzuela. 2012. Muestreo por métodos de captura-recaptura. Int. J. Good Sci. 7: 97-131.
- Cañedo, T., y T. Lizárraga. 1989. Dietas artificiales para crianza en laboratorio de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera, Chrysopidae). Rev. Peru. Ent. 31: 83-85.
- Castro, A. L., G. I. Cruz, I. F. Silva, C. S. Paula, M. L. Leão, T. E. Ferreira, e A. P. Menezes. 2009. Biología de *Ceraeochrysa caligata* (Banks, 1945) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada com *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphidae). Rev. Bras. Agroecol. 4: 2537-2540.
- De Bortoll, S. A., e A. T. Murata. 2007. Aspectos biológicos de *Ceraeochrysa paraguayana* (Navás, 1920) (Neuroptera: Chrysopidae) em condições de laboratorio. Bol. San. Veg. Plagas. 33: 35-42.
- Dhandapani, N., P. Sarkar, and G. Mishra. 2016. Chrysopids. In: Omkar (ed). Ecofriendly Pest Management for Food Security. ELSEVIER. pp: 311-327.
- Giffoni, J., N. Valera, F. Díaz, y C. Vázquez. 2007. Ciclo biológico de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada con diferentes presas. Bioagro. 19: 109-113.
- Jose-Pablo, R., J. A. Villanueva-Jiménez, M. C. Vargas-Mendoza, and A. Huerta-de-la-Peña. 2017. Life cycle and larval predation by *Ceraeochrysa valida* (Banks) on nymphs of *Diaphorina citri* Kuwayama. Southwest. Entomol. 42: 61-72.
- Leung, K., E. Ras, K. B. Ferguson, S. Ariëns, D. Babendreier, P. Bijma, K. Bourtzis, J. Brodeur, M. A. Bruins, A. Centurión, S. R. Chattington, M. Chinchilla-Ramírez, M. Dicke, N. E. Fatouros, J. González-Cabrera, T. V. M. Groot, T. Haye, M. Knapp, P. Koskinioti, S. Le Hesran, M. Lyrakis, A. Paspati, M. Pérez-Hedo, W. N. Plouvier, C. Schlötterer, J. M. Stahl, A. Thiel, A. Urbaneja, L. van de Zande, E. C. Verhulst, L. E. M. Vet, S. Visser, J. H. Werren, S. Xia, B. J. Zwaan, S. Magalhães, L. W. Beukeboom, and B. A. Pannebakker. 2020. Next-generation biological control: the need for integrating genetics and genomics. Biol. Rev. doi: 10.1111/brv.12641.
- Lindig, O. H., G. Wiygul, J. E. Wright, J. R. Dawson, and J. Roberson. 1980. Rapid method for mass-marking boll weevils. J. Econ. Entomol. 73: 385-386.
- Montserrat, V. J. 2016. Los Coniopterígidos de la Península Ibérica e Islas Baleares (Insecta: Neuropterida, Neuroptera: Coniopterygidae). Rev. Graell. 72: 1-114.
- Mora-Aguilera, G., P. Robles-García, J. I. López-Arroyo, J. Flores-Sánchez, G. Acevedo-Sánchez, S. Domínguez-Monge, A. Gutiérrez-Espinosa, y E. Loeza-Kuk. 2016. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. Rev. Mex. Fitopatol. 32: 108-119.
- Mudassar, M. T., Ehsan-ul-Haq, M. Naemullah, M. Shakeel, M. Ashfaq, A. U. Nisa, and J. Khan. 2013. Economic rearing of *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) in insectary. Pakistan J. Agric. Res. 26: 309-315.
- Ostlie, K. R., L. G. Higley, L. V. Kaster, and W. B. Showers. 1984. European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) development, larval survival and adult vigor on meridic diets containing marker dyes. J. Econ. Entomol. 77: 118-120.
- Pacheco-Rueda, I., J. Lomelí-Flores, J. I. López-Arroyo, H. González-Hernández, J. Romero-Nápoles, M. T. Santillán-Galicia, y J. Suarez-Espinoza. 2015. Preferencia de tamaño de presa en seis especies de Chrysopidae (Neuroptera) sobre *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). Rev. Colomb. Entomol. 41: 187-193.
- Palomares-Pérez, M., M. A. Ayala-Zermeño, B. Rodríguez-Vélez, J. J. de la Cruz-Llanas, J. A. Sánchez-González, H. C. Arredondo-Bernal, y E. G. Cordoba-Urtiz. 2016. Abundancia y depredación de *Ceraeochrysa valida* (Neuroptera: Chrysopidae) sobre *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en Colima, México. Chil. J. Agric. Anim. Sci. 32: 234-243.
- Qureshi, J. A., L. L. Buschman, J. E. Throne, and S. B. Ramaswamy. 2005. Adult dispersal of *Ostrinia nubilalis* Hubner (Lepidoptera: Crambidae) and its implications for resistance management in Bt-maize. J. Appl. Entomol. 129: 281-292.
- Ribera, I., y A. Melic. 2015. Orden Neuroptera s. s. (Planipennia). Rev. IDE@ 58: 1-12.
- Rodríguez-Palomera, M., J. Cambero-Campos, A. Robles-Bermúdez, C. Carvajal-Cazola, y O. Estrada-Virgen. 2012. Enemigos naturales asociados a *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) en Nayarit, México. Acta Zool. Mex. 28: 625-629.
- STHDA (Statistical Tools for High-throughput Data Analysis). 2020. Kruskal-Wallis test in R. <http://www.sthda.com/english/wiki/kruskal-wallis-test-in-r>. (Consulta: mayo 2020).
- Tauber, C., T. de León, N. D. Penny, and M. J. Tauber. 2000. The genus *Ceraeochrysa* (Neuroptera: Chrysopidae) of America North of Mexico: Larvae, adults, and comparative biology. Ann. Entomol. Soc. Am. 93: 1195-1221.
- Walton, A. J., and D. E. Colong. 2008. Use oil soluble dyes to mark adult *Eldana saccharina* (Lepidoptera: Pyralidae). Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass. 81: 298-309.