

Efeito do corante Vermelho de Sudan B na marcação e no desenvolvimento de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) e de *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae)

H. X. L. VOLPE, A. M. VACARI, A. C. P. VEIGA, S. R. VIEL, S. A. DE BORTOLI

O objetivo do trabalho foi avaliar aspectos biológicos de *Diatraea saccharalis* alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações do corante Vermelho de Sudan B e a possível marcação do parasitóide *Cotesia flavipes*, quando submetidos ao parasitismo de lagartas coradas. Para isso, foram adicionados à dieta artificial quatro concentrações do corante (100, 200, 300 e 400 ppm) e testemunha (sem corante). Avaliou-se o período larval e pupal, viabilidade larval e pupal, longevidade, razão sexual, peso das pupas, número total de ovos por fêmea, número de ovos por dia, número de ovos por postura, viabilidade dos ovos e período embrionário; além disso, foram realizadas algumas medições nas lagartas (Bioensaio 1). Lagartas de 17 dias de idade (30) de cada tratamento foram retiradas dos tubos e expostas ao parasitismo de *C. flavipes* (Bioensaio 2). Avaliou-se o período ovo-pupa, razão sexual, período e viabilidade pupal, número de fêmeas, machos, total de adultos emergidos e longevidade. Os dados foram submetidos à análise multivariada de agrupamento, two-way e componentes principais. Com base nas análises, observou-se que o tratamento de 100 ppm foi o menos prejudicial a biologia da broca, por se agrupar com a testemunha e não influenciar negativamente seus aspectos biológicos. A concentração de 400 ppm afetou negativamente a biologia de *C. flavipes*. Todas as doses marcaram as lagartas e os adultos, porém a concentração de 100 ppm é a mais indicada para a marcação de *D. saccharalis*. Nenhuma das concentrações testadas marcou adultos de *C. flavipes*, apesar de afetar sua biologia. Sendo assim, é inviável aumentar a concentração visando futuros testes, por esse corante ter se mostrado prejudicial aos aspectos biológicos de *D. saccharalis* e *C. flavipes*.

H. X. L. VOLPE, A. M. VACARI, A. C. P. VEIGA, S. R. VIEL, S. A. DE BORTOLI. Departamento de Fitossanidade, Laboratório de Biologia e Criação de Insetos, FCAV/Unesp, CEP: 14884-900. Jaboticabal – São Paulo.
hxlvolpe@ig.com.br

Palavras-chave: Marcação de insetos, biologia de insetos.

INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar está em processo de expansão acelerada nos dias atuais, pelo fato de seus derivados ganharem espaço no mercado nacional com o aumento da frota dos automóveis bi-combustíveis e alto interesse econômico dos demais derivados,

alcançando a marca de 427 milhões de toneladas (AGRIANUAL, 2007). Porém extensas áreas contínuas cultivadas com cana-de-açúcar torna propício o ataque de pragas, sendo que *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) destaca-se pela frequência com que ocorre e pelos prejuízos que causa (PINTO *et al.*, 2006), devido ao seu

alto potencial biótico, clima favorável e hábito da praga, que a protege dos inimigos naturais. No entanto, o tamanho de uma população é regulado basicamente, por quatro fatores: natalidade, mortalidade, imigração e emigração. Qualquer estudo da ecologia das populações de uma espécie seria incompleto sem a investigação adequada de sua capacidade de movimentação, (CLARK *et al.*, 1967), bem como a determinação da densidade populacional (OSTLIE *et al.*, 1984). Entretanto, existe uma grande dificuldade em se estimar essas taxas na natureza (CONRAD *et al.*, 2001), sendo a abordagem experimental, possivelmente, uma boa solução.

Uma alternativa seria o uso de técnicas de marcação de insetos, por garantir que o inseto capturado seja o mesmo que foi liberado. Nesse contexto, o uso de corantes para marcação é de fácil aplicação e visualização, possibilitando marcação permanente (OSTLIE *et al.*, 1984), sendo facilmente manipuláveis e seguros ao ambiente (HAGLER & JACKSON, 2001). Assim, permite rápida distinção dos insetos liberados, em relação aos presentes naturalmente no campo, garantindo a marcação do inseto até o momento de recaptura (SOUTHWOOD, 1992), porém pode ser tóxico ao inseto, influenciando seu comportamento e sobrevivência (OSTLIE *et al.*, 1984).

Corantes incorporados em dieta tem eficiência comprovada na marcação de lepidópteros (OSTLIE *et al.*, 1984), porém, não existem estudos visando a movimentação do corante para o terceiro nível trófico, no caso, seus predadores e parasitóides. Pesquisas nesse sentido ampliariam a aplicação desses marcadores, facilitando estudos de comportamento de insetos na área de Controle Biológico. Entretanto, devem-se adotar concentrações que promovam o mínimo de efeito deletério no desenvolvimento, viabilidade larval e vigor do adulto, de modo a evitar que estes influenciem ou mascarem resultados experimentais (HUNT *et al.*, 2000), proporcionando o desenvolvimento de trabalhos relacionados a dispersão de *D. saccharalis* que ainda são escassos, bem como consequente marcação de seus parasitóides.

Quanto à sua adoção em parasitóides e predadores, é de grande importância a determinação de sua dispersão e distribuição espacial, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de modelos de liberação desses insetos em programas de controle biológico aplicado, aumentando a eficiência de controle por meio do melhor entendimento de seu comportamento.

Em vista disso, o objetivo do trabalho foi avaliar os aspectos biológicos de *D. saccharalis* alimentada com dieta artificial contendo diferentes concentrações do corante Vermelho de Sudan B, bem como de seu parasitóide, *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae).

MATERIAL E MÉTODOS

Local e Condições

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia e Criação de Insetos (LBCI) do departamento de Fitossanidade da FCAV/Unesp, em sala climatizada sob a temperatura de 25±1°C, umidade relativa de 70±10% e fotofase de 12 horas.

Bioensaio 1 – Marcação de *Diatraea saccharalis*

Folhas de papel sulfite contendo posturas de *D. saccharalis* foram separadas da criação e acondicionadas em recipiente plástico contendo algodão úmido para evitar o ressecamento dos ovos até à eclosão das larvas. Larvas de 24 horas de idade foram então transferidas com o auxílio de um pincel de cerdas macias para tubos de fundo chato (8,5 x 2 cm de diâmetro) (20 larvas/tubo) contendo dieta artificial com corante Vermelho de Sudan B CI 26110 (produzido no Brasil) nas concentrações de 100, 200, 300 e 400 ppm e testemunha (dieta sem adição de corante) (Figuras 1A e B). Para o preparo da solução, pesou-se quatro gramas do corante que foi diluído em 40 mL de óleo de soja (OSTLIE *et al.*, 1984) (Figura 1C). Para o preparo da dieta com concentração de 100 ppm, adicionou-se 1 mL da solução por litro de dieta, e



Figura 1. A) Embalagem do corante Vermelho de Sudan B; B) Tubos de fundo chato contendo dieta sem corante (direita) e com corante (aumentando a concentração da direita para esquerda); C) Corante diluído em óleo vegetal (solução estoque); D) Dieta de realimentação sem corante (esquerda) e com corante (aumentando a concentração da esquerda para direita).

assim sucessivamente até 4 mL de solução estoque para cada litro de dieta (400 ppm).

Após 20 dias, foram retiradas 40 larvas dos tubos de cada tratamento e individualizadas em placas de Petri (6 x 2 cm) contendo dieta de realimentação (dieta fornecida às lagartas a partir de 15 dias de idade) com as mesmas concentrações de corante (Figura 1D). As pupas provenientes dos tratamentos foram transferidas para recipientes plásticos transparentes (29 x 16 x 8 cm), até a emergência dos adultos. Em seguida, foram utilizados oito casais por tratamento para montagem de gaiolas de postura (1casal/gaiola) (20 x 10 cm de diâmetro) para avaliação dos aspectos reprodutivos. Avaliou-se o período larval e pupal, viabilidade larval e pupal, longevidade, razão sexual, peso das pupas, número total de ovos por fêmea, número de ovos por dia, número de ovos por postura, viabilidade dos ovos e período embrionário.

Além disso, foram retiradas dos tubos de fundo chato 30 lagartas/tratamento com 20 dias de idade e realizadas aferições com o auxílio de um microscópio estereoscópico com objetiva graduada, sendo estas, largura

da cápsula cefálica e do tórax e comprimento do corpo.

Bioensaio 2 – Marcação de *Cotesia flavipes*

Em pré-testes realizados, observou-se que a concentração de 100 ppm não foi suficiente para a marcação de *C. flavipes*. Portanto, para a montagem do experimento, foram retiradas 30 lagartas de 17 dias de idade de tubos de fundo chato contendo dieta artificial com corante Vermelho de Sudan B, nas concentrações de 200, 300 e 400 ppm, e testemunha. As lagartas foram submetidas ao parasitismo por *C. flavipes* e individualizadas em placas de Petri (6 x 2 cm) contendo dieta de realimentação com as respectivas concentrações de corante.

Avaliou-se o período ovo-pupa, período e viabilidade pupal, número de machos, fêmeas e total de adultos emergidos, razão sexual e longevidade dos parasitóides.

Análise dos dados

Os dados foram submetidos a análise exploratória de dados multivariada de agrupamento (AA), utilizando o Método de

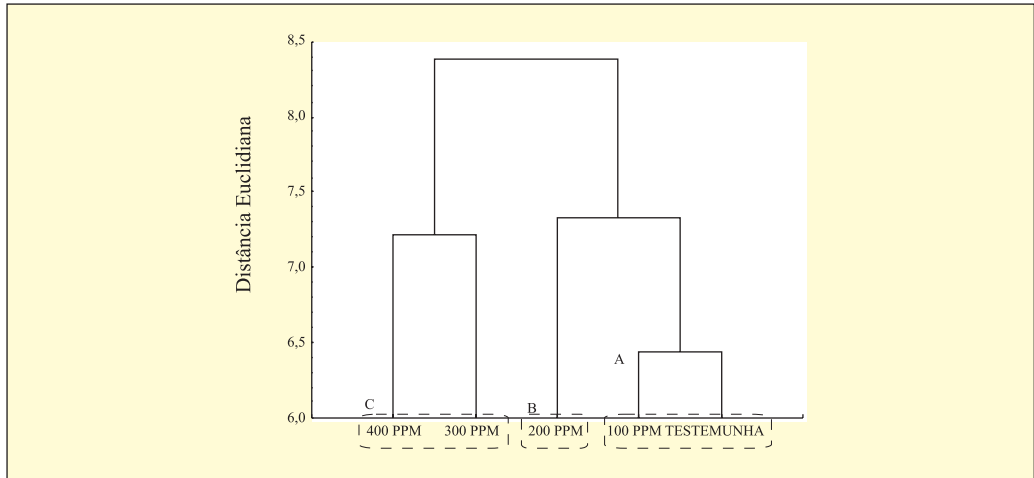


Figura 2. Dendrograma mostrando o agrupamento das concentrações do corante Vermelho de Sudan B em relação aos aspectos biológicos de *Diatraea saccharalis*.

Ward's (STATISTICA, 2004). Para complementar AA utilizou-se a análise dos componentes principais (ACP) e Duas entradas (Two-way), levando-se em consideração pelo menos duas dimensões, baseado no critério de Kaiser.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Marcação de *Diatraea saccharalis*

Com base na análise de agrupamento, observa-se a formação de três grupos. O grupo A, composto pela testemunha e 100

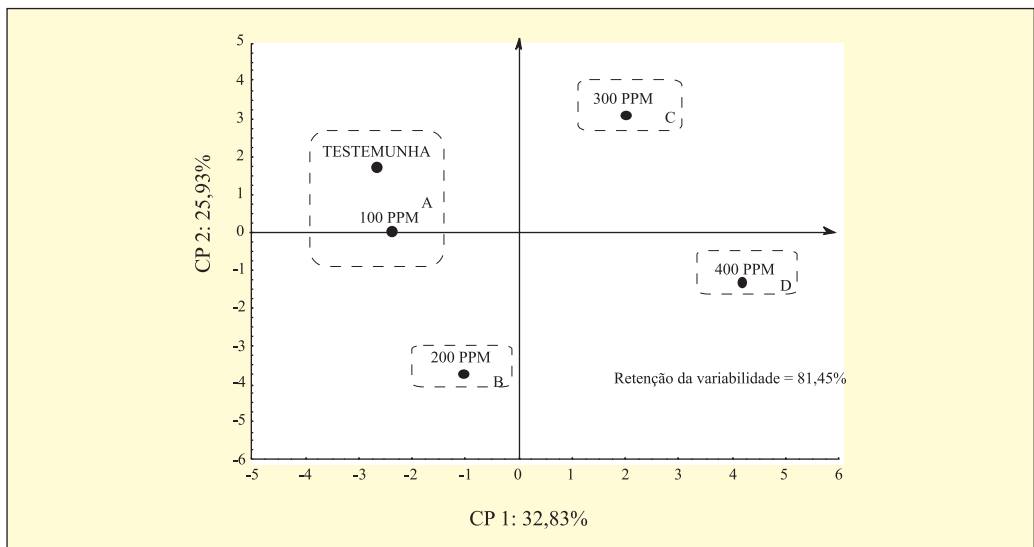


Figura 3. Distribuição das concentrações do corante Vermelho de Sudan B em relação aos aspectos biológicos de *Diatraea saccharalis*, segundo análise dos Componentes Principais.

ppm, apresentando grande similaridade entre esses dois tratamentos; o grupo B, formado pelo tratamento com 200 ppm; e o grupo C, com maior distância Euclidiana em relação ao Grupo A, composto pelos tratamentos 300 e 400 ppm. O tratamento com 100 ppm não afetou negativamente os aspectos biológicos de *D. saccharalis* pelo fato de se agrupar com a testemunha. Fato evidenciado pelo período larval de 27,70 dias (testemunha) e 27,50 dias (100 ppm), período pupal (9,76 e 9,86 dias), viabilidade pupal (92,50 e 94,74%), longevidade (6,50 e 7,33 dias) e viabilidade de ovos (92,0 e 91,0%) serem semelhantes para os dois tratamentos. Porém, os demais influenciaram negativamente os aspectos biológicos da broca da cana-de-açúcar, sendo que quanto maior a concentração de corante utilizada, maior o efeito negativo na biologia da praga, comprovado pelo aumento da distância Euclidiana dos tratamentos com maiores concentrações de corante em relação à testemunha (Figura 2).

A análise de componentes principais complementa os resultados obtidos na análise de agrupamento. Assim, observa-se a formação de quatro grupos distintos, um em cada quadrante do gráfico. Testemunha e 100 ppm (Grupo A) ficaram próximos e em sentido oposto ao 400 ppm (Grupo D), ou seja, 100 ppm foi semelhante a testemunha, não afetando os aspectos biológicos de *D. saccharalis* e mostrando ser antagônico a 400 ppm. Os tratamentos com 200 e 300 ppm ficaram separados da testemunha, mostrando que afetam as características biológicas da praga (Figura 3).

Pela análise de duas entradas, pode-se averiguar o efeito de cada tratamento nas características biológicas de *D. saccharalis*. Testemunha e 100 ppm apresentaram menores períodos larval e pupal, maior peso da lagarta, maior largura do tórax e maior número de ovos por fêmea, ou seja, não houve influência negativa nas características biológicas da broca utilizando o

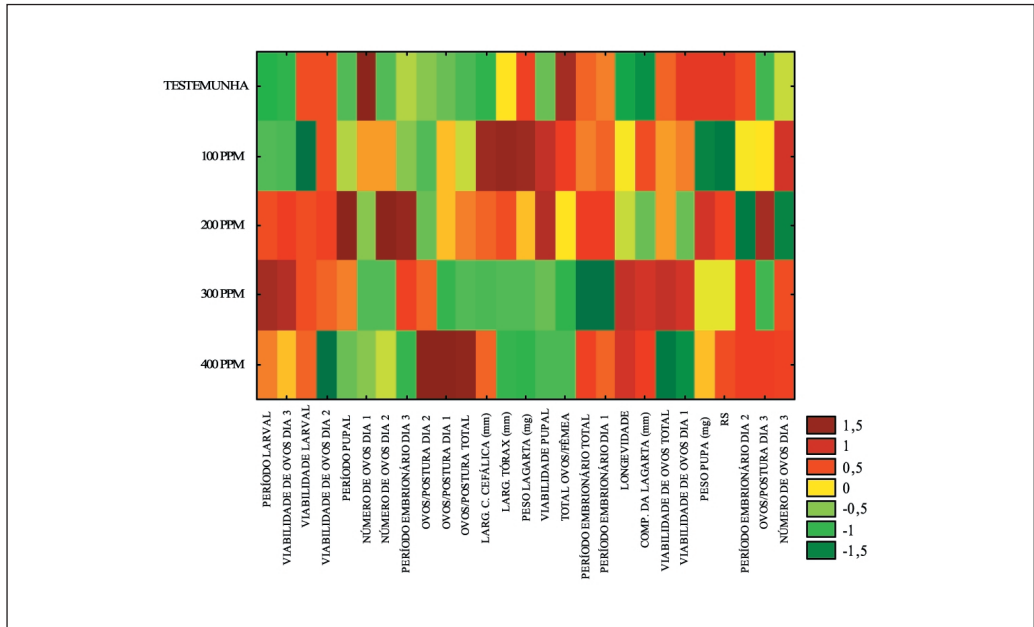


Figura 4. Análise de duas entradas mostrando a influência de cada aspecto biológico de *Diatraea saccharalis* em relação às concentrações do corante Vermelho de Sudan B.



Figura 5. *Diatraea saccharalis* sem adição de corante (esquerda) na dieta e marcadas com as concentrações de 100, 200, 300 e 400 ppm (direita). A) Posturas; B) Larvas; C) Adultos.

corante Vermelho de Sudan B na concentração de 100 ppm. No entanto, para os demais aspectos biológicos estudados, todos os tratamentos foram semelhantes (Figura 4). Nas maiores concentrações, os períodos larval e pupal foram maiores, as fêmeas ovipositaram menos, sendo que as lagartas ganharam menos peso e se desenvolveram menos, evidenciado pelo menor comprimento do tórax (Figura 4). Tal fato explica o agrupamento da testemunha com 100 ppm (Figura 2) e a grande distância Euclidiana da testemunha e 100 ppm com os demais tratamentos. Os resultados obtidos corroboram (OSTLIE *et al.*, 1984), que observaram efeito no desenvolvimento, prolongamento do período larval e menor peso pupal em larvas de *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796) (Lepidoptera: Pyralidae) alimentadas com corante Sudan Red, porém os autores não notaram influência negativa na longevidade, o que também foi observado por VILARINHO *et al.* (2006) em estudo com *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) utilizando corante Sudan Red, o que não

corresponde com os resultados para longevidade encontrados no presente trabalho.

Portanto, os aspectos biológicos estão associados à qualidade do alimento consumido, interferindo no período de desenvolvimento, viabilidade pupal e longevidade dos insetos (WALDBAUER, 1968). Esse fato pode ser explicado pelo gasto energético do inseto para metabolizar o corante ingerido, tido como substância tóxica. Esse gasto energético poderia impedir o incremento para desempenho de outras funções metabólicas que possibilitariam o desenvolvimento normal do inseto.

Todas as concentrações de corante utilizadas proporcionaram marcação de *D. saccharalis* na fase larval, adulta e ovo, colorindo os tecidos que apresentavam lipídios em sua composição, sendo que com o aumento da concentração do corante, a coloração de ovos, larvas e adultos tornou-se mais intensa (Figura 5), concordando com o que foi relatado por QURESHI *et al.* (2004) em *Diatraea grandiosella* Dyar 1911, (Lepidoptera: Crambidae) com corante Sudan Red e Solvent Blue.

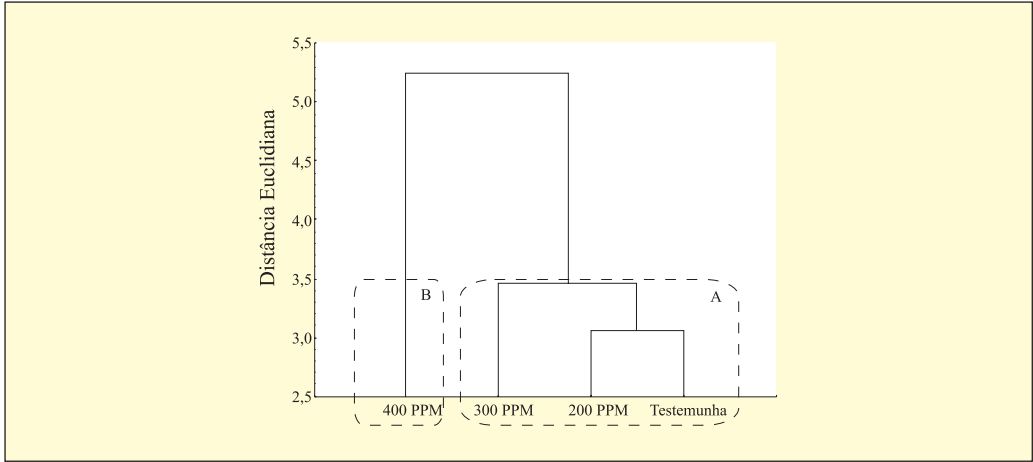


Figura 6. Dendrograma mostrando o agrupamento das concentrações do corante Vermelho de Sudan B em relação aos aspectos biológicos de *Cotesia flavipes*.

Marcação de *Cotesia flavipes*

Pela análise de agrupamento pode-se observar a formação de dois grupos distintos. O grupo A é composto pela testemunha, 200 e 300 ppm, mostrando que a similaridade

de das concentrações com a testemunha indica que essas doses não interferiram negativamente na biologia de *C. flavipes*. Já o grupo B, formado apenas por 400 ppm, possui grande distância Euclidiana dos demais tra-

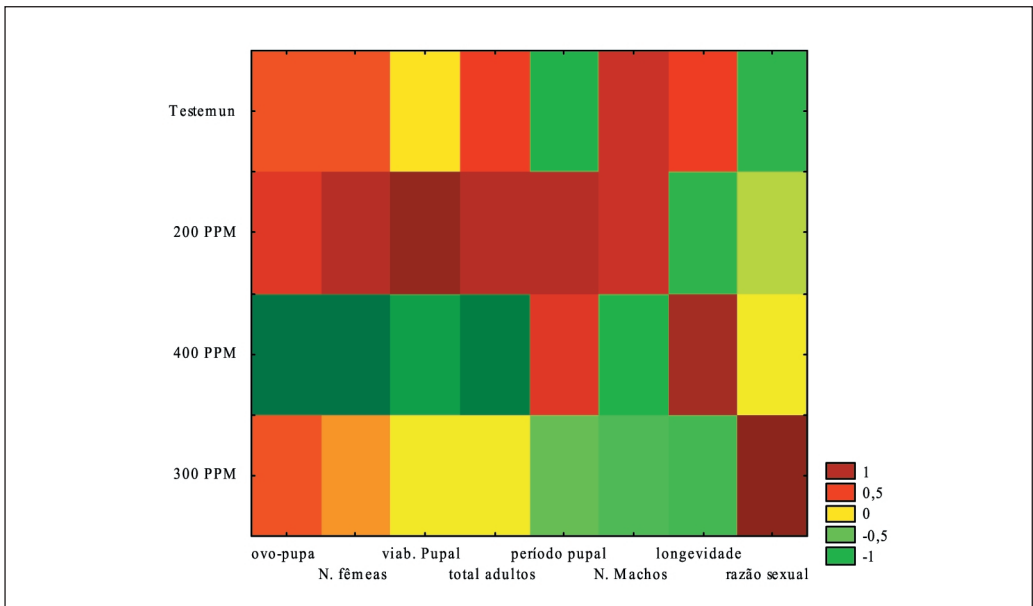


Figura 7. Análise de duas entradas mostrando o peso de cada aspecto biológico em cada um dos tratamentos.

tamentos, mostrando efeito negativo na biologia do parasitóide (Figura 6).

Com base no gráfico de duas entradas, pode-se observar a influência de cada aspecto biológico estudado nos tratamentos. Nota-se que os tratamentos testemunha, 200 e 300 ppm tiveram maiores valores para número de fêmeas, longevidade, viabilidade pupal e total de adultos. Em contrapartida, 400 ppm teve maior período pupal (Figura 7). Para os demais aspectos biológicos estudados os resultados foram semelhantes. Esses aspectos biológicos corroboram a formação dos dois grupos na análise de agrupamento, mostrando a semelhança dos tratamentos testemunha, 200 e 300 ppm e separando-os de 400 ppm (Figura 6).

Ao contrário do ocorrido com *D. saccharalis*, o corante não mostrou eficiência na marcação de adultos de *C. flavipes*, sendo tóxico ao inseto à partir de 400 ppm. Contudo, apesar

de corantes incorporados em dieta artificial terem eficiência comprovada na marcação de lepidópteros (OSTLIE *et al.*, 1984), a transferência do mesmo para o parasitóide (terceiro nível trófico) foi ineficiente nas concentrações testadas, sendo que o aumento das concentrações torna-se inviável, visto o efeito negativo que poderá causar na biologia da lagarta e consequentemente em *C. flavipes*.

Todas as concentrações do corante Vermelho de Sudan B marcaram *D. saccharalis*, sendo a concentração de 100 ppm a mais indicada para a marcação de larvas e adultos, por não prejudicar o seu desenvolvimento biológico.

O corante não marcou *C. flavipes* em nenhuma das concentrações testadas, tornando inviável pesquisas com maiores concentrações, devido ao efeito prejudicial nas lagartas e no parasitóide nas concentrações de 300 e 400 ppm.

RESUMEN

VOLPE H. X. L., A. M. VACARI, A. C. P. VEIGA, S. R. VIEL, S. A. DE BORTOLI. 2009. Efecto del colorante Rojo del Sudan B en la marcación y desarrollo de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) y *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, **35**: 239-247.

Este trabajo tubo por objetivo evaluar los aspectos biológicos de *Diatraea saccharalis* alimentada con dieta artificial que contiendo diferentes concentraciones del colorante Rojo del Sudan B y la posible marcación y efecto en el parasitoide *Cotesia flavipes* cuando parasitó larvas marcadas. Para ello fueron adicionadas a la dieta artificial cuatro concentraciones del colorante (100, 200, 300 y 400 ppm) y un testigo (sin colorante). Se evaluó el período larval y pupal, viabilidad larval y pupal, longevidad, razón sexual, peso de las pupas, número total de huevos por hembra, número de huevos por postura, viabilidad de los huevos y periodo embrionario. Igualmente fueron realizadas algunas mediciones en las larvas (bioensayo 1). Larvas de 17 días de edad (30 por cada tratamiento) fueron retiradas de los tubos y expuestas al parasitismo de *C. flavipes* (bioensayo 2). Se evaluó el período huevo-pupa, razón sexual, período y viabilidad pupal, número de hembras, machos, total de adultos emergidos y longevidad. Los datos fueron sometidos a analisis multivariado de agrupamiento two-way y componentes principales. Con base en éste analisis se observo que el tratamiento de 100 ppm fue el que menos interfirió en la biología de larval de *D. saccharalis* por agruparse junto con el testigo y no influenciar negativamente los aspectos biológicos. La concentración de 400 ppm afectó negativamente la biología de *C. flavipes*. Todas las concentraciones utilizadas marcaron larvas y adultos, pero la concentración de 100 ppm fue la más indicada para la marcación de *D. saccharalis*. Ninguna de las concentraciones utilizadas marcó adultos de *C. flavipes*, pero si afectaron negativamente su biología. Estos resultados indican que es inviable utilizar concentraciones mayores de 100 ppm pensando en futuras pruebas, ya que el colorante mostró ser perjudicial para la biología de *D. saccharalis* y *C. flavipes* en valores superiores a esta concentración.

Palabras clave: Marcación de insectos, biología de insectos.

ABSTRACT

VOLPE H. X. L., A. M. VACARI, A. C. P. VEIGA, S. R. VIEL, S. A. DE BORTOLI. 2009. Effect of Sudan Red B Dye in the mark and development of *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) and *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, **35**: 239-247.

The objective of this work was to evaluate biological aspects of *Diatraea saccharalis* fed on artificial diet containing different concentrations of the Sudan B Red dye and the possibility to mark the parasitoid *Cotesia flavipes*, when submitted to the parasitism of dyed caterpillars. For that, were added to the artificial diet four concentrations of Sudan Red B dye (100, 200, 300 and 400 ppm) and control (no dye addition). It was evaluated larval and pupal period, larval and pupal viability, longevity, sex rate, pupal weigh, eggs per female, eggs per day, number of eggs per egg mass, egg viability and embryonic period; besides same were accomplished measurements in the caterpillars (bioassay 1). Caterpillars of 17 days old (30) of each treatment were removed from the tubes and exposed to the parasitism of *C. flavipes* (bioassay 2). The egg-pupae period, sex rate, pupal period and viability, number of females, males, total of emerged adults and longevity were evaluated. The data were submitted to the multivariate analysis methods: cluster analysis, two-way and principal component analysis. Based on analysis, it was observed that the treatment of 100 ppm was the least harmful to the biology of the sugar cane borer larvae by groping to the control and did not influence negatively its biological aspects. The concentration of 400 ppm affected negatively the biology of *C. flavipes*. The Sudan Red B it is ended doses marked the caterpillars and the adults, however the concentration of 100 ppm is the most suitable to dye *D. saccharalis*. None of the tested concentration marked adults of *C. flavipes*, despite to affect negatively its biology. It is unviable to increase the concentration seeking futures tests, for that dye to be harmful to the biological aspects of *D. saccharalis* and *C. flavipes*.

Key-words: Insects mark, insects biology.

REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL. 2007. *Anuário da agricultura brasileira*. São Paulo: FNP. 520pp.
- CLARK, L. R., GEIER, P. W., HUGHES, R. D., MORRIS, R. F. 1967. *The Ecology of Insect Populations in Theory and Practice*. London: Methuen & Co. Ltd., 232pp.
- CONRAD, K. F., WILLSON, K. H., WHITFIELD, K., HARVEY, I. F., THOMAS, C. J., THOMAS, N. S. 2002. Characteristics of dispersing *Ischnura elegans* and *Coenagrion puella* (Odonata): age, sex, size, morph and ectoparasitism. *Ecography*, **25**: 439-445.
- HAGLER, J. R., JACKSON, C. G. 2001. Methods for marking insects: current techniques and future prospects. *Annu. Rev. Entomol.*, **46**: 511-543.
- HUNT, T. E., HELLMICH, R. L., DYER, J. M., HIGLEY, L. H., WITKOWSKI, J. F. 2000. Oil-soluble dyes for marking European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Entomol. Sci.*, **35**: 338-341.
- OSTLIE, K. R., HIGLEY, L. G., KASTER, L. V., SHOWERS, W. B. 1984. European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) development, larval survival and adult vigor on meridic diets containing marker dyes. *J. Econ. Entomol.*, **77**: 118-120.
- PINTO, A. S., GARCIA, J. F., BOTELHO, P. S. 2006. Controle biológico de pragas da cana-de-açúcar. In: PINTO, A. S., NAVA, D. E., ROSSI, N. N., MALERBO-SOUZA, D. T. *Controle biológico de pragas na prática*. Piracicaba: CP2, Cap. 6, pp.65-74.
- QURESHI, A. J., BUSCHMAN, L. L.; THRONE, J. E. E. 2004. Oil-soluble dyes incorporates in meridic diet of *Diatraea grandiosella* (Lepidoptera: Crambidae) as markers of adult dispersal studies. *J. Econon. Entomol.*, **97**: 836-845.
- STATISTICA, 2004. *STATSOFT (Data Analysis Software System). Version 7*. StatSoft Inc. Disponível em: <<http://www.statsoft.com>>. Acesso em: 01 dez. 2008.
- SOUTHWOOD, T. R. E. 1992. *Ecological methods: with particular reference to the study of insect populations*, London: Chapman & Hall, 524pp.
- VILARINHO, E. C., FERNANDES, O. A., OMOTO, C., HUNT, T. E. 2006. Oil-soluble dyes for marking *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econon. Entomol.*, **99**: 2110-2115.
- WALDBAUER, G. P. 1968. The consumption and utilization of food by insects. *Advance Insect Physiology*, **5**: 229-288.

(Recepción: 9 enero 2009)

(Aceptación: 1 junio 2009)