

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIETA ARTIFICIAL E METODOLOGIA DE CRIAÇÃO  
MASSAL PARA O BEM-ESTAR DE *Helicoverpa armigera***

**Zulene Antônio Ribeiro**  
**Bacharel em Ciências e Matemática**

**2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIETA ARTIFICIAL E METODOLOGIA DE CRIAÇÃO  
MASSAL PARA O BEM-ESTAR DE *Helicoverpa armigera***

**Zulene Antônio Ribeiro**

**Orientador: Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Entomologia Agrícola).**

**2017**

Ribeiro, Zulene Antônio  
R484d      Dieta artificial e metodologia de criação massal para o bem-estar de *Helicoverpa armigera* / Zulene Antônio Ribeiro. -- Jaboticabal, 2017  
vi, 122 p.; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: Arlindo Leal Boiça Júnior

Banca examinadora: Aniele Pianoscki de Campos, Flávio Gonçalves de Jesus, Sergio Antônio De Bortoli, Nilza Maria Martinelli  
Bibliografia

1. *Helicoverpa armigera* – bem-estar animal. 2. Densidade populacional. 3. *Helicoverpa armigera* – dieta artificial. 4. Equilíbrio nutricional. 5. Parâmetros biológicos. 6. Técnica de criação massal I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 595.78

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DIETA ARTIFICIAL E METODOLOGIA DE CRIAÇÃO MASSAL PARA O BEM-ESTAR DE *Helicoverpa armigera*

AUTOR: ZULENE ANTONIO RIBEIRO

ORIENTADOR: ARLINDO LEAL BOIÇA JUNIOR


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:




Prof. Dr. ARLINDO LEAL BOIÇA JUNIOR  
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



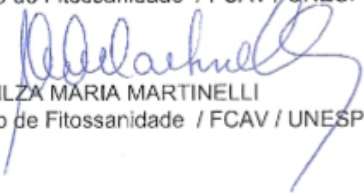
Prof. Dra. ANIELE PIANOSCKI DE CAMPOS  
UNIFAFIBE / Bebedouro, SP



Prof. Dr. FLÁVIO GONÇALVES DE JESUS  
Instituto Federal Goiano - IFG / Campus de Urutai, GO



Prof. Dr. SÉRGIO ANTONIO DE BORTOLI  
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dra. NILZA MARIA MARTINELLI  
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 03 de fevereiro de 2017

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**ZULENE ANTÔNIO RIBEIRO** – Filho de Bernardino Ribeiro de Carvalho e Ailta Maria Ribeiro, natural de Pratápolis, MG, nascido no dia 02 de novembro de 1969. Formado em Técnico em Agropecuária no Colégio Técnico Agrícola “José Bonifácio” da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP, no ano de 1989, prestou concurso público na FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para trabalhar como Técnico em Agropecuária, lotado no Departamento de Fitossanidade, auxiliou o desenvolvimento de pesquisas em Entomologia com vários professores e alunos no Programa de Pós Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola), especialmente na área de Resistência de Plantas a Insetos. Para o desenvolvimento profissional com especialidade na área, cursou Licenciatura em Ciências e Matemática pela Faculdade São Luis. Em março de 2011, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia – Entomologia Agrícola pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, SP, atuando em pesquisas em Resistência de Plantas a Insetos, sob orientação do Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior. Aprovado na seleção de Doutorado na mesma instituição, com início em março de 2013, sendo orientado novamente pelo mesmo professor.

*“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta.*

*O que ela quer da gente é coragem.*

*O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre a mais, no meio da alegria, e inda mais alegre ainda no meio da tristeza!*

*Só assim de repente, na horinha em que se quer, de propósito – por coragem. Será? Era o que eu às vezes achava. Ao clarear do dia”.*

João Guimarães Rosa – Grande Sertão Veredas

*“Nunca é tarde para abrimos mão dos nossos preconceitos.”*

Henry David Thoreau

## **Agradeço**

A Deus por sempre ter me dado forças para alcançar meus objetivos.

## **Dedico**

A minha mulher Eliana Garcia,  
Aos meus filhos Israel Garcia Ribeiro e Daniel Garcia Ribeiro,  
A minha mãe Ailta Maria Ribeiro,  
por tudo que representam em minha vida.

## **Ofereço**

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Em especial ao Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior, pela oportunidade de trabalho, orientação prestada, conhecimentos transmitidos e confiança para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias e ao Departamento de Fitossanidade, pela oportunidade de cursar a Pós-Graduação em Agronomia - Entomologia Agrícola.

Ao Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes, em nome do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola), meu reconhecimento pela oportunidade para a minha qualificação profissional.

Aos professores do Programa pelos ensinamentos compartilhados e a ajuda recebida os quais contribuíram de forma relevante para o meu aperfeiçoamento técnico, em especial aos professores pelas disciplinas ministradas no doutorado:

- Prof. Dr. Antonio de Goes / Prof. Dr. Modesto Barreto - Resistência de Plantas à Doenças;
- Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi - Fisiologia dos Insetos;
- Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos - Microscopia Eletrônica de Varredura Aplicada às Ciências Biológicas;
- Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos / Prof. Dr. Pedro Luiz Martins Soares - Nematologia Agrícola;
- Prof. Dr. José Carlos Barbosa - Métodos Estatísticos Aplicados a Entomologia;
- Prof. Dr. Sérgio Antonio de Bortoli - Biologia de Insetos.

Ao Prof. Dr. Bruno Henrique Sardinha de Souza pelo exemplo, pela atitude contínua de apoio e valiosa ajuda, e pelas estimulantes conversas na área de Resistência de Plantas a Insetos.



Ao MSc Wellington Ivo Eduardo pelo primordial apoio.

Aos parceiros de trabalho Bruno Henrique Sardinha de Souza, Eduardo Neves Costa, Luciano Nogueira, Mirella Marconato Di Bello e Wellington Ivo Eduardo.

Aos alunos do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos: Bruno Henrique Sardinha de Souza, Eduardo Neves Costa, Mirella Marconato Di Bello, Renato Franco Oliveira de Moraes, Wellington Ivo Eduardo, Luciano Nogueira, Marcelo Müller de Freitas, Carlos Alessandro de Freitas, Stéfane Carolina Quista da Silva Faria e Paulo Henrique Soares Barcelos pelo companheirismo.

A todos os funcionários do Departamento de Fitossanidade, em especial a José Altamiro de Souza, Roseli Pessoa e Lúgia Dias Fiorezzi pela nossa amizade e colaboração.

Às Empresas: Bayer, Dupont (Paulínia, SP) e SGS Gravena (Jaboticabal, SP) pela doação de *Helicoverpa armigera*.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, pela convivência.

*“Solidários, seremos união.*

*Separados uns dos outros seremos pontos de vista.*

*Juntos alcançaremos a realização de nossos propósitos.”*

Bezerra de Menezes

**MUITO OBRIGADO.**

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	1
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1 Introdução .....	1
2 Revisão de literatura .....	4
2.1 <i>Helicoverpa armigera</i> .....	4
2.1.1 Posição taxonômica.....	4
2.1.2 Sinonímias, combinações usadas para espécie e nomes comuns .....	5
2.1.3 Distribuição geográfica de <i>Helicoverpa armigera</i> .....	6
2.1.4 Hospedeiros de <i>Helicoverpa armigera</i> .....	6
2.1.5 Aspectos biológicos de <i>Helicoverpa armigera</i> .....	7
2.1.6 Danos e prejuízos em cultivos por <i>Helicoverpa armigera</i> .....	9
2.1.7 Estratégias de manejo de <i>Helicoverpa armigera</i> .....	10
2.2 Nutrição de insetos .....	13
2.2.1 Exigências nutricionais em insetos .....	13
2.2.2 Dietas artificiais.....	15
2.2.3 Dietas artificiais para <i>Helicoverpa armigera</i> .....	16
2.3 Criação de insetos em laboratório .....	16
2.4 Métodos de avaliação .....	18
2.4.1 Abordagem biométrica.....	18
2.4.2 Abordagem nutricional quantitativa.....	19
2.4.3 Abordagem demográfica.....	21

2.4.4 Abordagem bem-estar animal.....	22
2.4.5 Elaboração de protocolo para criação de <i>Helicoverpa armigera</i> que atenda o bem-estar animal .....	23
3 Referências .....	26
CAPÍTULO 2 - Dieta artificial para <i>Helicoverpa armigera</i> : uma análise biológica, nutricional e populacional.....	42
RESUMO.....	42
CHAPTER 2 - Artificial diet for <i>Helicoverpa armigera</i> : a biological, nutritional and population analysis .....	43
ABSTRACT.....	43
1 Introdução .....	44
2 Material e métodos.....	46
2.1 Local .....	46
2.2 Criação de <i>Helicoverpa armigera</i> .....	46
2.3 Dietas artificiais.....	48
2.4 Parâmetros de desenvolvimento de <i>Helicoverpa armigera</i> em dietas artificiais .....	48
2.5 Índices nutricionais de <i>Helicoverpa armigera</i> em dietas artificiais .....	50
2.6 Índices populacionais de <i>Helicoverpa armigera</i> em dietas artificiais .....	50
2.7 Análise estatística.....	51
3 Resultados .....	52
3.1 Parâmetros de desenvolvimento .....	52
3.1.1 Tempo de desenvolvimento e longevidade de adultos .....	52
3.1.2 Peso nos estágios de desenvolvimento.....	54
3.1.3 Sobrevivência e índice de desenvolvimento .....	54
3.1.4 Deformidade .....	55
3.1.5 Razão sexual, fecundidade e fertilidade .....	55

3.1.6 Fecundidade e fertilidade diária.....	56
3.2 Índices nutricionais .....	57
3.3 Índices populacionais.....	58
4 Discussão.....	60
5 Conclusão .....	65
6 Referências .....	66
CAPÍTULO 3 - Metodologia de criação de <i>Helicoverpa armigera</i> para o bem-estar animal .....	72
RESUMO.....	72
CHAPTER 3 - Rearing methodology of <i>Helicoverpa armigera</i> for animal welfare .....	73
ABSTRACT .....	73
1 Introdução .....	74
2. Material e métodos.....	76
2.1 Local .....	76
2.2 Criação de <i>Helicoverpa armigera</i> .....	77
2.3 Recipiente e forma de disponibilidade de alimento para criação de <i>Helicoverpa armigera</i> .....	77
2.4 Quantidade de dieta artificial para alimentação de <i>Helicoverpa armigera</i> .....	78
2.5 Efeito no desenvolvimento de <i>Helicoverpa armigera</i> submetida a diferentes densidades e períodos de pré-individualização .....	79
2.6 Efeito no desenvolvimento de <i>Helicoverpa armigera</i> em recipientes com tamanhos diferentes no período de pré-individualização.....	80
2.7 Estágios imaturos de <i>Helicoverpa armigera</i> .....	80
2.8 Gaiola de oviposição e densidade de casais por gaiola para criação de <i>Helicoverpa armigera</i> .....	81
2.9 Validação da metodologia de criação de <i>Helicoverpa armigera</i> .....	81

2.10 Análise estatística .....	82
3 Resultados .....	83
3.1 Recipiente e forma de disponibilidade de alimento para criação de <i>Helicoverpa armigera</i> .....	83
3.2 Quantidade de dieta artificial para alimentação de <i>Helicoverpa armigera</i> .....	84
3.3 Efeito no desenvolvimento de <i>Helicoverpa armigera</i> submetida a diferentes densidades e períodos de pré-individualização .....	87
3.4 Efeito no desenvolvimento de <i>Helicoverpa armigera</i> em recipientes com tamanhos diferentes no período de pré-individualização .....	91
3.5 Estágios imaturos em <i>Helicoverpa armigera</i> .....	92
3.6 Gaiola de oviposição e densidade de casais por gaiola para criação de <i>Helicoverpa armigera</i> .....	95
3.7 Validação da metodologia de criação de <i>Helicoverpa armigera</i> .....	99
4 Discussão .....	100
5 Conclusão .....	109
6 Referências .....	110
CAPÍTULO 4 - Considerações finais .....	120
Referências .....	122

## DIETA ARTIFICIAL E METODOLOGIA DE CRIAÇÃO MASSAL PARA O BEM-ESTAR DE *Helicoverpa armigera*

**RESUMO** - A partir de estudos biológicos de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), objetivou-se neste trabalho selecionar uma dieta artificial que possa melhor suprir as exigências nutricionais requeridas pelo inseto e estabelecer uma metodologia de criação massal de *H. armigera* em laboratório que forneça condições estruturais satisfatórias para seu desenvolvimento larval e desempenho das funções reprodutivas, assim por meio de boas práticas de produção proporcionar o bem-estar aos insetos. No estudo com dieta artificial foram medidos parâmetros de desenvolvimento, índices nutricionais e índices populacionais em *H. armigera* alimentada em quatro dietas artificiais utilizadas para a criação de outros lepidópteros. Os resultados indicaram que *H. armigera* foi capaz de completar o ciclo de vida nas quatro dietas, entretanto, com alterações no seu desenvolvimento dependendo do alimento ingerido na fase larval. Em condições nutricionais favoráveis, os insetos potencializaram a eficiência de utilização das dietas, com menor consumo e alta eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido para ganho de biomassa, resultando em insetos mais vigorosos. Por outro lado, em condições menos favoráveis, as lagartas de *H. armigera* tentaram compensar a menor adequação nutricional modificando seu comportamento em relação à tomada do alimento, aumentando a ingestão da dieta; contudo, esse esforço resultou em maior gasto de energia no metabolismo, com baixa eficiência na conversão do alimento ingerido e digerido. A dieta artificial desenvolvida para *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae) foi adequada ao desenvolvimento biológico de *H. armigera*, porém, a modificação realizada nesta dieta promoveu excelente desenvolvimento do inseto, com elevados índices populacionais e nutricionais, e sem decréscimo no vigor e potencial reprodutivo, sendo a mais indicada para criação massal de *H. armigera*. Quanto à metodologia de criação, este estudo visou abordar os principais desafios enfrentados na criação de *H. armigera* e identificar os processos de criação mais eficientes para a produção de insetos com desenvolvimento uniforme, e com quantidade e qualidade suficiente para serem utilizados em pesquisas básicas quanto aplicadas. Os efeitos no desenvolvimento larval de *H. armigera* foram analisados em condições de diferentes densidades, recipientes e formas de disponibilidade e quantidade de alimento. Para os adultos, três tamanhos de gaiolas e densidades de casais foram analisados. Os resultados indicaram alterações nos parâmetros biológicos de *H. armigera* em função das condições oferecidas para seu desenvolvimento nas fases larval e adulta. A sobrevivência e a fertilidade de *H. armigera* foram diretamente relacionadas com a densidade e o tamanho da gaiola de criação. Espera-se que os resultados obtidos nesse trabalho possam contribuir para o conhecimento científico e fornecer subsídios para o desenvolvimento de estudos que contribuam com o Manejo Integrado de *H. armigera* em diversas culturas hospedeiras.

**Palavras-chave:** bem-estar animal, densidade populacional, dieta artificial, equilíbrio nutricional, parâmetros biológicos, técnica de criação massal

## ARTIFICIAL DIET AND METHODOLOGY FOR MASS REARING FOR WELFARE OF *Helicoverpa armigera*

**ABSTRACT** - From the biological studies of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), the objectives of this study were to select an artificial diet that could meet its nutritional requirements and establish a methodology of mass rearing in the laboratory that provides satisfactory structural conditions for larval development and reproductive performance of *H. armigera*, thus through good production practices to provide welfare to insects. In the study with artificial diet were measured developmental parameters, nutritional and population indices on *H. armigera* fed on four artificial diets used for rearing of other lepidopteran. The results indicated that *H. armigera* was able to complete the life cycle in the four diets, however, with changes in its development depending on the food ingested in the larval stage. In favorable nutritional conditions the insects increased the efficiency of diet utilization, with lower consumption and high conversion efficiency of ingested and digested food for biomass gain, resulting in more vigorous insects. On the other hand, under less favorable conditions, *H. armigera* larvae tried to compensate for the lower nutritional adequacy by modifying their behavior in relation to food intake, increasing the dietary intake; however, this effort resulted in increased energy expenditure on metabolism, with low efficiency in the conversion of ingested and digested food. The artificial diet developed for *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae) was adequate for *H. armigera* development, but the modification made on this diet provided an excellent development of the insect, with high population and nutritional indices, and without decreasing vigor and reproductive potential, being the most indicated for *H. armigera* mass rearing. Regarding the rearing methodology, this study sought to address the main challenges faced in the rearing of *H. armigera* and to identify the most efficient rearing processes for the production of insects with uniform development, and with sufficient quantity and quality to be used in basic and applied research. The effects on *H. armigera* larval development were analyzed under conditions of different densities, containers, forms of availability and quantity of food. For the adults three sizes of cages and densities of couples were analyzed. Results indicated alterations in the biological parameters of *H. armigera* as a function of the conditions offered for the development of the larvae and adults. Survival and fertility of *H. armigera* were directly related to the density and size of the cage. It is expected that the results obtained in this work can contribute to scientific knowledge and provide subsidies for the development of studies that contribute to Integrated Pest Management.

**Keywords:** Animal welfare, population density, artificial diet, nutritional balance, biological parameters, breeding technique

## CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

### 1 Introdução

*Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das mais importantes pragas em diversos cultivos agrícolas. Sua ocorrência foi relatada em mais de 100 espécies de plantas, especialmente em algodão, grão-de-bico, milho, soja e tomate (FITT, 1989). Adultos de *H. armigera* apresentam alta mobilidade, facilidade na dispersão e migração (DRAKE, 1991); desta forma o inseto adquiriu ampla abrangência geográfica (ZALUCKI; FURLONG, 2005). No Brasil foi relatada em 2013 na cultura do algodão e soja (CZEPAK et al., 2013). A grande importância de *H. armigera* também está relacionada com a alta capacidade de desenvolvimento, reprodução, adaptação em diferentes condições ambientais e, principalmente, pela sua preferência alimentar por estruturas reprodutivas, como inflorescências, vagens, frutos e sementes (WANG; LI, 1884), ocasionando perdas na produção de algodão, soja e milho (DEGRANDE; OMOTO, 2013).

A introdução de *H. armigera* em novas áreas agrícolas promove dúvidas quanto a seu comportamento e potenciais danos aos novos ambientes. Essa preocupação se dá notadamente por se tratar de uma espécie com histórico de evolução de resistência a diversos grupos de inseticidas químicos (McCAFFERY, 1998; MARTIN et al., 2005), pela potencial capacidade de evolução de resistência a proteínas inseticidas presentes em plantas geneticamente modificadas (ROMEIS; MEISSELE; BIGLER, 2006; TABASHNIK; van RENSBURG; CARRIERE, 2009; DOWNES; PARKER; MAHON, 2010) e pela falta de estratégias de manejo, o que se torna um problema grave devido à intensificação de aplicações de produtos químicos para seu controle, sem a adoção de estratégias preconizadas no Manejo Integrado de Pragas (MIP) (EMBRAPA, 2013).

Assim, em decorrência das características de *H. armigera* e a necessidade de seu manejo, fomentou-se estudos nas mais diversas áreas, o que demanda grande quantidade de insetos com qualidade. O processo de criação massal de insetos



fitófagos em laboratório enfrenta muitos desafios, principalmente quanto à determinação de alimento adequado que garanta suas necessidades nutricionais (PARRA, 2012; COHEN, 2015), além de metodologia de criação específica para a espécie-alvo (BOLLER; CHAMBERS, 1977).

O entendimento da interferência das variações quantitativas e qualitativas dos nutrientes da dieta artificial no desenvolvimento de um inseto é de grande relevância para a compreensão dos custos nutricionais adaptativos envolvidos (SIMPSON et al., 2004). Em geral, uma dieta desbalanceada afeta a aceitação do alimento pelo inseto, com reflexos em seu desempenho (BEHMER, 2009), o que pode ocasionar efeitos deletérios em alguma fase de seu desenvolvimento (OJEDA-AVILA; WOODS; RAGUSO, 2003; FANSON; TAYLOR, 2012).

Neste contexto, a abordagem nutricional quantitativa consiste em aferir a quantidade de alimento consumido, digerido, assimilado, excretado, metabolizado e convertido em biomassa, revelando assim os efeitos no desenvolvimento do inseto em resposta a diferentes alimentos (SCRIBER; SLANSKY JR., 1981). Schowalter (2011) relata que o alimento ingerido na fase larval é de grande importância para insetos holometábolos, pois deve atender corretamente às necessidades nutricionais para que ocorra desenvolvimento satisfatório, de modo que os indivíduos cheguem à fase adulta aptos à dispersão e reprodução. De acordo com Parra (2012), para avaliar os efeitos no desenvolvimento de insetos, a abordagem biométrica consiste em mensurar os parâmetros biológicos da espécie-alvo.

Dietas artificiais utilizadas como fonte de alimento para insetos diferem muito na adequação quando avaliadas em relação à capacidade reprodutiva (COHEN, 2001), e a produção de ovos está também relacionada com o valor proteico do alimento ingerido na fase larval (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013). A compreensão da dinâmica populacional de uma espécie pode ser abordada por meio de tabelas de vida e fertilidade, o que possibilita estimar os parâmetros relacionados ao potencial de crescimento populacional, também denominado de parâmetros demográficos (SILVEIRA NETO et al., 1976; MAIA; LUIZ; CAMPANHOLA, 2000).

Metodologias de criação massal adequadas são fundamentais para o sucesso na produção de insetos (COHEN, 2015). As condições estruturais fornecidas aos

insetos interferem em seu desenvolvimento, o que pode ocasionar efeitos deletérios nos parâmetros de desenvolvimento e comportamentais devido ao estresse (HOFFMANN; COLLINS; WOODS, 2002; ADAMO; BAKER, 2011). O estresse pode induzir a erros em resultados de investigação; desta forma, boas práticas científicas requerem insetos confinados e manuseados de maneira apropriada para que não ocorram alterações biológicas (ADAMO, 2012).

Criações de insetos em larga escala cada vez mais tem adquirido maior importância (COHEN, 2001), e o refinamento nas técnicas de criação com a agregação de novas tecnologias tem possibilitado a expansão e evolução dos programas de Manejo Integrado de Pragas (COHEN, 2015). Assim, é de se esperar que em criações massais seja abordado o bem-estar animal, como forma de propiciar ao inseto confinado adequadas condições estruturais para o seu desenvolvimento (ERENS et al., 2012).

Visto a necessidade de obtenção de *H. armigera* em criação massal em laboratório para as mais diversas aplicações, bem como para a compreensão de suas exigências nutricionais e estruturais em regime de confinamento, estudos são necessários para avaliar a importância de fornecer os requisitos ótimos aos insetos para a obtenção de indivíduos que manifestem características normais de sua biologia e que quando submetidos a estudos científicos produzam respostas confiáveis. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar dietas artificiais para determinar o melhor alimento que suporte as exigências nutricionais de *H. armigera* em criação massal e avaliar as condições estruturais para o desenvolvimento do inseto, definindo uma metodologia de criação para suprir as necessidades de *H. armigera* para as mais diversas atividades.

## 2 Revisão de literatura

### 2.1 *Helicoverpa armigera*

#### 2.1.1 Posição taxonômica

Reino Animalia

Filo Arthropoda

Classe Insecta

Ordem Lepidoptera

Família Noctuidae

Subfamília Heliiothinae

Gênero *Helicoverpa*

Espécie *Helicoverpa armigera*

Na subfamília Heliiothinae encontram-se algumas das espécies de maior importância agrícola. Em particular, pragas importantes pertencentes ao gênero *Helicoverpa*, como por exemplo *Helicoverpa armigera* (Hübner) e *Helicoverpa assulta* (Guenée) na África, Europa, Ásia e Oceania e *Helicoverpa zea* (Boddie) nas Américas (HARDWICK, 1965).

A posição taxonômica de *H. armigera* desde a primeira classificação até a atualidade tem sido controversa (CABI/EPPO, 1992). Em 1965, Hardwick analisou um complexo de espécies de lagartas da família Noctuidae que atacavam espigas de milho, espécies estas que ocorriam nas Américas e no Continente Africano, e que na maioria das quais apresentavam referência como sendo das espécies *Heliiothis armigera* Hübner ou *Heliiothis obsoleta* F. Após análise concluiu-se que existia um complexo de espécies e subespécies envolvido. Assim, Hardwick descreveu o gênero *Helicoverpa* composto por 18 espécies (MITTER; POOLE; MATTHEWS, 1993).

Com base em características morfológicas nas genitálias masculina e feminina foi proposto que para a espécie localizada nas Américas a classificação

seria *H. zea* e para o Continente Africano *H. armigera*. Dentro deste novo gênero, o grupo de *zea* contém oito espécies, e o grupo *armigera* duas espécies, sendo *H. armigera* e *Helicoverpa helenae* Hardwick e três subespécies *Helicoverpa armigera armigera* Walker, *Helicoverpa armigera conferta* Walker e *Helicoverpa armigera commoni* Hardwick (HARDWICK, 1970). Entretanto, ocorreu alguma resistência à alteração proposta, pela dificuldade na identificação por meio da dissecação de genitália e por estar na literatura bem estabelecida à classificação antiga em *Heliothis* (BRETHERTON; GOATER; LORIMER, 1983). Mas o trabalho de Hardwick é aceito pela comunidade científica, bem como as alterações realizadas (MATTHEWS, 1992; GORDON et al., 2009).

### 2.1.2 Sinonímias, combinações usadas para espécie e nomes comuns

Para *H. armigera* pode-se encontrar variadas sinonímias, combinações e nomes comuns:

- Sinonímias: *Chloridea obsoleta* F.; *Heliothis conferta* Walker; *Heliothis guidellii* Constantini; *Heliothis pulverosa* Walker; *Heliothis rama* Bhattacharjee & Gupta; *Heliothis uniformis* Wallengren.

- Combinações usadas para espécie: *Chloridea armigera*; *Heliothis armigera* e *Noctua armigera*.

- Nomes comuns: African cotton bollworm, old world bollworm, cotton bollworm, tobacco budworm, corn earworm, gram pod borer, grubtomato, scarce bordered straw (inglês), gusano bellotero del algodón, gusano de la cápsula, gusano del elote del maiz, gusano verde de la cápsula, noctua del tomate, oruga de las cápsulas del algodón, oruga del choclo (espanhol), chenille des epis du mais, noctuelle des tomates, ver de la capsule (francês), elotide del pomodoro (italiano) e lagarta-do-tomate (português-PT) (CABI, 2016).

### 2.1.3 Distribuição geográfica de *Helicoverpa armigera*

Os adultos de *H. armigera* apresentam alta mobilidade e facilidade na dispersão (DRAKE, 1991). A espécie é migratória, com capacidade para alcançar altitude elevada e longa distância (PEDGLEY, 1985; ZHOU; APPLEBAUM; COLL, 2000; FENG et al., 2005). Dessa forma, *H. armigera* conquistou ampla abrangência geográfica (ZALUCKI; FURLONG, 2005), e está presente e difundida na Ásia, África e Oceania; na Europa está estabelecida na Bulgária, Grécia, Portugal, Romênia e Espanha; em Chipre, França, Hungria e Itália sua ocorrência está restrita em algumas localidades (ZALUCKI et al., 1986; GUO, 1997) (para mais distribuição consultar CABI, 2016).

A ocorrência da praga no Continente Americano foi registrada no Brasil em 2013 (CZEPAK et al., 2013; TAY et al., 2013; SOSA-GÓMEZ et al., 2015), posteriormente no Paraguai e Uruguai em 2013 (ARNEMANN et al., 2016; CASTIGLIONI et al., 2016) e na Argentina e EUA em 2014 (MURÚA et al., 2014; SMITH, 2014).

### 2.1.4 Hospedeiros de *Helicoverpa armigera*

*Helicoverpa armigera* constitui uma espécie polífaga, e isso reflete na ampla gama taxonômica de plantas cultivadas e silvestres aceitáveis para oviposição de adultos e alimentação de lagartas. Assim, já foi relatada em mais de 100 espécies de plantas, incluindo as famílias Asteraceae, Fabaceae, Malvaceae, Poaceae e Solanaceae (ZALUCKI et al., 1986; FITT, 1989; ZALUCKI et al., 1994; POGUE, 2004; CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2014).

Para culturas agrícolas, os hospedeiros incluem o algodão (*Gossypium hirsutum* L.; Malvales: Malvaceae), caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walpers; Fabales: Fabaceae), guandu (*Cajanus cajan* [L.] Millspaugh; Fabales: Fabaceae), girassol (*Helianthus annuus* L.; Asterales: Asteraceae), grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.; Fabales: Fabaceae), milho (*Zea mays* L.; Poales: Poaceae), soja (*Glycine max* L.; Fabales: Fabaceae), sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench; Poales: Poaceae) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.; Solanales: Solanaceae). Outros hospedeiros

incluem alfafa (*Medicago sativa* L.; Fabales: Fabaceae), amendoim (*Arachis* spp.; Fabales: Fabaceae), batata (*Solanum tuberosum* L.; Solanales: Solanaceae), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* [L.] Merrill & Perry), ervilha (*Pisum sativum* L.; Fabales: Fabaceae), feijão (*Phaseolus* spp.; Fabales: Fabaceae), quiabo (*Abelmoschus esculentus* L. Moench; Malvales: Malvaceae), tabaco (*Nicotiana* spp.; Solanaes: Solanaceae), linho (*Linum usitatissimum* L.; Malpighiales: Linaceae), crisântemo (*Chrysanthemum* spp.; Asterales: Asteraceae), citros (*Citrus* spp.; Sapindales: Rutacea) e mais uma gama de vegetais, como pimenta, flores, árvores florestais e frutíferas (CHANDRA; RAI, 1974; BAI et al., 1997; GAHUKAR, 2002; KAKIMOTO; FUJISAKI; MIYATAKE, 2003; LIU et al., 2004; PAL et al., 2015) (para mais hospedeiros consultar CABI, 2016).

### **2.1.5 Aspectos biológicos de *Helicoverpa armigera***

*Helicoverpa armigera* tem desenvolvimento holometabólico, ou seja, compreende as fases de ovo, larva, pupa e adulto. Os adultos são mariposas com o corpo relativamente robusto medindo de 30 a 45 mm de envergadura e 14 a 18 mm de comprimento, com ampla área torácica e em seguida afinando. Na espécie ocorre acentuado dimorfismo sexual, sendo o macho com coloração cinza-esverdeado e a fêmea castanho-alaranjado. As margens das asas anteriores apresentam uma linha com sete a oito manchas, logo acima uma faixa transversal irregular mais clara, e na parte central da asa pequena mancha escura em forma de vírgula. As asas posteriores são mais claras, com borda marrom escura na extremidade apical (ÁVILA; VIVAN; TOMQUELSKI, 2013).

Mariposas de *H. armigera* apresentam atividade crepuscular, e durante o dia permanecem em repouso, abrigadas nas folhagens ou próximas ao solo; quando perturbadas voam aleatoriamente até encontrarem outro local de abrigo (HARDWICK, 1965). Quanto à longevidade, fêmeas apresentam em média 11,7 dias e os machos 9,2 dias (ALI; CHOUDHURY, 2009).

Apesar de *H. armigera* ser polífaga, a fêmea tem alta capacidade de seleção de hospedeiro para oviposição (CUNNINGHAM; ZALUCKI; WEST, 1999; JALLOW; MATSUMURA; SUZUKI, 2001). O início da oviposição pode ocorrer de dois a quatro

dias após a emergência, e geralmente ao entardecer (TAYLOR, 1982). Cada fêmea pode colocar mais de 1000 ovos de forma isolada, preferencialmente em folhas jovens, brotações terminais com superfícies pubescentes, flores, frutos e menos frequentemente em folhas desenvolvidas (FITT, 1989; IZQUIERDO, 1996; MENSAH, 1996).

Os ovos medem em média 0,5 mm de diâmetro e altura de 0,3 mm, com a parte apical lisa em torno da micrópila. O restante da superfície apresenta nervuras longitudinais grossas e nervuras transversais finas (ALI; CHOUDHURY, 2009; DOLINSKAYA, 2014). Geralmente os primeiros ovos são inférteis e de coloração inicial branco-amarelada, e após o terceiro dia tornam-se amarelados (NASREEN; MUSTAFA, 2000). Em temperaturas ideais o período de desenvolvimento embrionário ocorre em três dias, entretanto, pode chegar até 11 dias em baixas temperaturas (CABI/EPPO, 1992). Quando férteis, os ovos inicialmente apresentam coloração branco-amarelada e aspecto brilhante, no segundo dia apresenta uma faixa de cor castanho-escuro, e próximo à eclosão das lagartas os ovos ficam com coloração acinzentada (CZEPAK et al., 2013).

Após a eclosão, a coloração do corpo das lagartas pode variar de branco-amarelada a marrom-avermelhada e a cápsula cefálica de marrom-escuro a preto nos primeiros ínstar. À medida que as lagartas desenvolvem a coloração muda, variando de amarelo-palha a verde, e também ocorrem listras lateralmente no corpo de coloração marrom. Essa variação na coloração pode estar relacionada com o tipo de alimento utilizado pela lagarta (ALI; CHOUDHURY, 2009). A partir do quarto ínstar, as lagartas apresentam tubérculos abdominais escuros e bem visíveis na região dorsal do primeiro segmento abdominal, os quais são dispostos na forma de semicírculo, aparentando um formato de sela (ÁVILA; VIVAN; TOMQUELSKI, 2013). No último ínstar as lagartas podem medir de 30 a 40 mm de comprimento. Essas características somadas à cápsula cefálica de cor parda clara, linhas finas brancas laterais e a presença de pelos são características inerentes a *H. armigera* (MATTHEWS, 1992). Outras características perceptíveis nas lagartas para diferenciação da espécie estão relacionadas com a textura do tegumento do corpo, onde em *H. armigera* apresenta aspecto levemente coriáceo, o que a difere das demais espécies de Heliothinae que ocorrem no Brasil. Além disso, quando tocada

apresenta comportamento de encurvar a cabeça em direção à região ventral próximo ao primeiro par de falsas pernas (CZEPAK et al., 2013).

As plantas hospedeiras de *H. armigera* variam nutricionalmente e têm efeito sobre seu desenvolvimento, afetando assim a dinâmica populacional da praga com reflexo no número de gerações no ano (RUAN; WU, 2001; SCHELLHORN et al., 2008). Dessa forma, pode ocorrer variação no período larval (14 a 21 dias) e no número de ínstaes larvais (cinco a sete). Outro fator que pode interferir no desenvolvimento de *H. armigera* está relacionado com as condições climáticas (CABI/EPPO, 1992).

No final da fase larval, as lagartas de *H. armigera* passam por um período de tempo denominado pré-pupa: inicialmente as lagartas cessam a alimentação, eliminam os últimos excrementos fecais de coloração avermelhada e posteriormente procuram um local para confecção da câmara pupal, onde iniciam o processo de transformação de lagarta para pupa. O estágio pupal tem duração de 11 a 14 dias e ocorre no solo; dependendo das condições climáticas, pode entrar em diapausa como forma de garantir sua sobrevivência (KARIM, 2000). No início, a pupa apresenta coloração verde-clara, passando para marrom-mogno com a esclerotização do tegumento. Seu comprimento varia de 14 a 18 mm, apresenta o formato fusiforme do tipo obtecta, com superfície lisa e arredondada na região anterior e na região posterior se observa dois espinhos paralelos afinados (ALI; CHOUDHURY, 2009).

#### **2.1.6 Danos e prejuízos em cultivos por *Helicoverpa armigera***

A grande importância de *H. armigera* aos cultivos agrícolas está relacionada, principalmente, em decorrência do inseto na fase larval se alimentar preferencialmente por estruturas reprodutivas das plantas, como inflorescências, frutos, espigas e sementes, causando deformação, podridão ou queda da estrutura reprodutiva. Em todo o mundo, chegam a US\$ 5 bilhões de dólares os custos anuais com controle e perdas de produção em função da lagarta *H. armigera* (LAMMERS; MACLEOD, 2007).



Nas regiões semiáridas, a perda de rendimento nas culturas chega a US\$ 2 bilhões de dólares anuais e US\$ 530 milhões são gastos com inseticidas aplicados para o controle da praga (SHARMA; STEVENSON; GOWDA, 2005). Na Austrália, espécies do gênero *Helicoverpa* são consideradas pragas mais prejudiciais aos principais cultivos; na cultura do algodão o custo total com controle e perda de produção atingia a US\$ 324 milhões ao ano antes do advento da transgenia (ADAMSON; DAVIS, 1997). Na Índia, *H. armigera* ocorre como principal praga em muitas culturas economicamente importantes, incluindo algodão, grão-de-bico, tomate e quiabo, ocasionando prejuízos no valor de US\$1 bilhão anuais (SUBRAMANIAN; MOHANKUMAR, 2006). Na Espanha, *H. armigera* também é considerada espécie devastadora nos cultivos de tomate industrial (ARNÓ et al., 1999).

No Brasil, na safra 2011/2012 foi registrado um surto de *H. armigera* na região oeste da Bahia, em culturas convencionais e transgênicas de soja, milho e especialmente do algodoeiro, quando foram constatadas perdas de até 80% da produção. Posteriormente, na safra de 2012/2013, foram observadas incidências de *H. armigera* nos cultivos de soja irrigada, algodão e feijão, o que gerou prejuízos de US\$ 78 dólares por hectare, além da necessidade de aplicações extras de inseticidas para o seu controle (ÁVILA; VIVAN; TOMQUELSKI, 2013).

### **2.1.7 Estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera***

A produção agrícola desempenha papel importante, pois representa a base do fornecimento de alimento para alimentação humana e animal, além de proporcionar o desenvolvimento econômico em muitos países. Qualquer crise que ocasione a diminuição da produção agrícola pode afetar o abastecimento de alimento no mundo, ocasionando falta de produtos agrícolas, aumento de preços, e em países em desenvolvimento pode levar muitas pessoas a passar fome por falta de acesso ao alimento (CERVANTES-GODOY; DEWBRE, 2010).

Nas atividades agrícolas, as pragas e doenças das culturas são consideradas os principais fatores bióticos que contribuem para a diminuição da produção de alimento (OERKE, 2006). Nesse sentido, o Manejo Integrado de Pragas representa

um componente chave para a manutenção de um sistema agrícola equilibrado e capaz de satisfazer as necessidades de produção de alimento de um país, sem ocasionar indevidamente prejuízos à base de um ecossistema (HOKKANEN, 2015).

O conceito de MIP gradualmente ganhou aceitação e foi adotado ao longo das últimas décadas em muitos cultivos agrícolas como uma abordagem de controle de pragas mais ecológico, apropriada para a produção sustentável de alimento. Entretanto, contrapondo com o sistema agrícola que adota os preceitos do MIP, na maioria dos cultivos ainda prevalece o sistema altamente desequilibrado, que tem propiciado o fornecimento contínuo de alimento para as pragas e contribuindo para a proliferação desses insetos (LANDIS; WRATTEN; GURR, 2000). Assim, casos de níveis populacionais elevados de pragas têm ocorrido, e que superam a capacidade de atuação dos agrotóxicos, o que desencadeia a ineficácia dos produtos utilizados para seu controle e a seleção de insetos resistentes aos principais grupos de inseticidas (BASS et al., 2015).

O advento da transgenia, como tática de controle de pragas, inicialmente propiciou a diminuição da ocorrência de pragas e a utilização de agrotóxicos; entretanto, seu uso como ferramenta de controle de pragas foi indevidamente empregada, o que gerou, em muitos casos, o desenvolvimento de resistência às proteínas inseticidas presentes nas plantas (TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013). Práticas de MIP têm sido desenvolvidas de várias maneiras e de acordo com características socioeconômicas e ambientais de cada país. Investigações sobre manejo de insetos em cultivos agrícolas resultou no desenvolvimento de tecnologias de MIP viáveis para produção agrícola (BARZMAN et al., 2015).

Em decorrência de *H. armigera* apresentar ampla distribuição geográfica, polifagia e grande capacidade de dispersão, as estratégias a serem utilizadas devem abranger grandes áreas para atingir melhor eficácia no controle do inseto. A época de plantio representa uma das principais táticas de controle cultural que compõe o MIP, e recomenda efetuar a semeadura das culturas agrícolas no menor espaço de tempo possível, o que permite a definição de um período de vazio sanitário comum para todas as culturas, reduzindo a disponibilidade contínua de alimento ao inseto (ÁVILA; VIVAN; TOMQUELSKI, 2013).

A resistência de plantas é reconhecida como uma ferramenta bastante eficaz como tática no MIP (BOIÇA JÚNIOR et al., 2015), e em alguns casos pode substituir o uso de inseticidas (FATHIPOUR; SEDARATIAN, 2013). As plantas hospedeiras de *H. armigera* variam na composição morfológica, física, nutricional e na presença de compostos secundários, e essa variação pode interferir no desenvolvimento e na dinâmica populacional do inseto (RUAN; WU, 2001; MAO et al., 2007; CELORIO-MANCERA et al., 2011; JAGTAP; ACHARYA; PATEL, 2012; RAZMJOU; NASERI; HEMATI, 2014).

Outra tática utilizada no controle de insetos pragas é o uso de plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillales: Bacillaceae) (BAKSH et al., 2015) ou interferem no RNA (RNAi e microRNA) (XIONG et al., 2013; AGRAWAL et al., 2015). Vários estudos relatam a eficácia de plantas transgênicas de tabaco (FAN et al., 1999), algodão (WU et al., 2008; MAHON; DOWNES; JAMES, 2012), tomate (MANDAOKAR et al., 2012; KOUL et al., 2014), guandu (RAMU et al., 2011) e soja (DOURADO et al., 2016) no controle de *H. armigera*. No entanto, para que não ocorra rápida evolução de resistência do inseto as plantas transgênicas (AKHURST et al., 2003; DOWNES; PARKER; MAHON, 2010), e conseqüentemente redução da vida útil dessa tecnologia, é imprescindível o manejo da resistência com a utilização de áreas de refúgios nas porcentagens recomendadas nas unidades de produção agrícola (JIN et al., 2015; DOWNES et al., 2016).

O monitoramento é considerado o fator chave para a implementação das estratégias de manejo e *H. armigera* (ÁVILA; VIVAN; TOMQUELSKI, 2013; RAHMAN et al., 2016). Por meio do conhecimento das informações referentes à dinâmica populacional da praga é que as tomadas de decisões ou as táticas de controle serão executadas, como por exemplo, o momento certo para utilizar a tática de controle com o uso de inimigos naturais (SEDARATIAN; FATHIPOUR; TALAEI-HASSANLOUI, 2014; QAYYUM et al., 2015) ou inseticidas (CARNEIRO et al., 2014).

## **2.2 Nutrição de insetos**

### **2.2.1 Exigências nutricionais em insetos**

A compreensão da ecologia de insetos tem sido dificultada pelo inadequado conhecimento da fisiologia nutricional, pois muitos aspectos de sua biologia, incluindo características comportamentais, fisiológicas, morfológicas e ecológicas estão inseridos em um contexto nutricional (SCRIBER; SLANSKY JR, 1981). Este fato evidencia a importância da alimentação equilibrada para os insetos, de modo que os valores qualitativos e quantitativos que compõem o alimento consumido podem afetar o peso corpóreo, o tempo de desenvolvimento, a sobrevivência na fase pré-imaginal, com reflexo também na fase adulta, influenciando a capacidade de voo, a competição intraespecífica, sobrevivência, e, sobretudo, as funções reprodutivas como a fecundidade e a fertilidade (SCHOWALTER, 2011; PARRA; PANIZZI; HADDAD, 2012).

O entendimento sobre a nutrição de insetos assume importância em virtude da necessidade crescente da produção em larga escala para as mais diversas finalidades (COHEN, 2015). As exigências nutricionais dos insetos são determinadas em estudos com dietas artificiais, onde se conhece os valores qualitativos e quantitativos de cada componente, diferentemente do uso de plantas, uma vez que nestas ocorre variação na composição nutricional, além da presença de compostos químicos que poderia influenciar nas observações (PARRA; PANIZZI; HADDAD, 2012).

Para atender às necessidades nutricionais da maioria dos insetos, o alimento ideal deve conter os seguintes elementos: aminoácidos essenciais (arginina, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptofano e valina), carboidratos, colesterol, ácidos graxos, ácidos nucleicos, vitaminas (ácido ascórbico, biotina, colina, ácido fólico, inositol, ácido nicotínico, ácido pantotênico, piridoxina, riboflavina, tiamina) e sais minerais (HOUSE, 1969). Esses nutrientes devem ser adequadamente balanceados, especialmente na relação proteína: carboidrato, pois são nutrientes essenciais para o desenvolvimento, sobrevivência e

reprodução dos animais (DADD, 1985; BEHMER, 2009; SIMPSON; RAUBENHEIMER, 2012).

Os aminoácidos são requeridos para a produção de proteínas estruturais e enzimas. Normalmente, estão presentes na dieta como proteínas e são essenciais para insetos em desenvolvimento (HOUSE, 1969). Do ponto de vista nutricional, os lipídios são importantes para as formas jovens de várias espécies de insetos (DADD, 1985). Os insetos podem produzi-los a partir de proteínas e carboidratos, entretanto, alguns ácidos graxos não são sintetizados pelos insetos, como o ácido linoleico e linolênico (PARRA; PANIZZI; HADDAD, 2012; COHEN, 2015).

Os carboidratos (açúcares) são necessários para o desenvolvimento dos insetos, e sua principal função metabólica está relacionada com o suprimento de energia e fonte de carbono (REINECKE, 1985). Também estão envolvidos na função estrutural da síntese de quitina, podem ser convertidos em gorduras como reservas nutricionais e contribuir para a produção de aminoácidos (HOUSE, 1969). Geralmente, em dietas artificiais são adicionados carboidratos para atuar como fagoestimulantes (PARRA; PANIZZI; HADDAD, 2012). Os insetos fitófagos na fase pré-imaginal necessitam de algum tipo de carboidrato, e sua deficiência causa baixa vitalidade (REINECKE, 1985).

As vitaminas são substâncias orgânicas que atuam nos processos metabólicos fornecendo componentes estruturais de enzimas e também atuando como catalisadores nos processo celulares. São necessárias em pequenas quantidades nas dietas, uma vez que não podem ser sintetizadas pelos insetos (PARRA, 2012).

Os sais minerais são compostos inorgânicos que promovem o balanceamento iônico e a permeabilidade da membrana dos insetos (COHEN, 2015).

Na elaboração de uma dieta artificial, a água é de fundamental importância e deve ser incorporada à dieta para atender às necessidades dos insetos, pois a maioria dos insetos terrestres contém cerca de 70% de água no corpo (COHEN, 2015).

A nutrição de insetos holometabólicos adultos é pouco conhecida. De modo geral, para lepidópteros considera-se que água e carboidrato, em concentrações variáveis, são suficientes para o desempenho reprodutivo. Parra (2012) recomenda

o fornecimento de uma solução contendo água e 10% de mel para a manutenção de adultos longevos e fecundos em criações massais em laboratório.

### **2.2.2 Dietas artificiais**

Dietas artificiais para insetos são como ferramentas cada vez melhores para manipulá-los e beneficiar o homem e o meio ambiente (COHEN, 2015). Dietas são os alimentos disponibilizados aos insetos em criações massais em substituição ao alimento utilizado na natureza (VANDERZANT, 1966). As dietas artificiais estão sendo desenvolvidas devido à necessidade de produção de insetos em larga escala visando estudos nas mais diversas áreas do conhecimento em Entomologia e na implementação de MIP (KNIPLING, 1966; COHEN, 2015).

Para a dieta artificial ser considerada ideal para criação massal de insetos, ela deve atender às exigências nutricionais, propiciar ótimo desenvolvimento na fase pré-imaginal com sobrevivência superior a 75%, promover a produção de adultos com alta capacidade reprodutiva, manter o vigor do inseto ao longo de gerações, e na medida do possível ser de baixo custo, com ingredientes disponíveis no mercado, de fácil preparo, preferencialmente favorecer o desenvolvimento de várias espécies de insetos e manter as características iniciais no período de armazenamento (PARRA, 2012).

As fontes de proteínas contendo os aminoácidos essenciais normalmente utilizadas para a composição de dietas são encontradas no feijão, soja, caseína e germe de trigo, e apresentam papel fundamental nos processos metabólicos dos insetos, sendo limitantes para o seu desenvolvimento (VANDERZANT, 1974). Em termos qualitativos, a mistura vitamínica de Vanderzant atende às exigências requeridas pelos insetos (SCRIBER; SLANSKY JR., 1981). Como fonte de lipídios utiliza-se óleo de germe de trigo ou colesterol, e a sacarose como fonte de carboidratos (SINGH, 1985). Outros ingredientes que compõem as dietas artificiais são agentes gelificantes (ágar, alginatos e gelatina), preservativos contra agentes contaminantes, fungicidas, antioxidantes, sais minerais, antibióticos e água (COHEN, 2015).

### 2.2.3 Dietas artificiais para *Helicoverpa armigera*

A escolha de uma dieta artificial que permita a criação de insetos em laboratório e que forneça as necessidades nutricionais para o seu adequado desenvolvimento representa um dos principais requisitos para o sucesso na criação (PARRA; PANIZZI; HADDAD, 2012). Quando não está disponível uma dieta artificial específica para o inseto-alvo, recomenda-se a utilização de dietas elaboradas para espécies com características similares de alimentação ou taxonomicamente relacionadas (COHEN, 2015).

Para a criação de *H. armigera*, estudos têm sido dirigidos ao desenvolvimento de uma dieta artificial econômica ou com adição de novos componentes. Abbasi et al. (2007) avaliaram o desenvolvimento de *H. armigera* em dieta artificial com a substituição do ágar por fécula de mandioca com o objetivo de diminuir o custo na elaboração da dieta, e verificaram que a dieta à base de fécula de mandioca manteve o desenvolvimento de *H. armigera* semelhante à da dieta com ágar. Hamed e Nadeem (2008) avaliaram dietas artificiais preparadas com a alteração de ingredientes básicos, incluindo a farinha de grão-de-bico, feijão-mungo, soja, trigo, milho, semente de algodão e castanha-d'água, e concluíram que a farinha de grão-de-bico agregada à dieta artificial foi o ingrediente básico mais adequado à alimentação de *H. armigera*. Outra causa limitante à utilização de novas dietas artificiais refere-se à dificuldade para obtenção ou falta de especificações de alguns dos seus componentes (KRISHNAREDDY; HANUR, 2015). No entanto, várias divergências são observadas quanto ao desempenho de *H. armigera* em algumas dietas disponíveis (AHMED; KHALIQUE; MALIK, 1998; WU; GONG, 1997).

## 2.3 Criação de insetos em laboratório

Definir e estabelecer uma metodologia de criação massal em laboratório têm sido uns dos grandes desafios em trabalhos científicos que envolvem criação de insetos em ambientes controlados, principalmente pela grande diversidade e particularidades das espécies (COHEN, 2015). Como parte dos esforços para desenvolver uma metodologia apropriada para o inseto-alvo destaca-se a

adequação do alimento oferecido ao inseto, pois é primordial fornecer uma alimentação nutricionalmente equilibrada para os insetos, de forma que ocorra o mínimo custo adaptativo (SIMPSON et al., 2004).

A temperatura tem influência relevante na criação de insetos, de tal forma que pode inibir ou favorecer o desenvolvimento dos mesmos (GILBERT; RAWORTH, 1996). Um estudo visando esclarecer o papel que a variação de temperatura no desempenho de *H. armigera* em laboratório verificou que o seu desenvolvimento ocorre no intervalo de temperatura constante de 17,5°C a 32,5°C. Entretanto, ocorrem prejuízos no seu desenvolvimento e sobrevivência nas temperaturas mais extremas (MIRONIDIS, 2014). Os melhores valores de desenvolvimento e reprodução de *H. armigera* foram obtidos em condições controladas de temperatura de 25 a 27,5 °C (BARTEKOVA; PRASLICKA, 2006; MIRONIDIS, 2014).

Outros fatores importantes para o sucesso nas criações de insetos estão relacionados à escolha de recipientes utilizados na criação na fase pré-imaginal e adulta, à determinação das condições estruturais ideais e à capacitação técnica de pessoal para todas as etapas que envolva a produção massal de inseto (PARRA, 2012).

As condições inadequadas de higiene comprometem a qualidade do inseto produzido (GRENIER, 2012). Os equipamentos, utensílios ou local onde são produzidas as dietas artificiais, bem como se as salas de criação e ingredientes estiverem contaminados pode favorecer o desenvolvimento de fungos e bactérias nas dietas, e com isso acarretar na perda da unidade de produção (MALDONADO; POLANÍA, 2010). Outro problema referente à sanidade em criações massais está relacionado com a ocorrência de doenças nos insetos, causadas por diversos patógenos, como protozoários, vírus, bactérias e fungos, durante os estágios do ciclo de vida do inseto (GREENBERG, 1970; EILENBERG et al., 2015).

Para evitar mudanças fenotípicas e genotípicas em insetos de criações massais quando criados por longo período de tempo (SØRENSEN; ADDISON; TERBLANCHE, 2012), Van Lenteren (1986) preconiza iniciar a criação com um número grande de insetos, formando várias linhagens separadas e ao longo do tempo promover o cruzamento controlado dessas.



Cohen (2015) salienta que o refinamento das técnicas de criação de insetos, com agregação de novas tecnologias, tem possibilitado a expansão e evolução dos programas de Manejo Integrado de Pragas em nível mundial, por meio de programas de Controle Biológico com o uso de insetos predadores, parasitoides, agentes microbianos e insetos estéreis.

## **2.4 Métodos de avaliação**

### **2.4.1 Abordagem biométrica**

De acordo com Parra (2012), para avaliar os efeitos no desenvolvimento de insetos, a abordagem biométrica consiste em mensurar os parâmetros biológicos da espécie-alvo. No caso específico de lepidópteros, podem ser avaliados os parâmetros nas fases de desenvolvimento, isto é, ovo, larva, pupa e adulto. Na fase de ovo são observados o período de desenvolvimento embrionário e a viabilidade. Na fase larval, os insetos são muito sensíveis à alimentação disponibilizada, e dependendo do alimento, pode interferir no número de ínstars (determinado pela medição diária da largura da cápsula cefálica), na duração do período larval, na sobrevivência e na ocorrência de alterações morfológicas. Para pupas, avalia-se a duração do período pupal, peso de pupas em data específica, sobrevivência pupal, deformações e razão sexual. Neste caso utiliza-se a fórmula:

$$RS = N^{\circ}F / (N^{\circ}F + N^{\circ}M)$$

Sendo N<sup>o</sup>F o número fêmeas e N<sup>o</sup>M o número de machos gerados em dietas avaliadas (SILVEIRA NETO et al., 1976).

Na fase adulta avalia-se o período de pré-oviposição, número de acasalamentos, número diário e total de ovos por fêmea, longevidade e deformações (PARRA, 2012).

### 2.4.2 Abordagem nutricional quantitativa

A abordagem nutricional quantitativa consiste em medir a quantidade de alimento consumido, digerido, assimilado, excretado, metabolizado e convertido em biomassa. A análise dessas medições revela como os insetos respondem a diferentes alimentos e quais os componentes alimentares que exercem os maiores efeitos sobre seu crescimento (SCRIBER; SLANSKY JR., 1981).

O estudo da nutrição quantitativa apresenta aplicabilidade em diversas áreas de estudos comportamentais de insetos, levando em conta que as medidas de consumo e utilização do alimento estão interligadas com a fisiologia alimentar e com o comportamento de seleção de plantas hospedeiras, assim pode-se adotar a abordagem nutricional quantitativa nas áreas de resistência de plantas a insetos (KOUHI; NASERI; GOLIZADEH, 2014), em observações em relação alimento/inseto/inimigo natural (THOMPSON; REDAK; WANG, 2005; ROSSI; SALVADOR; CÔNSOLI, 2014) e no controle biológico (PARRA, 2012).

Os índices nutricionais para medir o consumo e utilização de alimentos por insetos fitófagos foram padronizados por Waldbauer (1968), e posteriormente realizadas algumas alterações por Kogan e Cope (1974) e Scriber e Slansky Jr. (1981) passaram a ser utilizadas em estudos nutricionais (PARRA, 2012). Os índices nutricionais:

Taxa de consumo relativo (RCR) representa a quantidade de alimento ingerido por miligrama de peso corpóreo do inseto por dia e é expressa em mg/mg/dia:

$$RCR = I / (\bar{B} \cdot T)$$

Taxa metabólica relativa (RMR) indica a quantidade de alimento gasto em metabolismo por miligrama de peso corpóreo por dia (mg/mg/dia):

$$RMR = M / (\bar{B} \cdot T)$$

Taxa de crescimento relativo (RGR) equivale o ganho de massa pelo inseto em relação ao seu peso (mg/mg/dia):

$$RGR = B / (\bar{B} \cdot T)$$

Eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) expressa a porcentagem de alimento ingerido transformado em biomassa (%):

$$ECI = (B / I) \cdot 100$$

Eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) representa a porcentagem de conversão do alimento digerido em biomassa (%):

$$ECD = [B / (I-F)] \cdot 100$$

Digestibilidade aproximada (AD) representa a porcentagem de alimento ingerido que é efetivamente assimilado pelo inseto (%):

$$AD = [(I-F) / I] \cdot 100$$

Custo metabólico (MC) representa a porcentagem do alimento metabolizado em energia para manutenção dos processos vitais (%):

$$MC = 100 - [B / (I - F) \cdot 100]$$

Índice de consumo (CI) representa a relação entre o peso do alimento ingerido e o peso médio corpóreo do inseto (mg/mg):

$$CI = I / \bar{B}$$

Nos quais:

I = peso do alimento ingerido (mg) durante T;

B = ganho de peso pelas lagartas (mg) durante T;

$\bar{B}$  = peso médio das lagartas (mg) durante T;

T = duração do período de alimentação (dias);

M = alimento metabolizado durante o período de alimentação  $M = (I - F) - B$ ;

F = peso de alimento não digerido e excreção (mg) durante T;

$(I - F)$  = alimento assimilado (mg) durante T.

### 2.4.3 Abordagem demográfica

As tabelas de vida de fertilidade são indicadas para a compreensão da dinâmica populacional de uma espécie, e fazem parte de um processo para estimar os parâmetros relacionados ao potencial de crescimento populacional, também denominado parâmetros demográficos (MAIA; LUIZ; CAMPANHOLA, 2000). Essas tabelas servem para condensar os dados essenciais de desenvolvimento, sobrevivência e fertilidade de uma população em estudo (SILVEIRA NETO et al., 1976).

Silveira Neto et al. (1976) esclarecem que nas tabelas de vida de fertilidade são registrados dados de insetos adultos para determinar a fertilidade, e esses registros são efetuados com número fixo de casais. Nas colunas das tabelas são inseridos dados referentes ao intervalo de idade no qual foi tomada a amostra ( $x$ ), idade esta considerada desde a fase de ovo; número de descendentes fêmeas gerados por cada fêmea ( $m_x$ ); neste caso, como se considera somente fêmeas, a razão sexual deve ser computada; taxa de sobrevivência na idade  $x$  ( $l_x$ ).

Tendo elaborado a tabela de vida de fertilidade, são estimados os parâmetros de desenvolvimento, segundo Maia, Luiz e Campanhola (2000):

Taxa líquida de reprodução ( $R_0$ ), ou seja, uma estimativa do número esperado de descendentes fêmeas produzidas por cada fêmea, durante a vida útil:

$$R_0 = \sum (l_x \cdot m_x)$$

Tempo de geração ( $T$ ) representa o intervalo de tempo entre cada geração:

$$T = \sum (l_x \cdot m_x \cdot x) / \sum (l_x \cdot m_x)$$

Taxa intrínseca de crescimento ( $r_m$ ) está relacionada com a velocidade de crescimento da população por unidade de tempo:

$$r_m = \log_e R_0 / T = \ln (R_0) / T$$

Taxa finita de aumento ( $\lambda$ ) é o número de fêmeas adicionadas à população por fêmea por unidade de tempo:

$$\lambda = e^{r_m}$$

Tempo de duplicação (Dt) é o tempo necessário para o inseto duplicar a população inicial:

$$Dt = \ln (2) / r_m$$

#### **2.4.4 Abordagem bem-estar animal**

O bem-estar está relacionado com as condições estruturais oferecidas ao animal e se estas são suficientes para garantir a adaptação, e se atende às necessidades básicas ao seu desenvolvimento conforme sua natureza. Está inserido em uma área de conhecimento interdisciplinar, e se refere ao estado físico e psicológico de um indivíduo em relação ao meio em que vive (BROOM, 1991; KEELING; RUSHEN; DUNCAN, 2011).

A abordagem do bem-estar animal é cada vez mais reconhecida como um componente importante de assegurar a qualidade dos produtos de origem animal e vegetal que são oferecidos nas relações comerciais, para consumidores conscientes sobre a importância da sustentabilidade ambiental e do bem-estar animal (BAYVEL, 1993).

A publicação do livro *Animal Liberation* em 1975 por Singer foi o marco histórico, onde teve início debates em relação à legitimidade científica e à moral da experimentação animal (PAIXÃO; SCHRAMM, 1999). Segundo Feijó (2006), no nível atual das investigações sobre a utilização de animais em estudos básicos e em experimentação científica emerge a necessidade de se esclarecer a importância e função da bioética. Uma das primeiras estratégias de avaliação do bem-estar em animais confinados foi o conceito das cinco liberdades (BRAMBELL, 1965), que por meio de observação permitiu avaliar quantitativamente os aspectos físicos, mentais e naturais do bem-estar. Segundo as cinco liberdades, os animais devem ser livres de medo e estresse, livres de fome e sede, livres de desconforto, livres de dor e doenças e ter a liberdade para expressar seu comportamento natural (BRAMBELL, 1965; ERENS et al., 2012; McCULLOCH, 2013).

Horvath et al. (2013) comentam que embora os invertebrados constituem a maioria das espécies, seu bem-estar é negligenciado quando comparado aos vertebrados, e comprovado pela quase ausência de regulamentos em investigação

animal. Essa limitada preocupação muitas vezes é justificada por suposições de que os invertebrados não experimentam dor ou estresse pela falta de capacidade de funções cognitivas de ordem superior (ERENS et al., 2012). Entretanto, estudos recentes sugerem que algumas espécies de invertebrados exibem capacidades cognitivas comparáveis aos de vertebrados, e são capazes de experimentar dor e estresse (ROEDER, 2005; ADAMO; BAKER, 2011).

Em criações de insetos, ainda existem lacunas na adoção do conceito de bem-estar, principalmente referentes às limitadas informações científicas sobre os métodos de criação que agregam o bem-estar de insetos (DeGOEDE et al. 2013). No entanto, o conceito de bem-estar em inseto está cada vez mais sendo abordado em laboratório (SMITH, 1991) e no domínio de criações de insetos para alimentação animal e humana (ERENS et al., 2012).

Entre os benefícios que podem ser obtidos em seguir o modelo das cinco liberdades, em criações de insetos em laboratório, destaca-se a minimização do estresse, e conseqüentemente a obtenção de resultados de investigações mais confiáveis (ADAMO, 2010). Even, Devaud e Barron (2012) relatam que o estresse representa as respostas a qualquer tratamento adverso ou prejudicial em um sistema específico, e pode ter impactos negativos na alimentação, ganho de peso, reprodução e na função imunológica dos insetos (ADAMO; BAKER, 2011; KHOURY; MYERSCOUGH; BARRON, 2011).

#### **2.4.5 Elaboração de protocolo para criação de *Helicoverpa armigera* que atenda o bem-estar animal**

Criação massal de insetos tem como objetivo principal produzir o número máximo de insetos qualitativamente aceitáveis para utilização em diversos fins, com praticidade, espaço reduzido e custos baixos. A abordagem do bem-estar animal neste contexto também deve ser considerada. Assim, todas essas variáveis devem ser consideradas ao estabelecer um protocolo de criação massal.

Até o momento não há conhecimento estruturado, apoiado em pesquisas científicas, sobre como os insetos devem ser criados em condições que estejam de acordo com seu bem-estar (ERENS et al., 2012). Entretanto, a avaliação de

parâmetros biológicos em insetos em regime de confinamento submetidos a diferentes condições de alimentação, ambiental e estrutural pode sugerir a melhor forma de criação. Para *H. armigera* as técnicas de criação empregadas nas fases de desenvolvimento do inseto podem estar em consonância com a abordagem do bem-estar animal.

Na elaboração de um protocolo para criação de *H. armigera*, os padrões a serem aspirados em relação às condições de produção dos insetos devem estar alicerçados nas cinco liberdades de Brambell. Desta forma, os itens a serem contemplados são:

A liberdade de fome e sede: Para *H. armigera*, bem como para os insetos em geral, o alimento representa um fator importante para a produção do conjunto de sua história de vida (SCHOWALTER, 2011). Assim, o alimento a ser fornecido aos insetos deve atender as suas exigências nutricionais.

A polifagia de *H. armigera* sugere sua capacidade de se desenvolver em diferentes condições nutricionais (RUAN; WU, 2001; HEMATIA et al., 2011). Entretanto, o fornecimento de material vegetal “in natura” em criação massal torna-se inviável, em decorrência da necessidade de cultivo, aumento de mão de obra, maior ocorrência de doenças devido à dificuldade de descontaminação e pela variação qualitativa do alimento (PARRA; PANIZZI; HADDAD, 2012). Desta forma, em criação massal, o fornecimento de dieta artificial como forma de alimento ao inseto, em substituição ao material vegetal, torna-se a alternativa mais adequada (VANDERZANT, 1966).

As exigências nutricionais de *H. armigera* ainda não estão estabelecidas e a escolha ou elaboração de uma dieta artificial ideal que atenda suas necessidades nutricionais encontra-se limitada. Entretanto, existem alguns componentes dietéticos que devem fazer parte da dieta, como carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, minerais, vitaminas e água. A escolha da dieta ainda é um processo de tentativa e erro. Ao comparar diferentes tipos de dietas pode-se escolher a dieta que propiciou para a espécie-alvo o menor tempo de desenvolvimento na fase pré-imaginal, maior aproveitamento do alimento, alta produtividade reprodutiva e crescimento populacional rápido.

A liberdade de desconforto e a liberdade de expressar o comportamento normal: A ausência de desconforto em animais está relacionada à liberdade de expressar o comportamento natural (ERENS et al., 2012). No caso dos insetos é necessário ter uma compreensão dos aspectos relativos ao comportamento natural da espécie-alvo para melhor adequação do ambiente de confinamento. Para *H. armigera* o seu comportamento natural sugere, principalmente, a não tolerância a determinados níveis de densidade na fase pré-imaginal. Desta forma, o entendimento do comportamento do inseto possibilita o desenvolvimento de técnicas de criação onde não ocorra desconforto para o inseto confinado.

A liberdade de dor, lesões e doenças: Em criação em larga escala a sanidade da unidade de produção representa outra variável que interfere no bem-estar do inseto, onde em condições inadequadas de higiene pode ocasionar doenças nos insetos, causadas por diversos patógenos, como protozoários, vírus, bactérias e fungos, durante os estágios do ciclo de vida do inseto (EILENBERG et al., 2015). A ocorrência de lesões em *H. armigera* está muito relacionada quando larvas e adultos são confinados em alta densidade. Quanto à dor em insetos, mais estudos são necessários para melhor entendimento, entretanto alterações fisiológicas e comportamentais podem indicar algum tipo de desconforto.

A liberdade de medo e angústia: Para os insetos confinados a liberdade de medo e angústia pode estar associada com a ocorrência de estresse na criação. Alguns fatores, como a alta densidade e constante interferência na criação de *H. armigera* podem produzir algum estresse e assim interferir em seu comportamento e desenvolvimento.

As condições ambientais de temperatura, umidade e fotoperíodo também são fatores importantes a ser considerados no bem-estar animal. Em *H. armigera* as condições ambientais ideais favorece o desenvolvimento e em condições desfavoráveis podem induzir a estresse, desconforto e canibalismo (MIRONIDIS, 2014).

Neste estudo, adotou-se como hipótese de bem-estar para *H. armigera* como sendo a capacidade do inseto de expressar as atividades biológicas naturais que formam a sua história de vida, garantindo assim a perpetuação da espécie. E para garantir o bem-estar ao inseto teve como premissa o fornecimento de:



- 1 – Condições ambientais adequadas à espécie;
- 2 – Fornecimento de alimento com qualidade e quantidade;
- 3 – Manejo e práticas estruturais que promovam o comportamento natural do inseto.

### 3 Referências

ABBASI, B. H.; AHMED, K.; KHALIQUE, F.; AYUB, N.; LIU, H. J.; KAZMI, S. A. R.; AFTAB, M. N. Rearing the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, on a tapioca-based artificial diet. **Journal of Insect Science**, Annapolis, v. 7, p. 1-7, 2007.

ADAMO, S. A. Why should an immune response activate the stress response?. Insights from the insects (the cricket *Gryllus texensis*). **Brain, Behavior, and Immunity**, Amsterdam, v. 24, p. 194-200, 2010.

ADAMO, S. A.; BAKER, J. L. Conserved features of chronic stress across phyla: the effects of long-term stress on behavior and the concentration of the neurohormone octopamine in the cricket, *Gryllus texensis*. **Hormones and Behavior**, New York, v. 60, p. 478-483, 2011.

ADAMSON, D.; DAVIS, E. **An economic estimate of *Helicoverpa's* effect on Australian agricultural production**. Brisbane: Cooperative Research Centre for Tropical Pest Management, 1997. 28p. (CRC for Tropical Pest Management. Technical Report).

AGRAWAL, A.; RAJAMANI, V.; REDDY, V. S.; MUKHERJEE, S. K.; BHATNAGAR, R. K. Transgenic plants over-expressing insect-specific microRNA acquire insecticidal activity against *Helicoverpa armigera*: an alternative to Bt-toxin technology. **Transgenic Research**, London, v. 24, p. 791-801, 2015.

AHMED, K.; KHALIQUE, F.; MALIK, B. A. Modified artificial dieta for mass rearing of chickpea pod borer, *Helicoverpa (Heliothis) armigera* (Hübner). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Dubai, v. 1, p. 183-187, 1998.

AKHURST, R. J.; JAMES, W. J.; BIRD, L. J.; BEARD, C. Resistance to the Cry1Ac  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, p. 1290-1299, 2003.

ALI, A.; CHOUDHURY, R. A. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. **Tunisian Journal of Plant Protection**, Tunes, v. 4, p. 99-106, 2009.

ARNEMANN, J. A.; JAMES, W. J.; WALSH, T. K.; GUEDES, J. V. C.; SMAGGHE, G.; CASTIGLIONI, E.; TAY, W. T. Mitochondrial DNA COI characterization of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Paraguay and Uruguay. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 2, 2016.

ARNÓ, J.; GABARRA, R.; ROIG, J.; FOSCH, T. Integrated pest management for processing tomatoes in the Ebro Delta (Spain). **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 487, p. 207-212, 1999.

ÁVILA, C. J.; VIVAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. **Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013. 12p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Circular Técnica, 23).

BAI, L-X; SUN, H-W; SUN, Y-W; SU, C-E. The host plants of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) and their fitness (In Chinese). **Acta Phytolactica Sinica**, Beijing, v. 24, p. 1-6, 1997.

BAKSH, A.; KHABBAZI, S. D.; BALOCH, F. S.; DEMIREL, U.; ÇALIŞKAN, M. E.; HATİPOĞLU, R.; ÖZCAN, S.; ÖZKAN, H. Insect-resistant transgenic crops: retrospect and challenges. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 39, p. 531-548, 2015.

BARTEKOVA, A.; PRASLICKA, J. The effect of ambient temperature on the development of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera* Hübner, 1808). **Plant Protection Science**, Prague, v. 42, p. 135-138, 2006.

BARZMAN, M.; BÀRBERI, P.; BIRCH, A. N. E.; BOONEKAMP, P.; DACHBRODT-SAAAYDEH, S.; GRAF, B.; HOMMEL, B.; JENSEN, J. E.; KISS, J.; KUDSK, P.; LAMICHHANE, J. R.; MESSÉAN, A.; MOONEN, A-C.; RATNADASS, A.; RICCI, P.; SARAH, J-L.; SATTIN, M. Eight principles of integrated pest management. **Agronomy for Sustainable Development**, Les Ulis, v. 35, p. 1199-1215, 2015.

BASS, C.; DENHOLM, I.; WILLIAMSON, M. S.; NAUEN, R. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 121, p. 78-87, 2015.

BAYVEL, A. C. D. Animal welfare - a threat or an opportunity for research, farming and trade. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, Wellington, v. 53, p. 223-225, 1993.

BEHMER, S. T. Insect herbivore nutrient regulation. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 54, p. 165-187, 2009.

BOLLER, E. F.; CHAMBERS, D. L. Quality aspects of mass-reared insects. In: RIDGWAY, R. L.; VINSON, S. B. (Eds.), **Biological Control by Augmentation of Natural Enemies**. New York: Plenum Press, 1977. p. 219-235.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; SOUZA, B. H. S.; RIBEIRO, Z. A.; MORAES, R. F. O.; EDUARDO, W. I. NOGUEIRA, L. A defesa das plantas ao ataque dos insetos. In: BUSOLI, A. C.; CASTILHO, R. C.; ANDRADE, D. J.; ROSSI, G. D.; FRAGA, D. F.; SOUZA, L. A.; (Eds.). **Tópicos em entomologia agrícola VIII**. Jaboticabal: Gráfica Multipress, 2015. p. 161-179.

BRAMBELL, R. **Report of the technical committee to enquire into the welfare of animals kept under intensive livestock husbandry systems**. London: Her Majesty's Stationary Office. 1965. p. 9-15.

BRETHERTON, R. F.; GOATER, B.; LORIMER, R. I. Noctuidae and Agaristidae. In: HEATH, J.; EMMET, A. M. (Eds.). **The moths and butterflies of Great Britain and Ireland** v. 10. Colchester: Harley books, 1983. p. 296-301.

BROOM, D. M. Animal welfare: concepts and measurement. **Journal of animal science**, Champaign, v. 69, p. 4167-4175, 1991.

CABI - Centre for Agriculture and Biosciences International. ***Helicoverpa armigera* (cotton bollworm)**: Invasive Species Compendium, 2016. Disponível em: <<http://www.cabi.org/isc/datasheet/26757>>. Acesso em: 20 out. 2016.

CABI; EPPO - Centre for Agriculture and Biosciences International; European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Helicoverpa armigera* Bulletin, **Data Sheets on Quarantine Pests**, Paris, n. 110, p. 159-164, 1992.

CARNEIRO, E.; SILVA, L.; MAGGIONI, K.; SANTOS, V.; RODRIGUES, T.; REIS, S.; PAVAN, B. Evaluation of insecticides targeting control of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 5, p. 2823-2828, 2014.

CASTIGLIONI, E.; PERINI C.; CHIARAVALLE, W.; ARNEMANN J.; UGALDE, G.; GUEDES, J. V. C. Primer registro de ocurrencia de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) en soja, en Uruguay. **Agrociencia Uruguay**, Montevideu, v. 20, p. 31-35, 2016.

CELORIO-MANCERA, M. P; AHN, S. J.; VOGEL, H.; HECKEL, D. G. Transcriptional responses underlying the hormetic and detrimental effects of the plant secondary metabolite gossypol on the generalist herbivore *Helicoverpa armigera*. **BMC Genomics**, London, v. 12, p. 1-16, 2011.

CERVANTES-GODOY, D.; DEWBRE, J. **Economic importance of agriculture for poverty reduction**. Paris: OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers, 2010. 26 p. (OECD Publishing. n. 23).

CHANDRA, B. K. N.; RAI, P. S. Two new ornamental host plants of *Heliothis armigera* Hübner in India. **Indian Journal of Horticulture**, Madras, v. 31, p.198, 1974.

CHAPMAN, R. F.; SIMPSON, S. J.; DOUGLAS, A. E. **The insects**: structure and function. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. p. 81-107.

COHEN, A. C. Formalizing insect rearing and artificial diet technology. **American Entomologist**, Lanham, v. 47, p. 198-206, 2001.

COHEN, A. C. **Insect diets**: science and technology. Boca Raton: CRC Press, 2015. p. 1-164.

CUNNINGHAM, J. P.; ZALUCKI, M. P. Understanding heliothine (Lepidoptera: Heliothinae) pests: What is a host plant?. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 107, p. 881-896, 2014.

CUNNINGHAM, J. P.; ZALUCKI, M. P.; WEST, S. A. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): a new look at the behaviour and control of a polyphagous pest. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 89, p. 201-207, 1999.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C.; VIVAN, L. M.; GUIMARÃES, H. O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, p. 110-113, 2013.

DADD, R. H. Nutrition: Organisms. In. KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Eds.). **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 4. p. 313-390,

DeGOEDE, D. M.; ERENS, J.; KAPSOMENOU, E.; PETERS, M. "Large scale insect rearing and animal welfare". In: RÖCKLINSBERG, H.; SANDIN, P. (Eds.). **The ethics of consumption: the citizen, the market and the law**. Wageningen: Academic Publishers, 2013. p. 236-242.

DEGRANDE, P. E.; OMOTO, C. Pragas: estancar prejuízos. **Revista Cultivar**, Pelotas, v. 15, p. 30-34, 2013.

DOLINSKAYA, I. V. Egg Morphology of some Noctuidae (Lepidoptera). **Vestnik zoologii**, Kiev, v. 48, p. 353-364, 2014.

DOURADO, P. M.; BACALHAU, F. B.; AMADO, D.; CARVALHO, R. A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P.; OMOTO, C. High susceptibility to cry1Ac and low resistance allele frequency reduce the risk of resistance of *Helicoverpa armigera* to Bt Soybean in Brazil. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, e0161388, 2016.

DOWNES, S.; KRITICOS, D.; PARRY, H.; PAULL, C.; SCHELLHORN, N.; ZALUCKI, M. P. A perspective on management of *Helicoverpa armigera*: transgenic Bt cotton, IPM, and landscapes. **Pest management science**, West Sussex, 2016, doi:10.1002/ps.4461.

DOWNES, S.; PARKER, T.; MAHON, R. Incipient resistance of *Helicoverpa punctigera* to the Cry2Ab Bt toxin in Bollgard II cotton. **PloS One**, San Francisco, v. 5, e12567, 2010.

DRAKE, V. A. Methods for studying adult movement in *Heliothis*. In: ZALUCKI, M. P (Ed.). **Heliothis: research methods and prospects**. New York: Springer-Verlag, 1991, p. 109-121.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Ações emergenciais propostas pela Embrapa para o manejo integrado de *Helicoverpa* spp. em áreas agrícolas**, 2003. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/alerta-helicoverpa>>. Acesso em: 22 de set. 2016.

EILENBERG, J.; VLAK, J. M.; NIELSEN-LEROUX, C.; CAPPELLOZZA, S.; JENSEN, A. B. Diseases in insects produced for food and feed. **Journal of Insects as Food and Feed**, Wageningen, v. 1, p. 87-102, 2015.

ERENS, J.; van ES, S.; HAVERKORT, F.; KAPSOMENOU, E.; LUIJBEN, A. **A bug's life: large-scale insect rearing in relation to animal welfare: project 1052**. Wageningen: Wageningen University, 2012. p. 7-17.

EVEN, N.; DEVAUD, J-M.; BARRON, A. B. General stress responses in the honey bee. **Insects**, Basel, v. 3, p. 1271-1298, 2012.

FANSON, B. G.; TAYLOR, P. W. Protein:carbohydrate ratios explain life span patterns found in Queensland fruit fly on diets varying in yeast:sugar ratios. **American Aging Association**, Philadelphia, v. 34, p. 1361-1368, 2012.

FAN, X.; SHI, X.; ZHAO, J.; ZHAO, R.; FAN, Y. Insecticidal activity of transgenic tobacco plants expressing both Bt and CpTI genes on cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). **Chinese journal of biotechnology**, New York, v. 15, p. 1-5, 1999.

FATHIPOUR, Y.; SEDARATIAN A. Integrated management of *Helicoverpa armigera* in soybean cropping systems. In: EL-SHEMY, H. A. (Ed.). **Soybean: Pest Resistance**. Rijeka: InTech, 2013. p. 231-280.

FEIJÓ A. G. S. A função dos comitês de ética institucionais ao uso de animais na investigação científica e docência. **Bioética**, Brasília, v. 12, p. 11-22, 2006.

FENG, H-Q.; WU, K-M.; NI, Y-X.; CHENG, D-F.; GUO, Y-Y. High-altitude windborne transport of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in mid-summer in northern China. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 18, p. 335-349, 2005.

FITT, G. P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 34, p. 17-52, 1989.

GAHUKAR, R. T. Population dynamics of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on rose flowers in central India. **Journal of Entomological Research**, New Delhi, v. 26, p. 265-276, 2002.

GILBERT, N.; RAWORTH, D. A. Insect and temperature, a general theory. **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 128, p. 1-13, 1996.

GORDON, K.; TAY, W. T.; COLLINGE, D.; WILLIAMS, A. BATTERHAM, P. Biology of the major crop pest genus *Helicoverpa*. In: GOLDSMITH, M. R.; MAREC, F. (Eds.). **Molecular biology and genetics of the Lepidoptera**. Boca Raton: CRC Press, 2009. p. 219-238.

GREENBERG, B. Sterilizing procedures and agents, antibiotics and inhibitors in mass rearing of insects. **Bulletin of the Entomological Society of America**, Washington, v. 16, p. 31-36, 1970.

GRENIER, S. Artificial rearing of entomophagous insects, with emphasis on nutrition and parasitoids - general outlines from personal experience. **Karaelmas Science and Engineering Journal**, Istanbul, v. 2, p. 1-12, 2012.

GUO, Y. Y. Progress in the researches on migration regularity of *Helicoverpa armigera* and relationships between the pest and its host plants. **Acta Entomologica Sinica**, Peking, v. 40, p. 1-6, 1997.

HAMED, M.; NADEEM, S. Rearing of *Helicoverpa armigera* (Hub.) on artificial diets in laboratory. **Pakistan Journal of Zoology**, Lahore, v. 40, p. 447-450, 2008.

HARDWICK, D. F. A generic revision of the North American Heliiothidinae (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, Ottawa, v. 73, p. 1-59, 1970.

HARDWICK, D. F. The corn earworm complex. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, Ottawa, v. 40, p. 1-247, 1965.

HEMATI, S. A.; NASERI, B.; NOURI GANBALANI, G.; RAFIEE DASTJERDI, H.; GOLIZADEZ, A. Effect of different host plants on nutritional indices of the pod borer, *Helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Science**, Annapolis, v. 12, p. 1-15, 2011.

HOFFMANN, A. A.; COLLINS, E.; WOODS, R. Wing shape and wing size changes as indicators of environmental stress in *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) moths: comparing shifts in means, variances, and asymmetries. **Environmental Entomology**, College Park, v. 31, p. 965-971, 2002.

HOKKANEN, H. M. T. Integrated pest management at the crossroads: Science, politics, or business (as usual)?. **Arthropod-Plant Interactions**, Dordrecht, v. 9, p. 543-545, 2015.

HORVATH, K.; ANGELETTI, D.; NASCETTI, G.; CARERE, C. Invertebrate welfare: na overlooked issue. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, Roma, v. 49, p. 9-17, 2013.

HOUSE, H. L. Effects of different proportions of nutrients on insects. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 12, p. 651-669, 1969.

IZQUIERDO, J. I. *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): relationship between captures in pheromone traps and egg counts in tomato and carnation crops. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 120, p. 281-290, 1996.

JAGTAP, B. R.; ACHARYA, S.; PATEL, J. B. Character association analysis of resistance to *Helicoverpa armigera* in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences**, Jaipur, v. 2, p. 92-100, 2012.

JALLOW, M. F. A.; MATSUMURA, M.; SUZUKI, Y. Oviposition preference and reproductive performance of Japanese *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 36, p. 419-426, 2001.

JIN, L.; ZHANG, H.; LU, Y.; YANG, Y.; WU, K.; TABASHNIK, B. E.; WU, Y. Large-scale test of the natural refuge strategy for delaying insect resistance to transgenic Bt crops. **Nature Biotechnology**, New York, v. 33, p. 169-174, 2015.



KAKIMOTO, T.; FUJISAKI, K.; MIYATAKE, T. Egg laying preference, larval dispersion, and cannibalism in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 96, p. 793-798, 2003.

KARIM, S. Management of *Helicoverpa armigera*: a review and prospectus for Pakistan. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 3, p. 1213-1222, 2000.

KEELING, L. J.; RUSHEN, J.; DUNCAN, I. J. H. Understanding animal welfare. In: APPLEBY, M. C.; MENCH, J. A.; OLSSON, I. A. S.; HUGHES, B. O. (Eds.). **Animal welfare**. 2.st ed. Wallingford: Cabi, 2011. p. 13-26.

KHOURY, D. S.; MYERSCOUGH, M. R.; BARRON, A. B. A quantitative model of honey bee colony population dynamics. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, e18491, 2011.

KNIPLING, E. F. Insect colonization and mass production. In: SMITH, C. N. (Ed.) **Insect colonization and mass production**. New York/London: Academic Press, 1966. p. 1-12.

KOUHI, D.; NASERI, B.; GOLIZADEH, A. Nutritional performance of the tomato fruit borer, *Helicoverpa armigera*, on different tomato cultivars. **Journal of Insect Science**, Annapolis, v. 14, p. 1-12, 2014.

KOUL, B.; SRIVASTAVA, S.; SANYAL, I.; TRIPATHI, B.; SHARMA, V. E.; AMLA, D. V. Transgenic tomato line expressing modified *Bacillus thuringiensis* cry1Ab gene showing complete resistance to two lepidopteran pests. **SpringerPlus**, Zuriq, v.3, p. 1-13, 2014.

KRISHNAREDDY, B.; HANUR, V. S. Enhanced synthetic diet for rearing *H. armigera* under laboratory conditions. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, Nova Deli, v. 3, p. 165-167, 2015.

LAMMERS, J. W.; MACLEOD, A. **Report of a pest risk analysis: *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808)**. Geertjesweg: Netherlands Plant Protection Service/ Sand Hutton: The Netherlands and Central Science Laboratory, 2007. 18p. (Plant Protection Service/Central Science Laboratory. Report).

LANDIS, D. A.; WRATTEN, S. D.; GURR, G. M. Habitat management to conserve natural enemies of arthropod pests in agriculture. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 45, p. 175-201, 2000.

LIU, Z.; LI, D.; GONG, P.; WU, K. Life table studies of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), On different host plants. **Environmental Entomology**, College Park, v. 33, p. 1570-1576, 2004.

MAHON, R. J.; DOWNES, S. J.; JAMES, B. Vip3A resistance alleles exist at high levels in australian targets before release of cotton expressing this toxin. **PloS One**, San Francisco, v. 7, e39192, 2012.

MAIA, A. H. N.; LUIZ, A. J. B.; CAMPANHOLA, C. Statistical inference on associated fertility life table parameters using Jackknife technique: computational aspects. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, p. 511–518, 2000.

MALDONADO, H. A.; POLANÍA, I. Z. Evaluation of meridic diets suitable for efficient rearing of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica**, Calle, v. 13, p. 163-173, 2010.

MANDAOKAR, A.; DGOYAL, R. K.; SHUKLA, A.; BISARIA, S.; BHALLA, R.; REDDY, V.S.; CHAURASIA, A.; SHARMA, R .P.; ALTOSAAR, I.; ANANDA KUMAR, P. Transgenic tomato plants resistant to fruit borer (*Helicoverpa armigera* Hübner). **Crop Protection**, Guildford, v. 19, p. 307-312.

MAO, Y-B.; CAI, W-J.; WANG, J-W.; HONG, G-J.; TAO, X-Y.; WANG, L-J.; HUANG, Y-P.; CHEN, X-Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, p. 1307-1313, 2007.

MARTIN, T.; OCHOU, G. O.; DJIHINTO, A.; TRAORE, D.; TOGOLA, M.; VASSAL J. M.; VAISSAYRE, M.; FOURNIER, D. Controlling an insecticide-resistant bollworm in west Africa. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 107, p. 409-411, 2005.

MATTHEWS, M. Classification of the Heliiothinae. **Bulletin of the Natural Resources Institute**, Chatham, v. 82, p. 287-291, 1992.

McCAFFERY, A. R. Resistance to insecticides in heliothine lepidoptera: a global view. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, London, v. 353, p. 1735-1750, 1998.

McCULLOCH, S. P. A critique of FAWC's five freedoms as a framework for the analysis of animal welfare. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, New York, v. 26, p. 959-975, 2013.

MENSAH, R. K. Supression of *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) oviposition by use of the natural enemy food supplement envirofeast. **Australian Journal of Entomology**, Canberra, v. 35, p. 323-329, 1996.

MIRONIDIS, G. K. Development, survivorship and reproduction of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) under fluctuating temperatures. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 104, p. 751-764, 2014.

MITTER, C.; POOLE, R. W.; MATTHEWS, H. Biosystematics of the Heliothinae (Lepidoptera: Noctuidae). **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 38, p. 207-225, 1993.

MURÚA, M. G.; SCALORA, F. S.; NAVARRO, F. R.; CAZADO, L. E.; CASMUZ, A; VILLAGRÁN, M. E.; LOBOS, H.; GASTAMINZA, G. First record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 97, p. 854-856, 2014.

NASREEN, A.; MUSTAFA, G. Biology of *Helicoverpa armigera* (Hbn) reared in laboratory on natural diet. **Pakistan Journal of Biological Science**, Dubai, v. 3, p. 1668-1669, 2000.

OERKE, E. C. Crop losses to pests, **The Journal of Agricultural Science**, London, v. 144, p. 31-43, 2006.

OJEDA-AVILA, T.; WOODS, H. A.; RAGUSO, R. A. Effects of dietary variation on growth, composition, and maturation of *Manduca sexta* (Sphingidae: Lepidoptera). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, p. 293-306, 2003.

PAIXÃO, R. L.; SCHRAMM, F. R. Ethics and animal experimentation: what is debated?. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 15, p. 99-110, 1999.

PAL, S.; SARKAR, I.; CHATTERJEE H.; SENAPATI, S. K. Varietal reaction of carnation to bud borer, *Helicoverpa armigera* (Hübner) in relation to plant characters. **Pest Management in Horticultural Ecosystems**, Amsterdam, v. 21, p. 49-54, 2015.

PARRA, J. R. P.; PANIZZI, A. R.; HADDAD, M.L. Nutritional indices for measuring food intake and utilization. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.) **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. Boca Ratón: CRC Press, 2012. p. 13-49.

PARRA, J. R. P. The evolution of artificial diets and their interactions in science and technology. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.) **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. Boca Ratón: CRC Press, 2012. p. 51-92.

PEDGLEY, D. E. Windborne migration of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to the British Isles. **Entomologist's Gazette**, Wallingford, v. 36, p. 15-20, 1985.

POGUE, M. G. A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliethinae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lexington, v. 97, n. 6, p. 1222-1226, 2004.

QAYYUM, M. A.; WAKIL, W.; ARIF, M. J.; SAHI, S. T. *Bacillus thuringiensis* and nuclear polyhedrosis virus for the enhanced bio-control of *Helicoverpa armigera*. **International Journal of Agriculture & Biology**, Islamabad, v. 17, p. 1043-1048, 2015.

RAHMAN, A. K. M. Z.; HAQUE, M. A.; ALAM, S. N.; BEGUM, K.; SARKER, D. Development of integrated pest management approaches against *Helicoverpa armigera* (Hübner) in tomato. **Bangladesh Journal of Agricultural Research**, Bangladesh, v. 41, p. 287-296, 2016.

RAMU, S. V.; ROHINI, S.; KESHAVAREDDY, G.; NEELIMA, M. G.; SHANMUGAM, N. B.; KUMAR, A. R. V.; SARANGI, S. K.; KUMAR, P. A.; UDAYAKUMAR, M. Expression of a synthetic cry1AcF gene in transgenic *Pigeon pea* confers resistance to *Helicoverpa armigera*. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 136, p. 675-687, 2012.

RAZMJOU, J.; NASERI, B.; HEMATI, S. A. Comparative performance of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on various host plants. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 87, p. 29-37, 2014.

REINECKE, J. P. Nutrition: artificial diets. In: KERKUT, G. A.; GILBERT L. I. (Eds.). **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. v. 4. Oxford: Pergamon Press. 1985. p. 391-420.

ROEDER, T. Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 50, p. 447-477, 2005.

ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, New York, v. 24, p. 63-71, 2006.

ROSSI, G. D.; SALVADOR, G.; CÔNSOLI, F. L. The parasitoid, *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), influences food consumption and utilization by larval *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 87, p. 85-94, 2014.

RUAN, Y. M.; WU, K. J. Performances of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* on different food plants. **Acta Entomologica Bohemoslovaca**, České Budějovice, v. 44, p. 205-212, 2001.

SHELLHORN, N. A.; PIERCE, S.; BIANCHI, F. J. J. A.; WILLIAMS, D.; ZALUCKI, M. P. Designing landscapes for multiple outcomes in broad-acre environments. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v. 48, p. 1549-1559, 2008.

SCHOWALTER, T. D. **Insect ecology**: an ecosystem approach. San Diego: Elsevier, 2011. p. 53-93.

SCRIBER, J. M.; SLANSKY JR., F. The nutritional ecology of immature insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 26, p. 183-211, 1981.

SEDARATIAN, A.; FATHIPOUR, Y.; TALAEI-HASSANLOUI, R. Deleterious effects of *Bacillus thuringiensis* on biological parameters of *Habrobracon hebetor* parasitizing *Helicoverpa armigera*. **BioControl**, Dordrecht, v. 59, p. 89-98, 2014.

SHARMA, H. C.; STEVENSON, P. C.; GOWDA, C. L. L. *Heliothis/Helicoverpa* management: emerging trends and strategies for future research. In: SHARMA, H. C. (Ed.). **Heliothis/Helicoverpa Management**: emerging trends and strategies for future research. New Delhi: Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, 2005. p. 453-461.

SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O.; BARBIN, D.; VILLA-NOVA, N. A. **Manual de ecologia dos insetos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1976. p. 239-253.

SIMPSON, S. J.; RAUBENHEIMER, D. **The nature of nutrition**: a unifying framework from animal adaptation to human obesity. Princeton University Press: Princeton, 2012. p. 167-193.

SIMPSON, S. J.; SIBLY, R. M.; LEE, K. P.; BEHMER, S. T.; RAUBENHEIMER, D. Optimal foraging when regulating intake of multiple nutrients. **Animal Behaviour**, London, v. 68, p. 1299-1311, 2004.

SMITH E. Detection of old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Puerto Rico. **North American Plant Protection Organization**, Phytosanitary Alert System Bulletin, 2014. Disponível em: <<http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=600>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

SMITH, J. A. A question of pain in invertebrados. **Institute of Laboratory Animal Resources Journal**, Washington, v. 33, p. 25-31, 1991.

SØRENSEN, J. G.; ADDISON, M. F.; TERBLANCHE, J. S. Mass-rearing of insects for pest management: challenges, synergies and advances from evolutionary physiology. **Crop Protection**, Guildford, v. 38, p. 87-94, 2012.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S. V.; LOPES-LIMA, A.; YANO, S. A. C.; MICHELI, A.; MORAIS, E. G. F.; GALLO, P.; PEREIRA, P. R. V. S.; SALVADORI, J. R.; BOTTON, M.; ZENKER, M. M.; AZEVEDO-FILHO, W. S. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 60, p. 101-104, 2016.

SUBRAMANIAN, S.; MOHANKUMAR, S. Genetic variability of the bollworm, *Helicoverpa armigera*, occurring on different host plants. **Journal of Insect Science**, Annapolis, v. 6, p. 1-8, 2006.

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, p. 510-521, 2013.

TAYLOR, D. E. Entomology notes. **Zimbabwe Agricultural Journal**, Harare, v.79, p. 1-45, 1982.

TAY, W. T.; SORIA, M. F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G. T.; ANDERSON, C.; DOWNES, S. A brave New World for an Old World pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PloS One**, San Francisco, v. 8, e80134, 2013.

THOMPSON, S. N.; REDAK, R. A.; WANG, W. Nutrition interacts with parasitism to influence growth and physiology of the insect *Manduca sexta* L. **The Journal of Experimental Biology**, London, v. 208, p. 611-623, 2005.

VANDERZANT, E. S. Defined diets for phytophagous insects. In: SMITH, C. N. (Ed.). **Insect colonization and mass production**. New York/London: Academic Press, 1966. p. 1-12.

VANDERZANT, E. S. Development, significance, and application of artificial diets for insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 19, p. 139-160. 1974.

van LENTEREN, J. C. Evaluation, mass production, quality control and release of entomophagous insects. In: FRANZ, J. M. (Ed.) **Biological plant and health protection**. Stuttgart: Fischer, 1986. p. 31-56.

WANG, N. C.; LI, Z. H. Studies on the biology of cotton bollworm (*Heliothis armigera* Hübner) and tobacco budworm (*Heliothis assulta* Quenee). **Journal of the Shandong Agricultural University**, Taiwan, v. 1-2, p. 13-25, 1984.

WU, K.; GONG, P. A new and practical artificial diet for the cotton bollworm. **Entomologia Sinica**, Shensi, v. 4, p. 277-282, 1997.

WU, K-M.; LU, Y-H.; FENG, H-Q.; JIANG Y-Y.; ZHAO, J-Z. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. **Science**, New York, v. 321, p. 1676-1678, 2008.

XIONG, Y.; ZENG, H.; ZHANG, Y.; XU, D.; QIU, D. Silencing the HaHR3 gene by transgenic plant-mediated RNAi to disrupt *Helicoverpa armigera* Development. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v. 9, p. 370-381, 2013

WALDBAUER, G. P. The consumption and utilization of food by insect. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v. 15, p. 229–288, 1968.

ZALUCKI, M. P.; DAGLISH, G.; FIREMPONG, S.; TWINE, P. H. The biology and ecology of *Heliothis armigera* (Hübner) and *H. punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia what do we know?. **Australian Journal of Zoology**, Melbourne, v. 34, p. 779-814, 1986.

ZALUCKI, M. P.; FURLONG, M. J. Forecasting *Helicoverpa* populations in Australia: a comparison of regression based models and a bio-climatic based modelling approach. **Insect Science**, Victoria, v. 12, p. 45-56, 2005.

ZALUCKI, M. P.; MURRAY, D. A. H.; GREGG, P. C.; FITT, G. P.; TWINE, P. H.; JONES, C. Ecology of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *H. punctigera* (Wallengren) in the inland of Australia larval sampling and host plant relationships during winter and spring. **Australian Journal of Zoology**, Melbourne, v. 42, p. 329-436, 1994.

ZHOU, X. F.; APPLEBAUM, S. W.; COLL, M. Overwintering and spring migration in the bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Israel. **Environmental Entomology**, College Park, v. 29, p. 1289-1294, 2000.



## **CAPÍTULO 2 - Dieta artificial para *Helicoverpa armigera*: uma análise biológica, nutricional e populacional**

**RESUMO** - A lagarta do Velho Mundo, *Helicoverpa armigera*, descobre o Novo Mundo, com possibilidades infinitas de sucesso. Para a implementação de um programa de Manejo Integrado de Pragas é primordial estudos nas mais diversas áreas do conhecimento em Entomologia, e a produção do inseto-alvo em larga escala torna-se imprescindível. A escolha de uma dieta ideal é parte essencial do processo de otimização de qualquer criação massal. Neste estudo foram medidos parâmetros de desenvolvimento, índices nutricionais e índices populacionais em *H. armigera* alimentada em quatro dietas artificiais, para *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea saccharalis*, *Anticarsia gemmatalis* e modificada de *A. gemmatalis*, para selecionar a mais adequada para a criação de *H. armigera*. Os resultados indicaram que *H. armigera* foi capaz de completar o ciclo de vida nas quatro dietas avaliadas, com alterações no desenvolvimento dependendo do alimento oferecido na fase larval. As possíveis causas do alto ou baixo desempenho do inseto são abordadas e estão relacionadas com as características físicas da dieta e variação quantitativa e qualitativa de nutrientes. A dieta artificial desenvolvida para *A. gemmatalis* afetou positivamente os parâmetros biológicos de *H. armigera*. Além disso, a dieta modificada de *A. gemmatalis* promoveu excelente desenvolvimento de *H. armigera*, com elevados valores dos índices populacionais e nutricionais, e sem decréscimo no vigor e potencial reprodutivo, sendo a mais indicada para criação massal do inseto para fins de estudo em Manejo Integrado de Pragas.

**Palavras-chave:** cotton bollworm, criação massal de insetos, eficiências de utilização de alimentos, equilíbrio nutricional, história de vida

## CHAPTER 2 - Artificial diet for *Helicoverpa armigera*: a biological, nutritional and population analysis

**ABSTRACT** - The Old World bollworm, *Helicoverpa armigera*, discovers the New World, with infinite possibilities of success. For the implementation of an Integrated Pest Management program, studies in the most diverse areas of knowledge in Entomology are essential, and large-scale production of the target insect becomes essential. The choice of an ideal diet is an essential part of the optimization process of any mass rearing. In this study development parameters, nutritional indices and population indices were measured in *H. armigera* fed on four artificial diets, for *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea saccharalis*, *Anticarsia gemmatalis* and modified *A. gemmatalis* to select the most suitable for *H. armigera* rearing. The results indicated that *H. armigera* was able to complete the life cycle in the four evaluated diets, with alterations in the development depending on the food offered in the larval stage. The possible causes of high or low insect performance are addressed, and are related to physical characteristics of the diet and quantitative and qualitative variation of nutrients. The artificial diet developed for *A. gemmatalis* positively affected the biological parameters of *H. armigera*. In addition, the diet modified *A. gemmatalis* provided excellent development of *H. armigera*, with high values of population and nutritional indices, and without decrease in the vigor and reproductive potential, being the most indicated for the insect mass rearing for studies in Integrated Pest Management.

**Keywords:** cotton bollworm, food utilization efficiencies, insect mass rearing, life history, nutritional balance

## 1 Introdução

No Novo Mundo, a introdução da praga *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (TAY et al., 2013; SOSA-GÓMEZ et al., 2015) produziu graves implicações aos cultivos agrícolas. Além disso, o potencial de dispersão da praga para novos territórios (KRITICOS et al., 2015) pode produzir ainda maiores perdas econômicas (OLIVEIRA et al., 2014), causar impactos ambientais negativos associados com a utilização de inseticidas e promover mudanças em muitos sistemas ecológicos (GUREVITCH; PADILLA, 2004; PIMENTEL; ZUNIGA; MORRISON, 2005).

A alimentação generalista de *H. armigera* em ampla gama de hospedeiros e em diferentes habitats, a flexibilidade na adaptação reprodutiva e a elevada abundância em que ocorre representam um desafio para estudos bioecológicos para fins de aplicações tanto em pesquisa básica quanto aplicada (BEHERE et al., 2013). Uma prioridade para produzir estes estudos é a disponibilidade e o fornecimento contínuo e adequado de *H. armigera* de alta qualidade oriundas de produção massal em laboratório.

Embora tenham ocorrido casos de sucesso no desenvolvimento ou melhorias de algumas dietas artificiais para insetos, muitas outras foram consideradas falhas (SINGH, 1985; COHEN, 2001). Para a criação de *H. armigera*, estudos têm sido dirigidos ao desenvolvimento de uma dieta artificial econômica (ABBASI et al., 2007) ou com substituições de certos ingredientes (HAMED; NADEEM, 2008). No entanto, várias divergências são observadas quanto ao desempenho de *H. armigera* em algumas dietas disponíveis (AHMED; KHALIQUE; MALIK, 1988; WU; GONG, 1997). Outra causa limitante à utilização de novas dietas artificiais refere-se à dificuldade para obtenção ou falta de especificações de alguns dos seus componentes (KRISHNAREDDY; HANUR, 2015). Assim, estudos são necessários para adequar uma dieta artificial que atendam às necessidades nutricionais de *H. armigera* e que produza grande quantidade de indivíduos uniformes em criação contínua em laboratório para uso em pesquisas básicas e de manejo do inseto.

Proteínas e carboidratos são nutrientes essenciais para o desenvolvimento, sobrevivência e reprodução dos animais (BEHMER, 2009; SIMPSON; RAUBENHEIMER, 2012). O entendimento da interferência das variações quantitativas e qualitativas dos nutrientes da dieta no desenvolvimento de um inseto é de grande relevância para a compreensão dos custos nutricionais adaptativos envolvidos (SIMPSON et al., 2004). Em geral, uma dieta desbalanceada afeta a aceitação do alimento pelo inseto, com reflexos em seu desempenho (BEHMER, 2009), o que pode ocasionar efeitos deletérios em alguma fase de seu desenvolvimento (OJEDA-AVILA; WOODS; RAGUSO, 2003; FANSON; TAYLOR, 2012). O padrão de alimentação nos estágios de desenvolvimento de *H. armigera* já foi previamente definido (RAUBENHEIMER; BARTON BROWNE, 2000; BARTON BROWNE; RAUBENHEIMER, 2003). No entanto, pouco se sabe sobre as exigências nutricionais do inseto e a interferência da relação proteína: carboidrato no seu desenvolvimento.

Em decorrência da alta polifagia de *H. armigera*, trabalhou-se com a hipótese de que dietas artificiais usualmente utilizadas e adequadas ao desenvolvimento de alguns lepidópteros também permitiriam a criação de *H. armigera* com elevada qualidade biológica para fins de estudo em manejo integrado de pragas. Assim, os objetivos desse estudo foram selecionar entre essas dietas artificiais a mais adequada para a criação de *H. armigera*, utilizando parâmetros de desenvolvimento, índices nutricionais e populacionais como critérios de avaliação e verificar os possíveis fatores na dieta artificial que interferem no desempenho do inseto.

## **2 Material e métodos**

### **2.1 Local**

O experimento foi realizado no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos do Departamento de Fitossanidade na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil. Os ensaios foram realizados em condições ambientais controladas de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 5\%$  de umidade relativa e fotofase de 12 horas.

### **2.2 Criação de *Helicoverpa armigera***

Indivíduos de *H. armigera* foram originalmente obtidos de doações das Empresas Bayer, Dupont (Paulínia, SP) e SGS Gravena (Jaboticabal, SP). A colônia de laboratório foi iniciada em folhas de algodão, cv. BRS 293. Na geração F1 foram estabelecidas linhagens do inseto em cada dieta artificial (Tabela 1) antes de serem utilizadas nos ensaios.

Tabela 1. Composição das dietas artificiais avaliadas para a criação de *Helicoverpa armigera* em laboratório.

Constituintes	Quantidade para produzir 100 g			
	Dieta SF <sup>1</sup>	Dieta DS <sup>2</sup>	Dieta AG <sup>3</sup>	Dieta MAG <sup>4</sup>
Sacarose	-	4,98 g	-	-
Proteína de soja	-	4,98 g	2,35 g	1,95 g
Germe de trigo	-	1,45 g	4,70 g	3,91 g
Levedura	1,99 g	-	2,94 g	2,44 g
Nipagin	0,07 g	0,29 g	0,23 g	0,20 g
Ácido ascórbico	0,20 g	0,17 g	0,28 g	0,23 g
Ácido sórbico	0,07 g	-	0,14 g	0,12 g
Cloreto de colina	-	0,04 g	-	-
Sais de Wesson	-	0,71 g	-	-
Solução vitamínica <sup>5</sup>	-	1,04 ml	0,47 ml	0,59 ml
Complexo vitamínico <sup>6</sup>	-	0,04 ml	-	-
Ampicilina	-	0,01 g	-	-
Tetraciclina	-	0,01 g	0,01 g	0,02 g
Formol (40%)	0,13 ml	0,07 ml	0,28 ml	0,23 ml
Ágar	1,59 g	1,04 g	1,08 g	1,37 g
Caseína	-	2,24 g	1,76 g	1,95 g
Feijão	13,24 g <sup>7</sup>	-	5,87 g <sup>7</sup>	4,98 g <sup>8</sup>
Água	82,73 ml	82,94 ml	79,88 ml	82,10 ml
<i>Quantidade por porção 100 g de dieta</i>				
Proteína	3,88 g	4,33 g	5,91 g	5,12 g
Carboidrato	7,87 g	6,98 g	7,49 g	6,69 g
Matéria seca	10,83 g	19,66 g	17,53 g	16,55 g

Dieta artificial de <sup>1</sup>*Spodoptera frugiperda*; <sup>2</sup>*Diatraea saccharalis*; <sup>3</sup>*Anticarsia gemmatalis*; e <sup>4</sup>modificada de *A. gemmatalis*.

<sup>5</sup>Niacinamida - 1,0g.; Pantotenato de cálcio - 1,0g.; Riboflavina - 0,5g.; Tiamina - 0,25g.; Piridoxina - 0,25g.; Ácido fólico - 0,25g.; Biotina - 0,02g.; 2,0 mL Cianocobalamina 350,0 mcg/2mL; (dissolvidos em 1000 mL de água);

<sup>6</sup>Vitamina A - 150 U.I.; Vit. D3 - 40 U.I.; Vit. E - 0,01 U.I.; Vit. B1 - 0,04 mg; Vit. B2 0,02 mg; Vit. B12 - 0,048 mcg; Nicotinamida - 0,1 mg.

<sup>7</sup>feijão Grupo I, Tipo cores, cultivar carioca;

<sup>8</sup>feijão Grupo I, Tipo branco, cultivar branco.

### 2.3 Dietas artificiais

Foram avaliados quatro tipos de dieta artificial: (1) Dieta SF, desenvolvida por Kasten Jr, Precetti e Parra (1978) para a criação de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae); escolhida por ser de baixo custo, atender com eficiência a produção do inseto e pela similaridade na família Noctuidae; (2) Dieta DS, para a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), desenvolvida por King e Hartley (1985); por apresentar sacarose como fagoestimulante e não apresentar na formulação o feijão como fonte proteica; (3) Dieta AG, para a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae), desenvolvida por Greene, Leppla e Dickerson (1976); foi selecionada por ser a dieta base da maioria das dietas modificadas para os insetos; e (4) Dieta MAG, originária de modificação da dieta para a lagarta-da-soja e utilizada em alguns laboratórios para criação massal de outras espécies de Noctuidae. (Tabela 1). As dietas foram preparadas seguindo-se a metodologia descrita pelos respectivos autores.

### 2.4 Parâmetros de desenvolvimento de *Helicoverpa armigera* em dietas artificiais

O desenvolvimento de *H. armigera* nas quatro dietas artificiais foi comparado por meio da avaliação dos seguintes parâmetros biológicos: sobrevivência larval, índice de desenvolvimento larval, peso larval, período larval, sobrevivência pupal, índice de desenvolvimento pupal, sobrevivência de imaturo, índice de desenvolvimento de imaturo, período pupal, peso de pupas fêmeas e de machos, deformação de pupas, peso de adultos fêmeas e machos, deformação de adultos, longevidade de fêmeas e machos com e sem alimento, fecundidade diária e total, fertilidade de ovos e razão sexual.

Lagartas neonatas com no máximo seis horas de eclosão foram inoculadas individualmente em tubos de fundo chato (2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura) esterilizados, onde foram vertidos 12 ml de dieta artificial. Os tubos foram vedados com chumaço de algodão hidrófilo estéril e acondicionados em caixas de madeira

(50 cm de comprimento x 9 cm de espessura x 50 cm de altura) com a extremidade superior do recipiente voltada para baixo, em ângulo de 15°.

O peso de imaturos foi avaliado em lagartas com cinco e 10 dias de idade, e em pupas com 24 horas de idade com o auxílio de uma balança de precisão (0,0001 g) (Ohaus Corporation, AR2140, Parsippany, USA). A identificação do sexo dos indivíduos foi realizada por meio da observação da diferenciação de características sexuais nas pupas, segundo Butt e Cantu (1962). A razão sexual foi calculada por meio da fórmula  $RS = \text{número de fêmeas} \div (\text{número de fêmeas} + \text{número de machos})$ . A deformação foi avaliada, e em seguida, as pupas foram individualizadas em recipientes plásticos (6,5 cm de diâmetro x 5 cm de altura) contendo uma camada (0,5 cm de altura) de vermiculita ao fundo. As pupas permaneceram nesses recipientes até a emergência dos adultos, quando se avaliou a deformação e o peso fresco dos machos e fêmeas. Os índices de desenvolvimento do período larval, pupal e larva-pupa foram calculados por meio da relação entre a porcentagem de indivíduos que completaram o desenvolvimento e o tempo médio necessário para completar cada fase biológica (SINGH; REMBOLD, 1988). Por fim, os adultos foram individualizados em gaiolas cilíndricas de PVC (10 cm de diâmetro x 10 cm de altura) para avaliar a longevidade sem e com alimento (solução aquosa de mel a 10%).

Para verificar a fecundidade e fertilidade de *H. armigera*, casais recém-emergidos foram individualizados em gaiolas cilíndricas de PVC (10 cm de diâmetro x 20 cm de altura), revestidas internamente com papel toalha, e dispostas em pratos plásticos (14 cm de diâmetro) vedadas na extremidade superior com tecido *voile*. O alimento para os adultos foi disponibilizado em um chumaço de algodão embebido em solução aquosa de mel a 10%. Diariamente, o papel toalha e o tecido *voile* foram substituídos, e a mortalidade dos adultos e o número de ovos colocados por fêmea registrados. Após a quantificação dos ovos, o papel toalha e o tecido *voile* foram acondicionados em recipientes plásticos de 1500 ml (13 cm de diâmetro x 14,5 cm de altura) até a eclosão das lagartas para a avaliação da fertilidade dos ovos.

O delineamento experimental utilizado para a avaliação do desenvolvimento da fase imatura de *H. armigera* foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo cada repetição composta por um grupo de 10 lagartas individualizadas nos



tubos. Para os parâmetros avaliados na fase adulta, foram utilizadas 10 repetições, e cada gaiola com um casal de *H. armigera* representou uma repetição.

## **2.5 Índices nutricionais de *Helicoverpa armigera* em dietas artificiais**

Índices nutricionais, de acordo com Waldbauer (1968), Scriber e Slansky Jr. (1981) e Parra, Panizzi e Haddad (2012), foram calculados por meio do método gravimétrico, utilizando-se lagartas de *H. armigera* alimentadas nas dietas artificiais (Tabela 1) durante a fase larval. Para isso, lagartas neonatas foram individualizadas em um recipiente plástico (6 cm de diâmetro x 2 cm de altura) contendo cerca de 12 ml de uma das dietas solidificada ao fundo dos recipientes. Dez repetições foram utilizadas para cada tratamento, sendo cada repetição constituída por 10 lagartas oriundas de parentais criados por uma geração em cada dieta artificial. Os recipientes ficaram invertidos para facilitar a coleta das fezes nas tampas dos recipientes de criação.

Quando as lagartas atingiram o máximo desenvolvimento, confirmado por meio da visualização dos últimos pellets fecais de cor clara, foram sacrificadas em baixa temperatura e secas em estufa (48h a 60° C). O mesmo procedimento foi feito para determinar o peso seco das fezes e dos remanescentes das dietas. O peso seco inicial das lagartas neonatas foi considerado nulo, e o peso seco inicial das dietas foi estimado por meio da média do peso seco de 10 alíquotas de cada dieta.

## **2.6 Índices populacionais de *Helicoverpa armigera* em dietas artificiais**

Para determinar os efeitos das quatro dietas artificiais sobre os parâmetros populacionais de *H. armigera*, tabelas de vida de fertilidade foram construídas a partir de um grupo de indivíduos pertencente a uma geração (SOUTHWOOD; HENDERSON, 2000). Para isso, 10 casais de adultos recém-emergidos, cujo desenvolvimento ocorreu em cada uma das dietas, foram individualizados em gaiolas de PVC (20,0 cm diâmetro x 20,0 cm altura), para a obtenção dos ovos. No sexto dia após o início da oviposição, 150 ovos provenientes de cada tratamento foram separados para a determinação da fertilidade e o estabelecimento dos grupos.

Lagartas recém-eclodidas foram individualizadas em tubos de fundo chato (2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura) que continham dietas artificiais, e o ciclo do inseto foi acompanhado. Após a emergência dos adultos de *H. armigera* em cada dieta artificial, os mesmos foram agrupados em dois casais por gaiola, totalizando seis gaiolas por tratamento. As observações foram realizadas diariamente, bem como a substituição dos substratos de oviposição e alimentação nas gaiolas. Os dados do período de desenvolvimento, mortalidade, razão sexual e número de ovos foram utilizados para a construção de tabelas de vida de fertilidade (BIRCH, 1948; SILVEIRA NETO et al., 1976; SOUTHWOOD, 1978; CAREY, 1993; MAIA; LUIZ; CAMPANHOLA, 2000), e em seguida, foram estimadas as taxas de crescimento de *H. armigera* nas dietas artificiais.

## **2.7 Análise estatística**

Os dados dos parâmetros biológicos, nutricionais e populacionais de *H. armigera* foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Utilizou-se a análise exploratória dos dados para a verificação de dados influentes e outliers, e a homocedasticidade das variâncias e normalidade dos resíduos analisados pelos testes de Bartlett e Kolmogorov-Smirnov, respectivamente. Quando atendidas essas pressuposições, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Dados que não atenderam os pressupostos da ANOVA foram transformados apropriadamente ou foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O software utilizado para as análises estatísticas foi o SAS® 9.3 (SAS INSTITUTE, 2011).

### 3 Resultados

#### 3.1 Parâmetros de desenvolvimento

##### 3.1.1 Tempo de desenvolvimento e longevidade de adultos

Os dados de incubação dos ovos, desenvolvimento larval e pupal, e longevidade de *H. armigera* alimentada nas dietas artificiais estão apresentados na Tabela 2. O período de incubação dos ovos não foi influenciado pela dieta artificial nas quais os insetos que deram origem aos ovos se desenvolveram. A duração da fase larval de *H. armigera* variou significativamente entre as dietas artificiais ( $H_{3,36} = 33,45$ ;  $P < 0,0001$ ); a dieta modificada de *A. gemmatalis* (Dieta MAG) promoveu o menor período larval, com diferença de 8,45 dias em comparação com o período larval dos insetos na dieta de *D. saccharalis* (Dieta DS). Diferença significativa ( $F_{3,36} = 37,18$ ;  $P < 0,0001$ ) também foi observada no tempo de duração da fase de pupa em função da dieta consumida durante a fase larval. As dietas de *A. gemmatalis* (Dieta AG) e Dieta MAG promoveram o menor período pupal, e os insetos que receberam a dieta de *S. frugiperda* (Dieta SF) apresentaram aumento médio de 3,5 dias no tempo do período pupal.

A longevidade de *H. armigera* foi significativamente afetada pelas dietas artificiais. Adultos machos ( $F_{3,36} = 13,07$ ;  $P < 0,0001$ ) e fêmeas ( $F_{3,36} = 17,46$ ;  $P < 0,0001$ ) oriundos das dietas AG e MAG apresentaram maior longevidade em comparação com os adultos das dietas SF e DS. Com relação à longevidade dos adultos sem alimento, tanto machos ( $F_{3,36} = 7,56$ ;  $P = 0,0005$ ) quanto fêmeas ( $H_{3,36} = 13,77$ ;  $P = 0,0032$ ) apresentaram menor longevidade quando provenientes da Dieta SF.

Tabela 2. Médias ( $\pm$  EP) dos parâmetros de desenvolvimento de *Helicoverpa armigera* alimentada em dietas artificiais. T  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; UR  $60 \pm 5\%$ ; Fotofase 12h.

Parâmetros	Dieta SF <sup>1</sup>	Dieta DS <sup>2</sup>	Dieta AG <sup>3</sup>	Dieta MAG <sup>4</sup>
<i>Período de desenvolvimento (dias)</i>				
Incubação	3,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,00	3,00 $\pm$ 0,00
Larval	23,53 $\pm$ 0,19 a	24,13 $\pm$ 0,33 a	18,19 $\pm$ 0,34 b	15,68 $\pm$ 0,12 c
Pupal	14,15 $\pm$ 0,20 a	13,23 $\pm$ 0,30 b	11,54 $\pm$ 0,16 c	11,84 $\pm$ 0,11 c
<i>Longevidade (dias) - Com alimento</i>				
Macho	14,90 $\pm$ 0,64 b	15,60 $\pm$ 0,75b	23,40 $\pm$ 2,08 a	23,90 $\pm$ 1,39 a
Fêmea	16,30 $\pm$ 0,52 b	17,30 $\pm$ 0,42 b	23,20 $\pm$ 1,42 a	25,60 $\pm$ 1,48 a
<i>Longevidade (dias) - Sem alimento</i>				
Macho	2,98 $\pm$ 0,18 b	3,98 $\pm$ 0,26 a	4,28 $\pm$ 0,20 a	3,86 $\pm$ 0,15 a
Fêmea	3,20 $\pm$ 0,11 c	3,90 $\pm$ 0,37 b	4,39 $\pm$ 0,22 a	3,93 $\pm$ 0,11 b
<i>Peso (mg) - Larva</i>				
Com 5 dias	6,14 $\pm$ 0,50 c	8,56 $\pm$ 0,85 c	17,91 $\pm$ 1,40 b	41,17 $\pm$ 2,27 a
Com 10 dias	24,44 $\pm$ 1,77 d	42,46 $\pm$ 5,71 c	125,32 $\pm$ 12,10 b	309,58 $\pm$ 18,22 a
<i>Peso (mg) - Pupa</i>				
Macho	264,53 $\pm$ 10,35 b	290,10 $\pm$ 2,78 b	350,86 $\pm$ 8,14 a	342,10 $\pm$ 6,84 a
Fêmea	251,81 $\pm$ 9,51 c	306,82 $\pm$ 9,96 b	342,80 $\pm$ 4,93 a	345,34 $\pm$ 4,08 a
<i>Peso (mg) - Adulto</i>				
Macho	186,82 $\pm$ 1,61 b	190,10 $\pm$ 5,67 b	238,37 $\pm$ 5,96 a	236,20 $\pm$ 10,11 a
Fêmea	199,37 $\pm$ 3,63 b	208,40 $\pm$ 5,57 b	230,46 $\pm$ 3,82 a	230,86 $\pm$ 3,44 a
<i>Sobrevivência (%)</i>				
Larval	62,00 $\pm$ 3,59 b	66,00 $\pm$ 1,63 b	85,00 $\pm$ 2,69 a	93,00 $\pm$ 3,00 a
Pupal	68,50 $\pm$ 4,54 b	74,29 $\pm$ 4,68 b	92,13 $\pm$ 2,84 a	96,89 $\pm$ 1,59 a
Imaturo total	43,00 $\pm$ 4,23 c	49,00 $\pm$ 3,14 c	78,00 $\pm$ 2,49 b	90,00 $\pm$ 2,98 a
<i>Índice de desenvolvimento</i>				
Larval	2,63 $\pm$ 0,15 c	2,77 $\pm$ 0,08 c	4,67 $\pm$ 0,14 b	5,94 $\pm$ 0,21 a
Pupal	4,91 $\pm$ 0,36 b	5,59 $\pm$ 0,39 b	7,74 $\pm$ 0,25 a	8,00 $\pm$ 0,12 a
Imaturo total	1,14 $\pm$ 0,12 c	1,32 $\pm$ 0,09 c	2,59 $\pm$ 0,09 b	3,24 $\pm$ 0,11 a
<i>Razão sexual</i>	0,42 $\pm$ 0,04 a	0,44 $\pm$ 0,04 a	0,53 $\pm$ 0,02 a	0,52 $\pm$ 0,05 a
<i>Fecundidade</i>	258,10 $\pm$ 28,87 b	344,90 $\pm$ 59,73 b	963,60 $\pm$ 147,17 a	1163,90 $\pm$ 135,20 a
<i>Fertilidade (%)</i>	44,32 $\pm$ 3,07 b	46,32 $\pm$ 2,66 b	55,62 $\pm$ 2,50 a	55,02 $\pm$ 2,07 a

Dieta artificial de <sup>1</sup>*Spodoptera frugiperda*; <sup>2</sup>*Diatraea saccharalis*; <sup>3</sup>*Anticarsia gemmatalis*; e <sup>4</sup>dieta modificada de *A. gemmatalis*.

Médias seguidas por letras diferentes nas linhas são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Fecundidade é o número de ovos postos ao longo de uma vida de uma fêmea.

Fertilidade é a porcentagem de ovos viáveis.

### 3.1.2 Peso nos estágios de desenvolvimento

Os dados do peso médio de lagartas, pupas e adultos de *H. armigera* criada nas dietas artificiais estão apresentados na Tabela 2. Lagartas com cinco ( $F_{3,36} = 135,58$ ;  $P < 0,0001$ ) e 10 dias ( $F_{3,36} = 156,99$ ;  $P < 0,0001$ ) de idade alimentadas na Dieta MAG tiveram maior ganho de peso, diferindo significativamente dos pesos larvais obtidos nas demais dietas. O menor ganho de peso foi observado nas lagartas criadas nas dietas SF e DS, enquanto aquelas alimentadas na Dieta AG apresentaram peso intermediário. Na fase de pupa, os maiores pesos de machos ( $H_{3,36} = 27,73$ ;  $P = 0,0001$ ) e fêmeas ( $H_{3,36} = 26,46$ ;  $P < 0,0001$ ) foram observados nas pupas criadas nas dietas AG e MAG, e os menores nas dietas SF e DS.

Adultos machos ( $H_{3,36} = 24,30$ ;  $P = 0,0001$ ) e fêmeas ( $F_{3,36} = 14,30$ ;  $P < 0,0001$ ) alimentados na fase larval com as dietas AG e MAG apresentaram os maiores pesos, diferindo significativamente dos pesos obtidos nas dietas SF e DS, as quais não diferiram entre si.

### 3.1.3 Sobrevivência e índice de desenvolvimento

Os dados de sobrevivência e índice de desenvolvimento das fases imaturas de *H. armigera* alimentada com dietas artificiais estão apresentados na Tabela 2. A dieta artificial afetou significativamente a sobrevivência das fases larval ( $F_{3,36} = 27,90$ ;  $P < 0,0001$ ) e pupal ( $F_{3,36} = 14,13$ ;  $P < 0,0001$ ) de *H. armigera*. Insetos alimentados nas dietas AG e MAG apresentaram sobrevivência de ambas as fases superior em comparação à sobrevivência dos insetos alimentados nas dietas SF e DS. Considerando a sobrevivência de toda a fase imatura, observou-se maior ( $H_{3,36} = 31,34$ ;  $P < 0,0001$ ) sobrevivência (90%) dos insetos na Dieta MAG. De forma geral, os índices de desenvolvimento larval ( $F_{3,36} = 108,61$ ;  $P < 0,0001$ ), pupal ( $H_{3,36} = 26,93$ ;  $P < 0,0001$ ) e total de imaturos ( $F_{3,36} = 95,09$ ;  $P < 0,0001$ ) diferiram significativamente entre os tratamentos; os maiores índices foram observados em insetos alimentados com a Dieta MAG, os menores índices nas dietas SF e DS, e índices intermediários na Dieta AG.

### 3.1.4 Deformidade

A ocorrência de pupas e adultos deformados em *H. armigera* nas dietas artificiais está apresentada na Figura 1. As deformidades morfológicas das pupas ( $F_{3,36} = 7,68$ ;  $P = 0,0004$ ) e adultos ( $F_{3,36} = 4,40$ ;  $P = 0,0097$ ) foram significativamente influenciadas pelas dietas artificiais, onde as menores porcentagens de deformação nas fases pupal (2,11%) e adulta (3,47%) ocorreram nos insetos alimentados na Dieta MAG, enquanto as maiores porcentagens foram observadas na Dieta DS (25,72% em pupas e 18,50% em adultos).

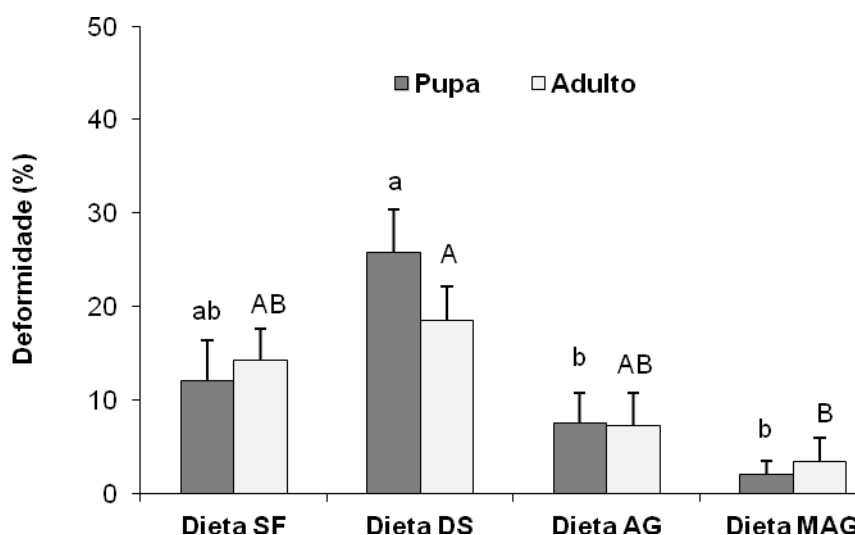


Figura 1. Porcentagem média (+ EP) de deformidades de pupa e adulto de *Helicoverpa armigera* em dietas artificiais. Dieta artificial de *Spodoptera frugiperda* (Dieta SF); *Diatraea saccharalis* (Dieta DS); *Anticarsia gemmatalis* (Dieta AG); e dieta modificada de *A. gemmatalis* (Dieta MAG). Barras escuras sobrescritas com letras minúsculas ou barras claras sobrescritas com letras maiúsculas diferem significativamente ( $P < 0,05$ ). T  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; UR  $60 \pm 5\%$ ; Fotofase 12h.

### 3.1.5 Razão sexual, fecundidade e fertilidade

Os dados de razão sexual, número total de ovos e fertilidade de ovos de *H. armigera* nas dietas artificiais estão apresentados na Tabela 2. A razão sexual de *H. armigera* ( $F_{3,36} = 1,93$ ;  $P = 0,1415$ ) foi semelhante entre as dietas. Por outro lado, a dieta artificial consumida durante a fase larval influenciou significativamente ( $F_{3,36} =$

25,48;  $P < 0,0001$ ) a fecundidade das fêmeas; as dietas AG (963,60) e MAG (1163,90) proporcionaram fêmeas com fecundidade superior em comparação às fêmeas produzidas nas dietas SF (258,10) e DS (344,90). Além disso, a fertilidade dos ovos também foi significativamente ( $H_{3,36} = 11,70$ ;  $P = 0,0085$ ) influenciada pelo alimento recebido na fase imatura. A fertilidade dos ovos nas dietas SF (44,32) e DS (46,32) foram inferiores em comparação com as dietas AG (55,62) e MAG (55,02), o que sugere que o alimento oferecido ao inseto na fase imatura proporciona efeito adverso na capacidade reprodutiva da espécie.

### 3.1.6 Fecundidade e fertilidade diária

Embora o número médio de ovos/fêmea tenha variado em função da alimentação larval de *H. armigera*, a oviposição e a fertilidade ao longo do período reprodutivo apresentaram um padrão similar. O pico de oviposição ocorreu entre o sétimo e o décimo dia após a emergência das fêmeas, e a curva de fertilidade foi similar ao padrão da curva de oviposição (Figura 2). Entretanto, nota-se um alongamento no período de oviposição e a ocorrência de dois picos de postura nas dietas AG e MAG. O período de oviposição iniciou aproximadamente três dias após a emergência das fêmeas e variou conforme a dieta oferecida durante a fase larval, sendo de 18, 19, 28 e 29 dias nas dietas SF, DS, MAG e AG, respectivamente (Figura 2).

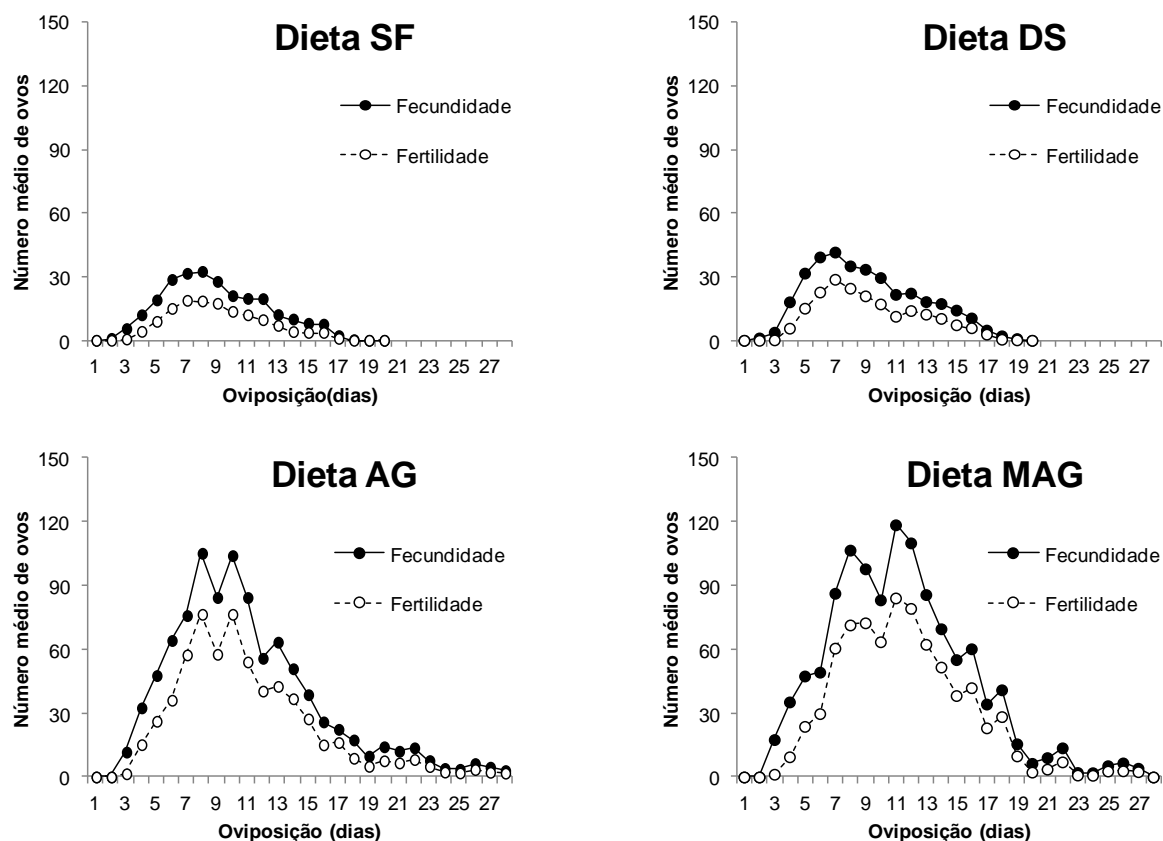


Figura 2. Número médio diário de ovos e fertilidade de ovos por fêmea de *Helicoverpa armigera* em dietas artificiais. Dieta artificial de *Spodoptera frugiperda* (Dieta SF); *Diatraea saccharalis* (Dieta DS); *Anticarsia gemmatalis* (Dieta AG); e dieta modificada de *A. gemmatalis* (Dieta MAG). T  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; UR  $60 \pm 5\%$ ; Fotofase 12h.

### 3.2 Índices nutricionais

Todos os índices nutricionais de *H. armigera* alimentada nas dietas artificiais diferiram significativamente, e os resultados estão apresentados na Tabela 3. Lagartas alimentadas nas dietas SF e MAG apresentaram os maiores valores de RCR ( $F_{3,36} = 24,89$ ;  $P < 0,0001$ ). Os maiores valores de RGR ( $F_{3,36} = 136,07$ ;  $P < 0,0001$ ) e ECD ( $F_{3,36} = 98,02$ ;  $P < 0,0001$ ) foram observados em lagartas alimentadas na Dieta MAG, diferindo significativamente das demais dietas artificiais. As ECIs ( $F_{3,36} = 159,34$ ;  $P < 0,0001$ ) mais elevadas foram obtidas em lagartas alimentadas nas dietas AG e MAG, diferindo significativamente das demais. Lagartas de *H. armigera* alimentadas na dieta MAG tiveram o menor MC ( $F_{3,36} = 98,02$ ;  $P < 0,0001$ ). Por outro lado, lagartas alimentadas com a Dieta AG apresentaram o menor



RMR ( $F_{3,36} = 26,46$ ;  $P < 0,0001$ ), enquanto os maiores valores foram observados nas dietas DS e SF. Quanto a AD, verificou-se maior valor ( $F_{3,36} = 320,34$ ;  $P < 0,0001$ ) para lagartas alimentadas na Dieta DS. Os menores valores de IC ( $F_{3,36} = 129,32$ ;  $P < 0,0001$ ) foram observados em lagartas de *H. armigera* alimentadas nas dietas AG e MAG.

Tabela 3. Índices nutricionais de *Helicoverpa armigera* em dietas artificiais. T  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; UR  $60 \pm 5\%$ ; Fotofase 12h.

Índices nutricionais	Dieta SF <sup>1</sup>	Dieta DS <sup>2</sup>	Dieta AG <sup>3</sup>	Dieta MAG <sup>4</sup>
RCR (mg/mg/dia)	0,95 $\pm$ 0,03 a	0,81 $\pm$ 0,03 b	0,68 $\pm$ 0,01 c	0,88 $\pm$ 0,02 ab
RGR (mg/mg/dia)	0,07 $\pm$ 0,00 d	0,08 $\pm$ 0,00 c	0,10 $\pm$ 0,00 b	0,13 $\pm$ 0,00 a
RMR (mg/mg/dia)	0,44 $\pm$ 0,01 ab	0,58 $\pm$ 0,03 a	0,38 $\pm$ 0,01 c	0,43 $\pm$ 0,02 b
CI (mg/mg)	26,67 $\pm$ 0,72 a	19,66 $\pm$ 0,80 b	14,44 $\pm$ 0,28 c	13,97 $\pm$ 0,28 c
AD (%)	53,08 $\pm$ 0,69 d	82,10 $\pm$ 0,75 a	70,22 $\pm$ 0,42 b	62,88 $\pm$ 0,81 c
ECI (%)	7,73 $\pm$ 0,21 c	10,56 $\pm$ 0,35 b	14,35 $\pm$ 0,25 a	14,68 $\pm$ 0,22 a
ECD (%)	15,04 $\pm$ 0,55 c	12,96 $\pm$ 0,51 d	20,68 $\pm$ 0,38 b	23,73 $\pm$ 0,54 a
MC (%)	84,96 $\pm$ 0,55 b	87,04 $\pm$ 0,51 a	79,32 $\pm$ 0,38 c	76,27 $\pm$ 0,54 d

Dieta artificial de <sup>1</sup>*Spodoptera frugiperda*; <sup>2</sup>*Diatraea saccharalis*; <sup>3</sup>*Anticarsia gemmatalis*; e <sup>4</sup>dieta modificada de *A. gemmatalis*.

RCR - Taxa de consumo relativo; RGR - Taxa de crescimento relativo; RMR - Taxa metabólica relativa; CI - Índice de consumo; AD - Digestibilidade aproximada; ECI - Eficiência de conversão do alimento ingerido; ECD - Eficiência de conversão do alimento digerido; MC - Custo metabólico.

Médias seguidas por letras diferentes nas linhas são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

### 3.3 Índices populacionais

Os dados dos índices populacionais de *H. armigera* nas dietas artificiais estão apresentados na Tabela 4. Os valores da taxa líquida de reprodução ( $R_o$ ) de *H. armigera* nas dietas artificiais diferiram significativamente ( $F_{3,20} = 126,34$ ;  $P < 0,0001$ ), evidenciando que a dieta artificial disponibilizada aos insetos na fase imatura interfere na capacidade de aumento populacional entre gerações. Para as dietas AG e MAG, a taxa líquida de reprodução de *H. armigera* demonstrou aumento na geração de aproximadamente 8,5 e 12,5 vezes, respectivamente, em relação à Dieta SF. As dietas SF e DS proporcionaram reduzidas taxas líquidas de reprodução, tendendo a promover o menor crescimento populacional do inseto, visto que o incremento populacional depende do número de fêmeas sobreviventes e da produção individual em cada geração.

Tabela 4. Índices populacionais de *Helicoverpa armigera* alimentada em dietas artificiais. T  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; UR  $60 \pm 5\%$ ; Fotofase 12h.

Dietas	Dieta SF <sup>1</sup>	Dieta DS <sup>2</sup>	Dieta AG <sup>3</sup>	Dieta MAG <sup>4</sup>
Ro (♀)	28,85 $\pm$ 2,32 c	46,67 $\pm$ 7,66 b	246,00 $\pm$ 27,49 a	361,13 $\pm$ 22,35 a
$r_m$ (♀/♀/dia)	0,07 $\pm$ 0,00 d	0,08 $\pm$ 0,00 c	0,12 $\pm$ 0,00 b	0,14 $\pm$ 0,00 a
T (dia)	48,97 $\pm$ 0,26 a	47,22 $\pm$ 0,35 a	44,95 $\pm$ 1,08 ab	42,24 $\pm$ 0,51 b
$\lambda$ (♀/dia)	1,07 $\pm$ 0,00 d	1,08 $\pm$ 0,00 c	1,13 $\pm$ 0,00 b	1,15 $\pm$ 0,00 a
Dt (dia)	10,21 $\pm$ 0,36 a	8,73 $\pm$ 0,36 b	5,70 $\pm$ 0,13 c	4,98 $\pm$ 0,07 d

Dieta artificial de <sup>1</sup>*Spodoptera frugiperda*; <sup>2</sup>*Diatraea saccharalis*; <sup>3</sup>*Anticarsia gemmatalis*; e <sup>4</sup>dieta modificada de *A. gemmatalis*.

Ro - Taxa líquida de reprodução;  $r_m$  - Taxa intrínseca de crescimento; T - Tempo de geração;  $\lambda$  - Taxa finita de aumento; Dt - Tempo de duplicação.

Médias seguidas por letras diferentes nas linhas são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

Os valores da taxa intrínseca de crescimento ( $r_m$ ) foram positivos, indicando aumentos populacionais de *H. armigera* nas quatro dietas avaliadas. Entretanto, houve diferenças significativas ( $F_{3,20} = 205,24$ ;  $P < 0,0001$ ) entre as dietas, sendo a  $r_m$  superior na Dieta MAG, inferior na Dieta SF, e intermediária nas dietas DS e AG.

O tempo de geração (T) de *H. armigera* foi menor na Dieta MAG, diferindo significativamente ( $H_{3,20} = 16,65$ ;  $P = 0,0008$ ) das dietas SF e DS. A partir desses resultados, é possível obter 7,45; 7,72; 8,12 e 8,64 gerações por ano, quando lagartas de *H. armigera* são criadas com as dietas SF, DS, AG e MAG, respectivamente.

Quanto à razão finita de aumento ( $\lambda$ ), houve diferença significativa ( $F_{3,20} = 134,10$ ;  $P < 0,0001$ ) entre as dietas artificiais, sendo maior na Dieta MAG.

O período de tempo necessário para a população inicial de *H. armigera* dobrar em tamanho (Dt) foi significativamente afetado pela dieta artificial que as lagartas receberam ( $F_{3,20} = 161,74$ ;  $P < 0,0001$ ). O grupo de insetos alimentados na Dieta MAG apresentou o menor período, indicando que o inseto tem condições de dobrar a população em aproximadamente cinco dias, o que é extremamente importante em uma criação massal. Os insetos alimentados nas demais dietas apresentaram valores de Dt significativamente maiores em relação aos da Dieta MAG, e diferentes entre si.

#### 4 Discussão

O presente estudo demonstra os efeitos da variação de ingredientes e valor nutricional de dietas artificiais desenvolvidas para espécies de Lepidoptera no desenvolvimento de *H. armigera*, em laboratório. Os resultados indicaram que os principais fatores que influenciaram os índices biológicos de *H. armigera* foram as variações quantitativas e qualitativas dos ingredientes. Entretanto, a relação proteína: carboidrato e as características físicas das dietas, possivelmente, foram variáveis importantes que influenciaram no desenvolvimento de *H. armigera* e sendo consistentes com resultados de estudos anteriores (TELANG et al., 2001; LEE et al., 2002; LEE, 2010; ASSEMI et al., 2012). Além disso, esse estudo compara de forma detalhada os efeitos da variação da composição de dietas artificiais sobre aspectos da fase imatura e adulta de *H. armigera*, correlacionando-os com os efeitos nutricionais proporcionados pelas dietas, além de estimar o crescimento populacional do inseto em laboratório em longo prazo.

Os parâmetros de desenvolvimento de *H. armigera* revelaram que o inseto foi capaz de completar o ciclo biológico nas quatro dietas avaliadas. No entanto, a Dieta AG e a Dieta MAG, com melhor proporção entre proteínas e carboidratos, produziram indivíduos com crescimento contínuo e maior sobrevivência. Segundo Simpson et al. (2004), é primordial fornecer uma alimentação nutricionalmente equilibrada para a criação de insetos, de forma que ocorra o mínimo custo adaptativo. A variação nos parâmetros de desenvolvimento de *H. armigera* entre as dietas pode estar relacionada com o custo adaptativo associado à fonte alimentar; lagartas de *H. armigera* apresentaram maior aceitação do alimento em dietas mais equilibradas em proteínas e carboidratos em comparação com dietas com menores proporções desses nutrientes.

Outra interferência na aceitação do alimento por *H. armigera* pode estar relacionada com as características físicas da dieta artificial. A textura da dieta tem grande influência na palatabilidade e digestibilidade do alimento pelos insetos (COHEN, 2015). Visualmente, as dietas aqui avaliadas apresentaram características físicas semelhantes; entretanto, o ágar, cujas principais funções são de promover

efeito gelificante, auxiliar na mobilidade do alimento no sistema digestivo do inseto, e fornecer alguns sais minerais (P, Fe, K, Cl e I), foi quantitativamente diferente nas dietas. Assemi et al. (2012) investigaram a influência dos componentes da dieta artificial sobre o desenvolvimento de *H. armigera*, e verificaram que a quantidade de ágar na dieta artificial está diretamente relacionada com o rendimento da criação massal. Assim, o melhor desempenho de *H. armigera* na Dieta MAG, cuja proporção de ágar e água foi de 1:60, possivelmente se deu em função das melhores características físicas da dieta, proporcionadas pela proporção mais adequada entre ágar, água e os demais ingredientes da formulação da dieta. As dietas SF, AG e DS apresentaram 1:52, 1:74 e 1:80, respectivamente na proporção de ágar e água.

Embora a “hipótese do crescimento lento - alta mortalidade” tenha sido utilizada para explicar interações entre os níveis tróficos de um ecossistema (BENREY; DENNO, 1997), pode-se também aceitar que a hipótese seja aplicável em avaliações de dietas artificiais para insetos em laboratório, uma vez que se evidenciou maior mortalidade de indivíduos de *H. armigera* com maior tempo de desenvolvimento. Para a verificação dessa hipótese, considerou-se o índice de desenvolvimento (ID) como o parâmetro que proporciona melhor compreensão da relação entre a sobrevivência do inseto e o tempo gasto para completar determinada fase de desenvolvimento. Os menores valores de ID em *H. armigera* foram observados nas dietas artificiais que promoveram maior mortalidade e maior tempo no período de desenvolvimento dos estágios imaturos. Por outro lado, a Dieta MAG forneceu o maior ID em decorrência da menor mortalidade e menor tempo de desenvolvimento, enquanto na Dieta AG não se verificou diferença significativa na mortalidade, embora o tempo de desenvolvimento tenha sido significativamente maior, com reflexo no ID. Assim, conclui-se que ao analisar a relação entre esses dois parâmetros biológicos, pode-se com maior confiabilidade selecionar uma dieta artificial mais adequada a *H. armigera*.

A maior ocorrência de deformações em pupas e adultos de *H. armigera* foi observada nos insetos que apresentaram menor desempenho da fase larval. A principal característica de deformação verificada no presente estudo foi a quitinização incompleta dos três primeiros segmentos abdominais na superfície ventral da pupa, o enrolamento das asas, e a retenção da exúvia no inseto adulto. A

ocorrência de anomalias morfológicas em insetos criados em dietas artificiais está associada principalmente com a quantidade de proteína presente nas formulações (HOUSE, 1963).

A abordagem nutricional quantitativa consiste em aferir a quantidade de alimento consumido, digerido, assimilado, excretado, metabolizado e convertido em biomassa, revelando assim os efeitos no desenvolvimento do inseto em resposta a diferentes alimentos (SCRIBER; SLANSKY Jr., 1981). No presente estudo foram utilizados índices nutricionais para avaliar o comportamento alimentar de lagartas de *H. armigera* em quatro dietas artificiais. Os resultados obtidos a partir desses índices sugerem que as dietas AG e MAG foram as que melhor atenderam as exigências nutricionais de *H. armigera*. Segundo Jha, Chi e Tang (2012), a capacidade de conversão dos alimentos consumidos, especialmente proteínas, promoverá maior crescimento e desempenho reprodutivo em insetos polívoros. Os dados dos índices nutricionais indicaram que, na ausência de uma dieta artificial adequada, muitos insetos desenvolveram nas dietas SF e DS, de menor qualidade nutricional; entretanto, a alimentação em dietas desbalanceadas força o inseto a consumir em excesso um determinado nutriente e pouco de outro (BAGHERY; FATHIPOUR; NASERI, 2013).

Seguindo o conceito de ecologia nutricional (SCRIBER; SLANSKY Jr., 1981; SLANSKY JR.; SCRIBER, 1985; SLANSKY JR., 1993), a análise geral dos resultados demonstra que lagartas de *H. armigera* que se alimentaram das dietas AG e MAG maximizaram a eficiência de utilização das dietas, com menores consumos e altas eficiências de conversão do alimento ingerido e digerido em relação ao ganho de biomassa, resultando em insetos mais vigorosos. Por outro lado, aquelas que se alimentaram nas dietas SF e DS tentaram compensar a menor adequação nutricional modificando seu comportamento em relação à tomada do alimento, aumentando a ingestão da dieta. Entretanto, esse esforço resultou em maior gasto de energia no metabolismo, com baixas eficiências na conversão do alimento ingerido e digerido. Segundo Raubenheimer e Barton Browne (2000), a combinação do aumento da duração do estágio de desenvolvimento e as taxas de ingestão refletem a necessidade de sustentar as exigências nutricionais de *H. armigera* para crescimento. Assim, pode-se concluir que o maior consumo de *H.*

*armigera* nas dietas SF e DS combinado com o alongamento nos períodos de desenvolvimento da fase imatura estejam possivelmente relacionados com o menor teor de proteínas nessas dietas.

O alimento ingerido na fase larval é de grande importância para insetos holometábolos, pois deve atender corretamente às necessidades nutricionais para que ocorra um desenvolvimento satisfatório, de modo que os indivíduos cheguem à fase adulta aptos à dispersão e reprodução (SCHOWALTER, 2011; PARRA; PANIZZI; HADDAD, 2012). Dietas artificiais utilizadas como fonte de alimento para insetos diferem muito na adequação quando avaliadas em relação à capacidade reprodutiva (COHEN, 2001). Mariposas maiores no momento da emergência, e conseqüentemente com maiores reservas de gordura, são presumivelmente mais hábeis em alocar recursos metabólicos para reprodução em comparação com mariposas menores (HONEK, 1993; ARRESE; SOULAGES, 2010). No presente estudo, a fecundidade e a fertilidade de *H. armigera* foram influenciadas pela alimentação recebida na fase imatura. Fêmeas oriundas de lagartas alimentadas com as dietas AG e MAG produziram ovos em maior número e mais férteis do que fêmeas provenientes das dietas SF e DS.

A variação no desempenho reprodutivo dos insetos está relacionada com a quantidade de proteína requerida na fase larval para a subsequente produção de ovos na fase adulta (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013). O número de ovos produzidos por *H. armigera* alimentada na fase larval com as dietas AG (963,6) e MAG (1163,9) foram superiores em relação ao número de ovos observados em outros estudos com dietas artificiais para a espécie, variando de 260,0 a 845,1 (WU; GONG, 1997; AHMED; KHALIQUE; MALIK, 1998; ABBASI et al., 2007; ASSEMI et al., 2012; JHA, CHI, TANG, 2012; AMER et al., 2014). Resultados semelhantes para a fecundidade de *H. armigera* também foram encontrados, onde o número de ovos variou entre 1099,5 e 1130 (WU; GONG, 1997; MIRONIDIS, 2014). Embora as divergências observadas na fertilidade possam estar também relacionadas com as condições estruturais ou com a variação do potencial reprodutivo da população do inseto (COHEN, 2015), ficou evidente o elevado desempenho reprodutivo de *H. armigera* nas dietas AG e MAG no presente estudo.

A capacidade de crescimento da população de *H. armigera* foi altamente influenciada pela alimentação na fase larval, e as taxas líquidas de reprodução nas dietas AG e MAG confirmaram seu maior sucesso reprodutivo em comparação com as dietas SF e DS. Esses resultados demonstram o elevado potencial biótico de *H. armigera* quando alimentada em dietas artificiais que oferecem condições alimentares adequadas. Considerando as condições de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 5\%$  de umidade relativa, e fotofase de 12 horas como ótimas para essa espécie, a variação no tempo de geração entre as dietas e o menor tempo observado demonstraram que o alimento disponibilizado na fase larval interfere no tempo decorrente do nascimento dos parentais ao nascimento dos seus descendentes. Valores baixos para esse parâmetro são desejáveis em criações massais de insetos, pois quanto menor o seu valor, maior o número de gerações anuais. A taxa intrínseca de crescimento, que está relacionada com a fecundidade, mortalidade, e tempo de geração de uma população de insetos em aumentar em um ambiente (BIRCH, 1948), foi diferente entre as dietas avaliadas. Investigações com dieta artificial para alimentação de *H. armigera* demonstraram variações nas taxas intrínsecas de crescimento, porém, essas divergências podem estar relacionadas com a diferença qualitativa e quantitativa do alimento, condições estruturais, e métodos analíticos (JHA, CHI, TANG, 2012; MIRONIDIS, 2014). Quando dietas artificiais são comparadas, o valor da taxa intrínseca de crescimento mais elevado indica que a dieta tem as melhores características para a multiplicação do inseto, enquanto um valor baixo indica que a dieta artificial não fornece as condições necessárias para seu desenvolvimento (COHEN, 2015). Foi verificado um maior número de fêmeas adicionadas à população por fêmea por unidade de tempo, representada pela taxa finita de aumento e um menor tempo de duplicação na Dieta MAG. Assim, a avaliação das dietas artificiais por meio de índices de crescimento populacional forneceu melhores subsídios para a escolha da dieta mais indicada para alimentação de *H. armigera* em uma criação massal, evidenciando a relação do equilíbrio nutricional do alimento na fase larval com o aumento populacional do inseto.

Para uma dieta artificial ser considerada adequada em criações massais de insetos, primeiramente a dieta deve ser avaliada para verificar se atende às

exigências nutricionais do inseto estudado, confirmado pela aceitação do alimento e pleno desenvolvimento. Posteriormente, avaliações por um número de gerações são necessárias para confirmar a real capacidade da dieta em manter os parâmetros biológicos do inseto de forma que não ocorram grandes alterações no potencial biótico da espécie (COHEN, 2015). Após a comprovação da adequação da dieta MAG para o desenvolvimento de *H. armigera* nesse estudo, essa dieta foi utilizada com êxito por mais de 12 gerações na criação massal do inseto, e a população do laboratório não apresentou qualquer efeito adverso em parâmetros do desenvolvimento e potencial reprodutivo.

O presente estudo demonstrou que um entendimento mais abrangente pode ser adquirido por meio da utilização em conjunto dos índices de desenvolvimento, nutricionais e populacionais na seleção de dieta artificial para criação de *H. armigera* em laboratório. Além disso, os resultados desse trabalho também destacaram a importância das características físicas da dieta na aceitação do inseto pelo alimento, e os resultados sugeriram que pequenas variações na relação proteína: carboidrato pode causar efeitos drásticos na criação de *H. armigera*. Assim, com a utilização de dieta artificial para *H. armigera*, originária de modificação da dieta para a lagarta-da-soja, é de se esperar que os estudos básicos e aplicados promovam informações consistentes no auxílio ao MIP, gerando ações que regulem a população do inseto e que limitem sua dispersão para outras regiões do mundo com importância agrícola, contribuindo em última análise com a segurança alimentar.

## 5 Conclusão

A dieta artificial MAG, originária de modificação da dieta para a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae) desenvolvida por Greene, Leppla e Dickerson (1976), é a dieta recomendada para criação massal de *Helicoverpa armigera*.

Componentes dietéticos, quantitativos e qualitativos, interferem no desenvolvimento de *H. armigera*.



Outros fatores como as características físicas da dieta e a relação proteína: carboidrato têm papel relevantes na aceitação do alimento e no desenvolvimento de *H. armigera*.

## 6 Referências

ABBASI, B. H.; AHMED, K.; KHALIQUE, F.; AYUB, N.; LIU, H. J.; KAZMI, S. A. R.; AFTAB, M. N. Rearing the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, on a tapioca-based artificial diet. **Journal of Insect Science**, Annapolis, v. 7, p. 1-7, 2007.

AHMED, K.; KHALIQUE, F.; MALIK, B. A. Modified artificial dieta for mass rearing of chickpea pod borer, *Helicoverpa (Heliothis) armigera* (Hübner). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Dubai, v. 1, p. 183-187, 1998.

AMER, A. E. A.; EL-SAYED, A. A. A. Effect of different host plants and artificial diet on *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) development and growth index. **Journal of Entomology**, London, v. 11, p. 299-305, 2014.

ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 55, p. 207-225, 2010.

ASSEMI, H.; REZAPANAH, M.; VAFAEI-SHOUSHTARI, R.; MEHRVAR, A. Modified artificial diet for rearing of tobacco budworm, *Helicoverpa armigera*, using the Taguchi method and Derringer's desirability function. **Journal of Insect Science**, Annapolis, v. 12, p. 1-18, 2012.

BAGHERY, F.; FATHIPOUR, Y.; NASERI, B. Nutritional indices of *Helicoverpa armigera* (Lep.: Noctuidae) on seeds of five host plants. **Applied Entomology and Phytopathology**, Tehran, v. 80, p. 19-27, 2013.

BARTON BROWNE, L.; RAUBENHEIMER, D. Ontogenetic changes in the rate of ingestion and estimates of food consumption in fourth and fifth instar *Helicoverpa armigera* caterpillars. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, p. 63-71, 2003.

BEHERE, G. T.; TAY, W. T.; RUSSELL, D. A.; KRANTHI, K. R.; BATTERHAM, P. Population genetic structure of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in India as inferred from EPIC-PCR DNA markers. **Plos One**, San Francisco, v. 8, e53448, 2013.

BEHMER, S. T. Insect herbivore nutrient regulation. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 54, p. 165-187, 2009.

BENREY, B.; DENNO, R. F. The slow-growth–high-mortality hypothesis: a test using the cabbage butterfly. **Ecology**, Tempe, v. 78, p. 987-999, 1997.

BIRCH, L. C. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. **The Journal of Animal Ecology**, Oxford, v. 17, p. 15-26, 1948.

BUTT, B. A.; CANTU, E. **Sex determination of lepidopterous pupae**. Washington: USDA, 1962. p. 1-7.

CAREY, F. G. **Applied demography for biologists with special emphasis on insects**. New York: Oxford University Press, 1993. p. 11-41.

CHAPMAN, R. F.; SIMPSON, S. J.; DOUGLAS, A. E. **The insects: structure and function**. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. p. 81-107.

COHEN, A. C. Formalizing insect rearing and artificial diet technology. **American Entomologist**, Lanham, v. 47, p. 198-206, 2001.

COHEN, A. C. **Insect diets: science and technology**. Boca Raton: CRC Press, 2015. p. 1-164.

FANSON, B. G.; TAYLOR, P. W. Protein:carbohydrate ratios explain life span patterns found in Queensland fruit fly on diets varying in yeast:sugar ratios. **American Aging Association**, Philadelphia, v. 34, p. 1361-1368, 2012.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 69, p. 487-488, 1976.

GUREVITCH, J.; PADILHA, D. K. Are invasive species a major cause of extinctions?. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 19, p. 470-474, 2004.

HAMED, M.; NADEEM, S. Rearing of *Helicoverpa armigera* (Hub.) on artificial diets in laboratory. **Pakistan Journal of Zoology**, Lahore, v. 40, p. 447-450, 2008.

HONEK, A. Intraspecific variation in body size and fecundity in insects: a general relationship. **Oikos**, Copenhagen, v. 66, p. 483-492, 1993.

HOUSE, H. L. Insect nutrition. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 6, p. 13-26, 1963.

JHA, R. K.; CHI, H.; TANG, L. C. A comparison of artificial diet and hybrid sweet corn for the rearing of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) based on life table characteristics. **Environmental Entomology**, College Park, v. 41, p. 30-39, 2012.

KASTEN JR, P.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 53, p. 68-78, 1978.

KING, E. G.; HARTLEY, G. G. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH, P.; MOORE, R. F. (Eds.). **Handbook of insect rearing**. New York: Elsevier, 1985. p. 265-270.

KRISHNAREDDY, B.; HANUR, V. S. Enhanced synthetic diet for rearing *H. armigera* under laboratory conditions. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, Nova Deli, v. 3, p. 165-167. 2015.

KRITICOS, D. J.; OTA, N.; HUTCHISON, W. D.; BEDDOW, J.; WALSH, T.; TAY, W. T.; BORCHERT, D. M.; PAULA-MORAES, S. V.; CZEPAK, C.; ZALUCKI, M. P. The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: is it just a matter of time?. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, e0133224, 2015.

LEE, K. P.; BEHMER, S. T.; SIMPSON S. J.; RAUBENHEIMER, D. Geometric analysis of nutrient regulation in the generalist caterpillar *Spodoptera littoralis* (Boisduval). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 48, p. 655-665, 2002.

LEE, K. P. Sex-specific differences in nutrient regulation in a capital breeding caterpillar, *Spodoptera litura* (Fabricius). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 56, p. 1685-1695, 2010.

MAIA, A. H. N.; LUIZ, A. J. B.; CAMPANHOLA, C. Statistical inference on associated fertility life table parameters using Jackknife technique: computational aspects. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, p. 511-518, 2000.

MIRONIDIS, G. K. Development, survivorship and reproduction of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) under fluctuating temperatures. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 104, p. 751-764, 2014.

OJEDA-AVILA, T.; WOODS, H. A.; RAGUSO, R. A. Effects of dietary variation on growth, composition, and maturation of *Manduca sexta* (Sphingidae: Lepidoptera). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, 49, 293-306. 2003.

OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A. M.; MENDES, S. M.; FRIZZAS, M. R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, Guildford, v. 56, p. 50-54, 2014.

PARRA, J. R. P.; PANIZZI, A. R.; HADDAD, M. L. Nutritional indices for measuring food intake and utilization. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.) **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. Boca Raton: CRC Press, 2012. p. 13-49.

PIMENTEL, D.; ZUNIGA, R.; MORRISON, D. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 52, p. 273-288, 2005.

RAUBENHEIMER, D.; BARTON BROWNE, L. Developmental changes in the patterns of feeding in fourth- and fifth-instar *Helicoverpa armigera* caterpillars. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 25, p. 390-399, 2000.

SAS INSTITUTE. Sas/Stat User Software: Changes and 14 Enhancements through Release. Estados Unidos, Cary. Version 9.3. 2011.

SCHOWALTER, T. D. **Insect ecology: an ecosystem approach**. San Diego: Elsevier, 2011. p. 53-93.

SCRIBER, J. M.; SLANSKY JR., F. The nutritional ecology of immature insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 26, p. 183-211, 1981.

SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O.; BARBIN, D.; VILLA NOVA, N. A. **Manual de ecologia dos insetos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1976. p. 175-283.

SIMPSON, S. J.; RAUBENHEIMER, D. **The nature of nutrition**: a unifying framework from animal adaptation to human obesity. Princeton: Princeton University Press, 2012. p. 167-193.

SIMPSON, S. J.; SIBLY, R. M.; LEE, K. P.; BEHMER, S. T.; RAUBENHEIMER, D. Optimal foraging when regulating intake of multiple nutrients. **Animal Behaviour**, London, v. 68, p. 1299-1311, 2004.

SINGH, A. K.; REMBOLD, H. Developmental value of chickpea, *Cicer arietinum*, soybean, *Glycine max* and maize, *Zea mays* flour for *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 106, p. 286-296, 1988.

SINGH, P. Multiple species rearing diets. In: SINGH, P.; MOORE, R. F. (Eds.) **Handbook of insects rearing**. Amsterdam: Elsevier, 1985. p. 19-44.

SLANSKY JR, F. Nutritional ecology: The fundamental quest for nutrients. In: STAMP, N. E.; CASEY, T. M. (Eds.). **Caterpillars**: ecological and evolutionary constraints to foraging. New York: Chapman and Hall, 1993. p. 29-91.

SLANSKY JR, F.; SCRIBER, J. M. Food consumption and utilization. In: KERKUT, G. A.; GILBERT L. I. (Eds.). **Comprehensive insects physiology biochemistry and pharmacology 4**. Oxford: Pergamon Press, 1985. p. 87-163.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S. V.; LOPES-LIMA, A.; YANO, S. A. C.; MICHELI, A.; MORAIS, E. G. F.; GALLO, P.; PEREIRA, P. R. V. S.; SALVADORI, J. R.; BOTTON, M.; ZENKER, M. M.; AZEVEDO-FILHO, W. S. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliiothinae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 60, p. 101-104, 2016.

SOUTHWOOD, T. R. E. **Ecological methods with particular reference to the study of insect populations**. London: Chapman and Hall, 1978. p. 356-400.

SOUTHWOOD, T. R. E.; HENDERSON, P. A. **Ecological Methods**. Oxford: Blackwell Sciences, 2000. p. 404-433.

TAY, W. T.; SORIA, M. F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G. T.; ANDERSON, C.; DOWNES, S. A brave New World for an Old World pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Plos One**, San Francisco v. 8, e80134, 2013.

TELANG, A.; BOOTON, V.; CHAPMAN, R. F.; WHEELER, D. E. How female caterpillars accumulate their nutrient reserves. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 47, p. 1055-1064, 2001.

WALDBAUER, G. P. The consumption and utilization of food by insect. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v. 15, p. 229-288, 1968.

WU, K.; GONG, P. A new and practical artificial diet for the cotton bollworm. **Entomologia Sinica**, Shensi, v. 4, p. 277-282, 1997.

### **CAPÍTULO 3 - Metodologia de criação de *Helicoverpa armigera* para o bem-estar animal**

**RESUMO** – Criações massais de insetos em laboratório representam um componente chave no desenvolvimento de estratégias de Manejo Integrado de Pragas, e a elaboração e aplicação de eficientes procedimentos de criação são imprescindíveis para seu sucesso. No entanto, o êxito nos resultados de criações massais em laboratório não pode apenas se basear na limitada percepção de números, mas também na qualidade do inseto produzido, e se as condições estruturais utilizadas para a produção são suficientes para fornecer ao inseto adequado bem-estar. Este estudo procurou abordar os principais desafios enfrentados na criação de *Helicoverpa armigera* e identificar os processos de criação mais eficientes para a produção de insetos com desenvolvimento uniforme e com quantidade suficiente para serem utilizados em futuros programas de pesquisa em Manejo Integrado de Pragas. Também foi abordada a relevância dessa metodologia de criação massal com vista ao bem-estar da espécie em laboratório. O efeito no desenvolvimento larval de *H. armigera* foi analisado em condições de diferentes densidades, recipientes e formas de disponibilidade e quantidade de alimento. Para os adultos, três tamanhos de gaiolas e densidades de casais foram analisados. Em longo prazo, a metodologia proposta foi acompanhada em gerações subsequentes à definição do sistema de criação (12 gerações), registrando-se vários parâmetros de desenvolvimento como critérios de avaliação. Os resultados indicaram alterações nos parâmetros biológicos de *H. armigera* em função das condições oferecidas para o seu desenvolvimento nas fases larval e adulta. A sobrevivência e a fertilidade de *H. armigera* foram diretamente relacionadas com a densidade e o tamanho da gaiola de oviposição. A eficiência demonstrada na metodologia de criação facilita a produção massal de *H. armigera* em laboratório, com baixa complexidade operacional, fornecendo condições adequadas para o desenvolvimento do inseto, o que sugere bem-estar.

**Palavras-chaves:** densidade populacional, parâmetros biológicos, técnica de criação massal

### CHAPTER 3 - Rearing methodology of *Helicoverpa armigera* for animal welfare

**ABSTRACT** – Mass rearing of insects in the laboratory is a key component in the development of Integrated Pest Management strategies, and the elaboration and application of efficient procedures of rearing are essential for its success. However, the success of the results of mass rearing in the laboratory can not only be based on the limited perception of numbers, but also on the quality of the insect produced, and whether the structural conditions used for the production are sufficient to provide appropriate insect welfare. This study aimed to address the main challenges faced in the rearing of *Helicoverpa armigera* and to identify the most efficient rearing processes for the production of insects with uniform development and sufficient quantity to be used in future research programs in Integrated Pest Management. The relevance of this methodology of mass rearing for the welfare of the species in laboratory was also discussed. The effect on *H. armigera* larval development was analyzed under conditions of different densities, containers and forms of availability and quantity of food. For the adults, three sizes of cages and densities of couples were analyzed. In the long term, the proposed methodology was followed in generations following the definition of the rearing system (12 generations), recording several developmental parameters as evaluation criteria. Results indicated alterations in the biological parameters of *H. armigera* as a function of the conditions offered for its development in the larval and adult stages. Survival and fertility of *H. armigera* were directly related to the density and size of the oviposition cage. The efficiency demonstrated in the rearing methodology facilitates *H. armigera* mass production in the laboratory, with low operational complexity, providing adequate conditions for the insect development, which suggests welfare.

**Keywords:** population density, biological parameters, mass rearing technique



## 1 Introdução

Ao longo dos tempos, os insetos têm proporcionado ao homem grandes desafios na competição por alimento (BOXALL, 2001; OLIVEIRA et al., 2014; MEIJDEN, 2015). Em contrapartida, também é inegável a contribuição desempenhada nas interações benéficas com as plantas, como por exemplo, os polinizadores (BAILES et al., 2015) e o papel exercido por inimigos naturais no controle de pragas de cultivos agrícolas (MARTIN et al., 2013). Mediante a importante relação dos insetos com os ecossistemas, as criações de insetos, em muitos casos, são imprescindíveis.

Criações de insetos em larga escala cada vez mais tem adquirido importância quer seja como uma eficiente ferramenta de pesquisa acadêmica básica em estudos biológicos, fisiológicos e comportamentais (COHEN, 2001), ou quando aplicadas na alimentação animal (MAKKAR et al., 2014), humana (HUIS, 2012; RUMPOLD; SCHLÜTER, 2013) e na implementação de programas de manejo integrado de pragas (CHAMBERS, 1977; KOGAN, 1998; LEPPLA et al., 2014). Mesmo que tenham ocorrido grandes avanços em técnicas de criação de insetos, algumas lacunas no conhecimento ainda estão em aberto, principalmente quando se considera o bem-estar animal (SMITH, 1991; ERENS et al., 2012).

Embora em criações de insetos exista a tendência ilusória em se negligenciar o bem-estar, contrapondo outras criações de animais em cativeiro (MASON, 2010), discussões sobre o bem-estar na criação de insetos começam a ganhar maior relevância após sua utilização na alimentação humana (ERENS et al., 2012; DeGOEDE et al., 2013). No entanto, esta abordagem deve ser considerada em qualquer que seja a finalidade da criação, por diversos motivos. O bem-estar animal está relacionado com uma condição satisfatória de desenvolvimento, e de acordo com o modelo das cinco liberdades, o animal deve ser livre de fome e de sede; livre de desconforto; livre de dor, lesões ou doenças; livre para expressar os seus comportamentos normais; e livre de medo e aflição (BRAMBELL, 1965; McCULLOCH, 2013). Entre os benefícios que podem ser obtidos em seguir-se o modelo das cinco liberdades em criações de insetos em laboratório destaca-se a minimização do estresse em insetos. O estresse pode ter impactos negativos, com

interferência na alimentação, ganho de peso, reprodução e função imunológica dos insetos (ADAMO; BAKER, 2011). Segundo Adamo (2012), o estresse pode induzir a erros em resultados de investigação, e assim, boas práticas científicas requerem que os insetos sejam confinados e manuseados de maneira que não produza estresse.

O processo de criação massal de insetos fitófagos enfrenta muitos desafios em virtude da ampla diversidade de espécies. Entre esses desafios, o desenvolvimento de dietas artificiais (PARRA, 2012; COHEN, 2015) e de metodologias de criação específicas para cada espécie (BOLLER; CHAMBERS, 1977) são alguns dos pontos fundamentais para o sucesso. Desse modo, a elaboração de um protocolo único de criação torna-se difícil. Apesar disso, as diversas metodologias adotadas não necessariamente implicam em descartar a abordagem do bem-estar animal (ROWAN, 1993).

A espécie *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) constitui uma importante praga de muitos cultivos agrícolas e amplamente distribuída no mundo (FITT, 1989). Recentemente, o estabelecimento da praga no Continente Americano (TAY et al., 2013; SOSA-GÓMEZ et al., 2015) ocasionou perdas consideráveis na produção agrícola (DEGRANDE; OMOTO, 2013), tornando-se um problema grave devido à intensificação de aplicações de produtos químicos para seu controle, sem a adoção das estratégias preconizadas no Manejo Integrado de Pragas (EMBRAPA, 2013). As condições climáticas (SHARMA, 2014), as extensas áreas de vegetação hospedeira não monitorada e de difícil controle que serve como área de multiplicação (CUNNINGHAM; ZALUCKI; WEST, 1999), e as características dos cultivos agrícolas com plantios contínuos e sucessivos de diversas plantas hospedeiras têm favorecido o alto potencial reprodutivo de *H. armigera* (NASERI et al., 2009). Esse conjunto de fatores tem possivelmente causado o prolongamento do período de reprodução de *H. armigera* com sucessivas gerações, resultando em alta densidade populacional e rápida dispersão para outras regiões do planeta (KRITICOS et al., 2015).

A introdução de *H. armigera* em novas áreas agrícolas promove dúvidas quanto ao seu comportamento e potenciais danos a essas áreas. Essa preocupação se dá especialmente por se tratar de uma praga com histórico de evolução de resistência a diversos grupos de inseticidas químicos (McCAFFERY, 1998; MARTIN

et al., 2005), pela potencial capacidade de evolução de resistência a proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillales: Bacillaceae) (ROMEIS; MEISSELE; BIGLER, 2006) presentes em culturas geneticamente modificadas (AKHURST et al., 2003; TABASHNIK; van RENSBURG; CARRIERE, 2009; DOWNES; PARKER; MAHON, 2010) e pela falta de estratégias de manejo. Assim, fomentou a necessidade de criação do inseto em laboratório para estudos nas mais diversas áreas.

Neste estudo, adotou-se como hipótese de bem-estar para *H. armigera* como sendo a capacidade do inseto de expressar as atividades biológicas naturais que formam a sua história de vida, garantindo assim a perpetuação da espécie. Para garantir o bem-estar ao inseto teve-se como premissa o fornecimento de condições ambientais adequadas à espécie, alimentação ideal em qualidade e quantidade e manejo e práticas estruturais que promovam o comportamento natural do inseto.

Devido à necessidade de se estabelecer metodologias de criação de *H. armigera* com condições adequadas de desenvolvimento do inseto em laboratório que suporte o bem-estar, este trabalho teve como objetivo desenvolver uma técnica de criação de *H. armigera* que permita a produção e manutenção contínua do inseto para a realização de estudos nas mais diversas áreas de pesquisa.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Local**

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Os ensaios foram realizados sob condições controladas de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $60 \pm 5\%$  de umidade relativa, e fotofase de 12 horas.

## 2.2 Criação de *Helicoverpa armigera*

Indivíduos de *H. armigera* foram originalmente obtidos de doações das Empresas Bayer, Dupont (Paulínia, SP) e SGS Gravena (Jaboticabal, SP), criados em laboratório com dieta artificial e com introduções regulares de indivíduos selvagens. A colônia de laboratório que foi utilizada no estudo foi iniciada em folhas de algodão, cv. BRS 293. Na geração F1 foi estabelecida uma linhagem do inseto em dieta artificial modificada de Greene; Leppla; Dickerson (1976) – Dieta MAG.

## 2.3 Recipiente e forma de disponibilidade de alimento para criação de *Helicoverpa armigera*

Em decorrência da capacidade de *H. armigera* na fase larval em perfurar os recipientes de plástico descartáveis, facilmente encontrados no mercado e comumente utilizados em criação de outros lepidópteros, estes não foram analisados neste estudo. Para definir o recipiente para criação massal de *H. armigera*, foram avaliados três tipos de recipientes: (I) placa de Petri de acrílico (6,0 cm de diâmetro x 2,0 cm de altura); (II) pote plástico transparente (6,5 cm de diâmetro x 5,0 cm de altura, tampado com tampa plástica); e (III) tubo de vidro de fundo chato (2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura, tampado com chumaço de algodão hidrófilo). Cada recipiente recebeu 8 g de dieta artificial (Dieta MAG) como substrato de alimentação para o inseto (*ad libitum*), com diferentes formas de disponibilidade: (I) placa de Petri e (II) pote plástico com dieta concentrada na metade do recipiente formando ângulo de 15 graus, dieta em porções retangulares ao centro e dieta depositada ao fundo do recipiente e (III) tubo de vidro com dieta depositada ao fundo e acondicionado com o fundo voltado para cima, em estante de madeira com 15% de declividade.

Foi avaliado o desenvolvimento de *H. armigera* por meio dos seguintes parâmetros biológicos: duração e sobrevivência do período larval e pupal e peso de lagartas aos 10 dias de idade e de pupas com 24 horas com o auxílio de uma balança de precisão (0,0001 g) (Ohaus Corporation, AR2140, Parsippany, USA). Para avaliação dos parâmetros biológicos de *H. armigera*, para cada tipo de recipiente e disponibilidade do alimento, foram inoculadas lagartas neonatas nos

recipientes onde permaneceram até atingirem a fase de pupa. Após 24 horas, as pupas foram pesadas e transferidas para um pote plástico (6,5 cm de diâmetro x 5,0 cm de altura) contendo uma camada de 0,5 cm de vermiculita, para avaliação do período pupal, bem como para evitar desidratação ou danos às pupas e oferecer condições adequadas na emergência do adulto.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com sete repetições, sendo cada repetição composta por cinco lagartas individualizadas em cada recipiente. A distribuição das cinco lagartas por repetição foi definida no início do experimento e essa forma de composição das repetições teve como objetivo minimizar o efeito individual do inseto e diminuir a variabilidade dos dados.

#### **2.4 Quantidade de dieta artificial para alimentação de *Helicoverpa armigera***

Para a determinação da quantidade de dieta oferecida para alimentação de *H. armigera*, lagartas neonatas e de terceiro ínstar foram individualizadas em recipiente e forma de disponibilidade, previamente selecionados no experimento anterior. Desse modo, a dieta artificial (Dieta MAG) foi oferecida às lagartas de *H. armigera* nas quantidades de 4,5; 5,5 e 6,5 g de massa fresca por recipiente. Os parâmetros biológicos avaliados foram a duração e a sobrevivência das fases larval e pupal, peso de lagartas no máximo desenvolvimento, peso de pupas com 24 horas de idade e de adultos recém-emergidos.

Para o teste de quantidade de alimento oferecido a *H. armigera*, adotou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3 (duas idades de inseto x três quantidades de alimento) e utilizou-se sete repetições. Cada repetição foi composta por cinco lagartas individualizadas em cada recipiente. A distribuição das cinco lagartas por repetição foi definida no início do experimento e essa forma de composição das repetições teve como objetivo minimizar o efeito individual do inseto e diminuir a variabilidade dos dados.

## 2.5 Efeito no desenvolvimento de *Helicoverpa armigera* submetida a diferentes densidades e períodos de pré-individualização

Os efeitos no desenvolvimento de *H. armigera* criada em diferentes números por recipiente e a idade de lagartas mais adequada para individualização foram determinados em duas etapas. Na primeira etapa, lagartas neonatas foram acondicionadas em recipiente plástico de capacidade de 1000 mL (13,0 cm de diâmetro x 9,5 cm de altura) com 30 mL de dieta artificial distribuída em todo fundo do recipiente (132,7 cm<sup>2</sup>). Em seguida, os recipientes foram mantidos com o fundo voltado para cima até o momento da individualização, que ocorreram no 5º, 7º, 9º e 11º dia após eclosão, onde as densidades de uma, 20, 40, 80 e 120 lagartas por recipiente foram avaliadas quanto ao ganho de peso e sobrevivência.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado; para a avaliação do peso de lagartas utilizou-se seis repetições, sendo cada repetição representada pelo peso médio de cinco lagartas; para a sobrevivência larval utilizou-se 10 repetições, e cada repetição foi composta por um recipiente, com exceção no tratamento de densidade de uma lagarta por recipiente, em que a repetição foi constituída por 10 lagartas individualizadas em cada recipiente.

Na segunda etapa, foi avaliada a influência da densidade e do período de pré-individualização no desenvolvimento de *H. armigera* até a fase adulta. Lagartas com cinco, sete, nove e 11 dias de idade, oriundas das densidades de uma, 20, 40, 80 e 120 lagartas por recipiente, foram individualizadas e avaliou-se o período larval e pupal, peso de pupa e sobrevivência de imaturo. Para isso adotou-se as melhores condições, conforme os resultados anteriores (tipo de recipiente, quantidade e forma de disponibilidade de alimento).

Foram utilizadas seis repetições em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 5 (quatro períodos de pré-individualização x cinco densidades de lagartas), sendo cada repetição constituída por cinco lagartas individualizadas em cada recipiente. A distribuição das cinco lagartas por repetição foi definida no início do experimento e essa forma de composição das repetições teve como objetivo minimizar o efeito individual do inseto e diminuir a variabilidade dos dados.

## **2.6 Efeito no desenvolvimento de *Helicoverpa armigera* em recipientes com tamanhos diferentes no período de pré-individualização**

Para evitar a competição intraespecífica, foi avaliado em laboratório a sobrevivência e o peso de lagartas de *H. armigera* em regimes de confinamento. Para isso, quatro tamanhos de recipientes plásticos com capacidades de 145, 250, 500 e 1000 mL e áreas disponíveis com dieta de 33,18; 50,26; 78,54 e 132,73 cm<sup>2</sup>, respectivamente, foram utilizados. O número de lagartas confinadas correspondeu ao definido no teste de densidade larval. Após três, cinco e seis dias verificou-se a sobrevivência larval e no final do período avaliado foi aferido o peso médio de 10 lagartas por repetição. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 12 repetições, sendo cada repetição constituída por um recipiente.

## **2.7 Estágios imaturos de *Helicoverpa armigera***

Posteriormente à seleção das condições mais adequadas para criação, determinou-se o número de ínstaras larvais de *H. armigera*. Após eclosão, 50 lagartas neonatas foram individualizadas e alimentadas com dieta artificial modificada de Greene, Leppla e Dickerson (1976). Diariamente, foi medida a largura da cápsula cefálica e o comprimento das lagartas por meio de um microscópio estereoscópico com ocular graduada com precisão de 0,1 mm (Atto Instruments Ltd, Let-2, Tsuen Wan, Hong Kong). Estas aferições serviram para determinar o comprimento do inseto, o tempo de desenvolvimento nos ínstaras larvais e o número de ínstaras de *H. armigera* utilizando-se a metodologia de criação aqui desenvolvida. Para a diferenciação dos ínstaras, organizou-se uma distribuição de frequência das medidas das cápsulas cefálicas. Ao final das medições foi determinada a razão de crescimento e comparada ao modelo linear de Dyar (1890). Na fase de pupa foi aferido o comprimento e o período de desenvolvimento pupal.

## **2.8 Gaiola de oviposição e densidade de casais por gaiola para criação de *Helicoverpa armigera***

Para determinar o tamanho da gaiola de oviposição e o número de casais por gaiola mais indicados para criação e testes laboratoriais com *H. armigera*, foram avaliados três tamanhos de gaiolas. Todas as gaiolas foram constituídas por tubo de PVC de 20 cm de altura, com variação no diâmetro (10; 15 e 20 cm) e número de casais (1, 5 e 10). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3 (três tamanhos de gaiola x três densidades de casais), com seis repetições, sendo cada repetição composta por uma gaiola.

As gaiolas foram revestidas internamente com papel toalha, depositadas em pratos plásticos forrados com o mesmo papel e tampadas na extremidade superior com tecido tipo *voile*. Para a alimentação dos adultos de *H. armigera* utilizou-se solução de mel a 10% em um frasco de vidro (volume de 10 mL) com um chumaço de algodão; por capilaridade o alimento ficou disponível aos insetos em todo o período avaliado, sendo substituído diariamente.

Após a emergência dos adultos, oriundos de criação estabelecida de acordo com os melhores resultados observados nos ensaios anteriores (tipo de recipiente, quantidade e forma de disponibilidade de alimento), foram constituídos casais recém-emergidos no mesmo dia. Diariamente, realizou-se a substituição do papel de revestimento e o tecido *voile*, bem como a contagem dos ovos para determinação da fecundidade de *H. armigera*. Após a quantificação, o papel e o tecido com os ovos foram acondicionados em recipiente plástico de 1500 mL (13,0 cm de diâmetro x 14,5 cm de altura) até a eclosão das lagartas para a determinação da fertilidade.

## **2.9 Validação da metodologia de criação de *Helicoverpa armigera***

A metodologia de criação proposta para *H. armigera* foi testada por 12 gerações subsequentes à definição do sistema de criação. Na 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> gerações foram registrados em *H. armigera* o período larval e pupal, os pesos de lagartas aos 10 dias de idade e de pupas com 24 horas de idade, a sobrevivência larval e pupal, e os índices de desenvolvimento nas fases larval e pupal. Lagartas



neonatas de *H. armigera* foram submetidas a condições físicas e alimentares de acordo com a metodologia desenvolvida. Após pesagem, as pupas foram transferidas para recipientes plásticos (6,5 cm de diâmetro x 5,0 cm de altura) contendo uma camada de 0,5 cm de vermiculita para avaliação do período pupal. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo cada repetição constituída por cinco lagartas individualizadas em cada recipiente. A distribuição das cinco lagartas por repetição foi definida no início do experimento e essa forma de composição das repetições teve como objetivo minimizar o efeito individual do inseto e diminuir a variabilidade dos dados.

## **2.10 Análise estatística**

Todos os dados obtidos nos ensaios para elaboração da metodologia de criação de *H. armigera* foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Utilizou-se a análise exploratória dos dados para a verificação de dados influentes e outliers, homocedasticidade e normalidade dos resíduos. Quando atendidas estas pressuposições, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e quando significativo às médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Dados que não atenderam aos pressupostos foram transformados apropriadamente antes da ANOVA ou foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O software utilizado para as análises estatísticas foi o SAS® 9.3 (SAS INSTITUTE, 2011).

### 3 Resultados

#### 3.1 Recipiente e forma de disponibilidade de alimento para criação de *Helicoverpa armigera*

Os dados dos parâmetros de desenvolvimento de *H. armigera* em diferentes recipientes e formas de disponibilidade do alimento estão apresentados na Tabela 1. Lagartas confinadas em RPP/F1 apresentaram maior peso larval, diferindo significativamente do peso de lagartas em RP/F1, RP/F3, e não diferiram do peso de lagartas em RPP/F2, RPP/3 e RTVFC ( $F_{6,42} = 5,28$ ;  $P = 0,0004$ ). O período larval foi significativamente menor em lagartas desenvolvidas em RPP/1, RPP/F3, RP/F1 e RTVFC em comparação com o período larval em RPP/F2, RP/F2, RP/F3 ( $F_{6,42} = 16,70$ ;  $P < 0,0001$ ).

O confinamento nos recipientes e formas de disponibilidade do alimento RPP/F1, RP/F1 e RTVFC favoreceram a formação de pupas mais pesadas, com significativa diferença em comparação com os pesos de pupas oriundas dos recipientes RPP/F2, RPP/F3, RP/F2 e RP/F3 ( $F_{6,42} = 14,82$ ;  $P < 0,0001$ ).

Não houve diferença significativa na sobrevivência larval ( $H_{6,42} = 3,9878$ ;  $P = 0,6783$ ) e pupal ( $H_{6,42} = 2,3880$ ;  $P = 0,8808$ ) de *H. armigera* nos diferentes recipientes e formas de disponibilidade de alimento. Como o recipiente placa de Petri de acrílico (6,0 cm de diâmetro x 2,0 cm de altura) e a forma de disposição do alimento concentrada na metade do recipiente formando ângulo de 15 graus favoreceram o desenvolvimento larval e pupal de *H. armigera*, esses foram selecionados para serem utilizados nos experimentos subsequentes.

Tabela 1. Médias ( $\pm$  EP) dos parâmetros de desenvolvimento de *Helicoverpa armigera* em diferentes recipientes e formas de disponibilidade de alimento. T 26  $\pm$  1°C; UR 60  $\pm$  5%; Fotofase 12h.

Recipiente	Peso de lagarta (mg) <sup>1</sup>	Período larval (dias) <sup>1</sup>	Peso de pupa (mg) <sup>1</sup>	Sobrevivência larval (%) <sup>2</sup>	Sobrevivência pupal (%) <sup>2</sup>
RPP/F1	190,90 $\pm$ 17,71 c	16,21 $\pm$ 0,15 a	374,06 $\pm$ 8,74 c	88,57 $\pm$ 5,95 a	87,14 $\pm$ 4,61 a
RPP/F2	151,71 $\pm$ 25,50 abc	19,45 $\pm$ 0,12 c	320,34 $\pm$ 6,08 ab	85,71 $\pm$ 3,69 a	80,71 $\pm$ 5,50 a
RPP/F3	178,37 $\pm$ 8,73 bc	17,32 $\pm$ 0,22 ab	313,44 $\pm$ 3,12 a	91,43 $\pm$ 4,04 a	83,57 $\pm$ 4,32 a
RP/F1	104,70 $\pm$ 20,88 ab	18,08 $\pm$ 0,26 ab	342,15 $\pm$ 10,28 bc	85,71 $\pm$ 3,68 a	84,29 $\pm$ 6,02 a
RP/F2	82,72 $\pm$ 21,27 a	19,34 $\pm$ 0,49 c	310,44 $\pm$ 3,58 a	80,00 $\pm$ 4,36 a	85,24 $\pm$ 5,42 a
RP/F3	86,09 $\pm$ 12,23 a	19,20 $\pm$ 0,22 c	312,88 $\pm$ 3,79 a	85,71 $\pm$ 5,71 a	79,52 $\pm$ 5,83 a
RTVFC	157,84 $\pm$ 23,23 abc	16,44 $\pm$ 0,25 a	355,54 $\pm$ 5,77 c	88,57 $\pm$ 4,04 a	87,86 $\pm$ 6,16 a

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas são significativamente diferentes pelo teste de Dunn<sup>1</sup> ou Tukey<sup>2</sup> ( $P < 0,05$ ).

RPP/F1 – placa de Petri em acrílico com dieta concentrada na metade do recipiente formando ângulo de 15 graus.

RPP/F2 – placa de Petri em acrílico com dieta em porção retangular ao centro.

RPP/F3 – placa de Petri em acrílico com dieta deposita ao fundo.

RP/F1 – pote plástico com dieta concentrada na metade do recipiente formando ângulo de 15 graus.

RP/F2 – pote plástico com dieta em porção retangular ao centro.

RP/F3 – pote plástico com dieta deposita ao fundo.

RTVFC – tubo de fundo chato com dieta deposita ao fundo.

### 3.2 Quantidade de dieta artificial para alimentação de *Helicoverpa armigera*

Parâmetros de desenvolvimento de *H. armigera* foram estudados em duas idades de individualização em resposta à alimentação em três quantidades de dieta. Ambos os efeitos da idade do inseto, quantidade de alimento e sua interação em parâmetros de desenvolvimento foram avaliados (Tabela 2). Não foram observadas diferenças significativas na massa corpórea de lagartas de *H. armigera* alimentadas em quantidades diferentes de dieta ( $F_{2,36} = 0,12$ ;  $P = 0,8894$ ) e idade do inseto ( $F_{1,36} = 0,00$ ;  $P = 0,9448$ ). Da mesma forma, não foi observada interação significativa entre quantidade de dieta e idade do inseto para o peso de lagartas ( $F_{2,36} = 2,81$ ;  $P = 0,0737$ ).

O peso de adultos de *H. armigera* não diferiu significativamente tanto entre quantidade de dieta ( $F_{2,36} = 0,17$ ;  $P = 0,8477$ ) quanto para idades dos insetos ( $F_{1,36} = 0,65$ ;  $P = 0,4247$ ). A interação de quantidade de alimento por idade de inseto também não foi significativa ( $F_{2,36} = 1,29$ ;  $P = 0,2885$ ).

Para o período de desenvolvimento larval de *H. armigera*, não houve influência significativa na quantidade de alimento ( $F_{2,36} = 3,12$ ;  $P = 0,0564$ ), na idade do inseto ( $F_{1,36} = 0,28$ ;  $P = 0,5989$ ) nem na interação quantidade de dieta x idade do inseto ( $F_{2,36} = 0,80$ ;  $P = 0,4574$ ). No período pupal, diferenças significativas foram encontradas entre quantidades de dieta ( $F_{2,36} = 6,47$ ;  $P = 0,0040$ ), porém a idade do inseto não afetou significativamente o período pupal ( $F_{1,36} = 0,02$ ;  $P = 0,8840$ ). A interação quantidade de dieta x idade de inseto não foi significativa ( $F_{2,36} = 1,38$ ;  $P = 0,2642$ ) para o período de desenvolvimento pupal.

A sobrevivência larval de *H. armigera* apresentou diferenças significativas para lagartas neonatas e de terceiro ínstar entre as porções de dietas oferecidas. Houve interação significativa entre a quantidade de dieta e a idade de lagarta ( $F_{2,36} = 12,32$ ;  $P < 0,0001$ ). A sobrevivência larval de lagartas neonatas foi mais elevada quando a disponibilidade de alimento foi maior ( $F_{2,36} = 11,61$ ;  $P = 0,0001$ ), enquanto para lagartas individualizadas no terceiro ínstar a sobrevivência foi menor na quantidade de alimento intermediária ( $F_{2,36} = 10,08$ ;  $P = 0,0003$ ). Quanto à idade do inseto, maior sobrevivência para lagartas de terceiro ínstar foi observada nas quantidades de 4,5 g ( $F_{1,36} = 15,51$ ;  $P = 0,0004$ ) e 5,5 g ( $F_{1,36} = 9,38$ ;  $P = 0,0041$ ), mas para a quantidade de 6,5 g não houve diferença significativa ( $F_{1,36} = 0,77$ ;  $P = 0,3872$ ).

Na sobrevivência pupal, houve interação significativa para a idade do inseto x quantidade de alimento ( $F_{2,36} = 17,99$ ;  $P < 0,0001$ ). Maiores índices de sobrevivência de pupas foram observados em lagartas neonatas criadas em maior disponibilidade de alimento ( $F_{2,36} = 15,96$ ;  $P < 0,0001$ ), enquanto em lagartas de terceiro ínstar criadas em 4,5 g e 6,5 g de alimento ( $F_{2,36} = 8,42$ ;  $P < 0,001$ ) a sobrevivência pupal foi maior em comparação com 5,5g de dieta artificial. Entre as idades de *H. armigera*, a maior sobrevivência pupal foi observada em lagartas de terceiro ínstar na quantidade de 4,5 g de alimento ( $F_{1,36} = 20,17$ ;  $P < 0,001$ ) e em lagartas neonatas alimentadas com 5,5 g de dieta ( $F_{1,36} = 15,65$ ;  $P = 0,003$ ). A sobrevivência pupal de *H. armigera* na quantidade de 6,5 g de alimento não foi significativa entre lagartas neonatas e de terceiro ínstar ( $F_{1,36} = 0,16$ ;  $P = 0,6903$ ).

Em relação ao peso de pupa, houve interação significativa entre a quantidade de dieta e a idade do inseto ( $F_{2,36} = 5,99$ ;  $P = 0,0057$ ). Pupas de indivíduos de *H. armigera* individualizados no início da fase pré-imaginal e alimentados na menor

quantidade de alimento foram significativamente menos pesados ( $F_{2,36} = 3,59$ ;  $P = 0,0379$ ), não ocorrendo diferença quando as pupas foram oriundas de insetos alimentados em diferentes quantidades de dieta a partir do terceiro ínstar ( $F_{2,36} = 2,49$ ;  $P = 0,0971$ ). No valor quantitativo de 4,5 g de dieta, as pupas oriundas de insetos individualizados no terceiro ínstar foram significativamente mais pesadas em comparação com insetos individualizados quando neonatos ( $F_{1,36} = 10,74$ ;  $P = 0,0023$ ). Para o peso de pupas oriundas de insetos alimentados com 5,5 g ( $F_{1,36} = 1,42$ ;  $P = 0,2419$ ) e 6,5 g ( $F_{1,36} = 0,47$ ;  $P = 0,4972$ ) não houve diferença significativa entre as idades dos insetos. Para o desenvolvimento satisfatório de *H. armigera*, verificou-se que a quantidade de 5,5 gramas de dieta artificial para cada indivíduo foi suficiente para o desenvolvimento do inseto nas duas idades de individualização, desta forma a quantidade de 5,5 gramas foi utilizada para experimentos subsequentes.

Tabela 2. Médias ( $\pm$  EP) dos parâmetros de desenvolvimento de *Helicoverpa armigera* alimentadas com 4,5; 5,5 e 6,5 gramas de dieta artificial. T  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; UR  $60 \pm 5\%$ ; Fotofase 12h.

Quantidade de dieta	Peso de lagarta (mg)	Peso de adulto (mg)	Período larval (dias)	Período pupal (dias)
4,5 g	425,13 $\pm$ 4,83 a	231,54 $\pm$ 4,08 a	16,01 $\pm$ 0,11 a	11,50 $\pm$ 0,04 a
5,5 g	422,30 $\pm$ 5,77 a	232,12 $\pm$ 3,85 a	15,66 $\pm$ 0,12 a	11,64 $\pm$ 0,06 ab
6,5 g	425,37 $\pm$ 4,75 a	228,88 $\pm$ 4,78 a	15,57 $\pm$ 0,17 a	11,79 $\pm$ 0,06 b
Idade da lagarta				
neonata	424,07 $\pm$ 4,01 a	228,87 $\pm$ 3,07 a	15,79 $\pm$ 0,12 a	11,65 $\pm$ 0,06 a
3º ínstar	424,47 $\pm$ 4,29 a	232,82 $\pm$ 3,73 a	15,70 $\pm$ 0,11 a	11,64 $\pm$ 0,05 a
Interação quantidade de dieta x idade da lagarta para sobrevivência larval				
Idade da lagarta	Quantidade de dieta (g)			
	4,5	5,5	6,5	
neonata	71,43 $\pm$ 3,12 aA	89,79 $\pm$ 2,63 bB	91,83 $\pm$ 2,89 aB	
3º ínstar	89,79 $\pm$ 4,08 bB	75,51 $\pm$ 4,08 aA	95,92 $\pm$ 2,63 aB	
Interação quantidade de dieta x idade da lagarta para sobrevivência pupal				
neonata	68,33 $\pm$ 4,03 aA	93,20 $\pm$ 3,22 bB	93,20 $\pm$ 3,22 aB	
3º ínstar	91,16 $\pm$ 4,43 bB	73,10 $\pm$ 3,30 aA	91,15 $\pm$ 3,15 aB	
Interação quantidade de dieta x idade da lagarta para peso de pupa				
neonata	381,37 $\pm$ 2,58 aA	406,15 $\pm$ 9,03 aB	401,49 $\pm$ 7,57 aAB	
3º ínstar	413,59 $\pm$ 6,52 bA	394,45 $\pm$ 7,69 aA	394,75 $\pm$ 6,55 aA	

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas são significativamente diferentes Tukey ( $P < 0,05$ ).

### 3.3 Efeito no desenvolvimento de *Helicoverpa armigera* submetida a diferentes densidades e períodos de pré-individualização

Os dados dos efeitos nos pesos de lagartas de *H. armigera*, criadas em diferentes densidades larvais, aos cinco, sete, nove e 11 dias após emergência estão apresentados na Tabela 3. As lagartas de *H. armigera* provenientes da densidade de uma lagarta por recipiente apresentaram maior peso no quinto dia,

diferenciando das lagartas provenientes da densidade de 40 lagartas. Para as outras densidades larvais, o peso de lagartas não diferiu significativamente ( $F_{4,25} = 3,48$ ;  $P = 0,0216$ ). No sétimo dia, o peso de lagartas provenientes da menor densidade larval apresentou diferença significativa em comparação com o peso das outras densidades larvais ( $F_{4,25} = 6,25$ ;  $P = 0,0012$ ). No nono dia, maior peso larval foi observado em lagartas provenientes da densidade de uma lagarta por recipiente, com diferença significativa para a densidade de 80 lagartas ( $F_{4,25} = 3,62$ ;  $P = 0,0185$ ). Para as demais densidades larvais, não houve diferença. Lagartas criadas na densidade de uma lagarta por recipiente foram mais pesadas no décimo primeiro dia, diferindo significativamente do peso de lagartas confinadas nas demais densidades larvais ( $F_{4,25} = 20,87$ ;  $P < 0,0001$ ).

Tabela 3. Médias ( $\pm$  EP) dos pesos (mg) aos cinco, sete, nove e 11 dias após emergência de lagartas de *Helicoverpa armigera* criadas em diferentes densidades larvais. T  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; UR  $60 \pm 5\%$ ; Fotofase 12h.

Densidade larval	Peso (5 dias)	Peso (7 dias)	Peso (9 dias)	Peso (11 dias)
1	6,63 $\pm$ 0,34 b	26,17 $\pm$ 1,46 b	73,17 $\pm$ 8,25 b	283,25 $\pm$ 17,66 c
20	4,80 $\pm$ 0,67 ab	17,93 $\pm$ 1,26 a	54,11 $\pm$ 5,69 ab	158,42 $\pm$ 8,72 ab
40	4,13 $\pm$ 0,44 a	17,61 $\pm$ 1,15 a	55,68 $\pm$ 6,81 ab	194,55 $\pm$ 19,18 b
80	5,31 $\pm$ 0,64 ab	18,52 $\pm$ 2,03 a	42,75 $\pm$ 4,31 a	110,61 $\pm$ 4,12 a
120	4,71 $\pm$ 0,35 ab	17,66 $\pm$ 1,34 a	48,11 $\pm$ 4,16 ab	147,75 $\pm$ 16,02 ab

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Os dados dos efeitos nas sobrevivências de lagartas de *H. armigera*, criadas em diferentes densidades larvais, aos cinco, sete, nove e 11 dias após emergência estão apresentados na Tabela 4. Para a sobrevivência larval, houve interação significativa entre o dia da individualização e a densidade de lagartas ( $F_{12,180} = 3,75$ ;  $P < 0,0001$ ). Não houve diferença significativa entre os dias da individualização para a densidade de uma lagarta ( $F_{3,180} = 1,10$ ;  $P = 0,3515$ ). Para a densidade de 20 ( $F_{3,180} = 16,47$ ;  $P < 0,0001$ ) e 40 ( $F_{3,180} = 20,86$ ;  $P < 0,0001$ ) lagartas, a sobrevivência foi maior aos cinco e sete dias. Em relação à densidade de 80 ( $F_{3,180} = 22,38$ ;  $P < 0,0001$ ) e 120 ( $F_{3,180} = 31,99$ ;  $P < 0,0001$ ) lagartas, as maiores sobrevivências foram observadas apenas no quinto dia. Aos cinco dias de individualização, não houve diferença significativa entre as densidades larvais ( $F_{4,180} = 1,50$ ;  $P = 0,2033$ ). Para o sétimo ( $F_{4,180} = 4,89$ ;  $P = 0,0009$ ), nono ( $F_{4,180} = 10,26$ ;  $P$

< 0,0001) e décimo primeiro ( $F_{4,180} = 29,00$ ;  $P < 0,0001$ ) dias, maiores sobrevivências foram observadas apenas na densidade de uma lagarta.

Tabela 4. Médias ( $\pm$  EP) das sobrevivências aos cinco, sete, nove e 11 dias após emergência de lagartas de *Helicoverpa armigera* criadas em diferentes densidades larvais. T  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; UR  $60 \pm 5\%$ ; Fotofase 12h.

Densidade larval	Dia da individualização			
	5	7	9	11
Interação dia da individualização x densidade de lagarta para a sobrevivência larval no dia da individualização				
1	91,00 $\pm$ 3,14 aA	85,00 $\pm$ 4,01 bA	83,00 $\pm$ 4,22 bA	83,00 $\pm$ 5,38 bA
20	82,50 $\pm$ 3,27 aC	75,50 $\pm$ 3,69 abBC	68,00 $\pm$ 2,00 aB	48,50 $\pm$ 1,98 aA
40	81,25 $\pm$ 5,49 aC	69,25 $\pm$ 5,15 aBC	67,50 $\pm$ 6,07 aA	42,00 $\pm$ 4,11 aA
80	79,50 $\pm$ 2,91 aC	66,12 $\pm$ 1,34 aB	55,75 $\pm$ 1,85 aB	39,00 $\pm$ 1,73 aA
120	83,08 $\pm$ 1,64 aC	66,25 $\pm$ 1,21 aB	54,33 $\pm$ 4,48 aB	34,50 $\pm$ 2,17 aA

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Os dados dos efeitos de diferentes densidades de lagartas e períodos de pré-individualização ocasionados no desenvolvimento de *H. armigera* estão apresentados na Tabela 5. Para o peso de pupas, não foram observadas diferenças significativas entre as densidades larvais ( $F_{4,100} = 2,39$ ;  $P = 0,0558$ ), porém, houve diferenças significativas para o período de pré-individualização no peso de pupas ( $F_{3,100} = 28,12$ ;  $P < 0,0001$ ). Insetos individualizados aos cinco e sete dias apresentaram maiores pesos de pupas em comparação com os insetos individualizados aos nove e 11 dias de idade. A interação entre a densidade larval e o período de pré-individualização não foi significativa ( $F_{12,100} = 1,8$ ;  $P = 0,0576$ ).

Em relação à sobrevivência na fase imatura de *H. armigera*, não verificaram-se diferenças significativas nas diferentes densidades ( $F_{4,100} = 1,26$ ;  $P = 0,3968$ ). Por outro lado, a sobrevivência de imaturo foi significativamente diferente para o período de pré-individualização ( $F_{3,100} = 5,64$ ;  $P = 0,0013$ ). Não ocorreu interação significativa entre a densidade larval e o período de pré-individualização ( $F_{12,100} = 1,07$ ;  $P = 0,3968$ ).

No período pupal de *H. armigera* não foi observado diferença significativa em relação ao dia da individualização ( $F_{3,100} = 1,94$ ;  $P = 0,1282$ ). Da mesma forma, as diferentes densidades larvais, no período de pré-individualização, não interferiram no



período pupal ( $F_{4,100} = 1,74$ ;  $P = 0,1474$ ). A interação entre a densidade larval e o período de pré-individualização para o período larval não foi significativa ( $F_{12,100} = 1,02$ ;  $P = 0,4368$ ).

Para o período larval, a interação densidade larval x período de pré-individualização foi significativa ( $F_{12,100} = 3,79$ ;  $P < 0,0001$ ). O dia de transferência de recipientes para insetos criados na densidade de um inseto não interferiu no período larval ( $F_{3,100} = 0,28$ ;  $P = 0,8411$ ). A individualização no quinto dia para a densidade de 20 lagartas promoveu menor tempo de desenvolvimento larval, diferindo da individualização das lagartas aos sete e 11 dias, porém, não diferenciou da individualização no nono dia ( $F_{3,100} = 3,97$ ;  $P = 0,0102$ ). O dia da individualização não interferiu no desenvolvimento larval na densidade de 40 lagartas ( $F_{3,100} = 1,41$ ;  $P = 0,2434$ ). As individualizações no quinto ( $F_{3,100} = 14,78$ ;  $P < 0,0001$ ) ou no sétimo ( $F_{3,100} = 5,84$ ;  $P < 0,0010$ ) dia para as densidades de 80 ou 120 lagartas foram as que apresentaram menor interferência no desenvolvimento larval de *H. armigera*. Verificaram-se diferenças significativas no período larval aos cinco ( $F_{4,100} = 15,04$ ;  $P < 0,0001$ ), sete ( $F_{4,100} = 12,94$ ;  $P < 0,0001$ ), nove ( $F_{4,100} = 21,55$ ;  $P < 0,0001$ ) e 11 ( $F_{4,100} = 36,07$ ;  $P < 0,0001$ ) dias da individualização, onde a densidade de uma lagarta apresentou menor período larval em comparação com as demais densidades larvais.

Desse modo, observa-se que a individualização das lagartas no quinto dia apresentou menor interferência na maioria dos parâmetros de *H. armigera* analisados, independentemente da densidade que são criadas nesse período. Desta forma, selecionou-se o quinto dia para realizar a individualização e a densidade de 120 lagartas por recipiente.

Tabela 5. Médias ( $\pm$  EP) dos parâmetros de desenvolvimento de *Helicoverpa armigera* criadas em diferentes densidades larvais e períodos de pré-individualização. T  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; UR  $60 \pm 5\%$ ; Fotofase 12h.

Densidade larval	Peso de pupa (mg)	Sobrevivência de imaturo (%)	Período pupal (dias)	
1	279,39 $\pm$ 3,69 a	80,00 $\pm$ 2,69 a	11,46 $\pm$ 0,36 a	
20	292,38 $\pm$ 4,48 a	74,17 $\pm$ 3,06 a	11,66 $\pm$ 0,07 a	
40	286,25 $\pm$ 5,01 a	76,08 $\pm$ 4,49 a	11,61 $\pm$ 0,06 a	
80	285,64 $\pm$ 5,10 a	76,67 $\pm$ 2,87 a	11,56 $\pm$ 0,06 a	
120	292,43 $\pm$ 5,04 a	70,83 $\pm$ 3,18 a	11,62 $\pm$ 0,06 a	
Dia da individualização				
5	301,52 $\pm$ 3,65 c	82,00 $\pm$ 2,42 b	11,52 $\pm$ 0,04 a	
7	300,49 $\pm$ 3,82 c	80,00 $\pm$ 2,54 b	11,68 $\pm$ 0,07 a	
9	279,34 $\pm$ 2,72 b	72,67 $\pm$ 2,79 a	11,53 $\pm$ 0,05 a	
11	267,54 $\pm$ 3,65 a	67,49 $\pm$ 3,40 a	11,61 $\pm$ 0,04 a	
Interação dia da individualização x densidade de lagarta para o período larval				
Densidade larval	Dia da individualização			
	5	7	9	11
1	16,74 $\pm$ 0,39 aA	16,82 $\pm$ 0,33 aA	16,88 $\pm$ 0,22 aA	16,54 $\pm$ 0,25 aA
20	18,41 $\pm$ 0,21 bA	19,58 $\pm$ 0,38 cB	19,38 $\pm$ 0,33 bAB	19,57 $\pm$ 0,34 bcB
40	19,22 $\pm$ 0,25 bA	18,69 $\pm$ 0,36 bcA	19,49 $\pm$ 0,28 bA	19,19 $\pm$ 0,37 bA
80	19,22 $\pm$ 0,24 bAB	18,44 $\pm$ 0,22 bA	20,11 $\pm$ 0,23 bBC	20,92 $\pm$ 0,20 dC
120	19,28 $\pm$ 0,12 bAB	18,75 $\pm$ 0,16 bcA	19,87 $\pm$ 0,27 bB	20,30 $\pm$ 0,23 cdB

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### 3.4 Efeito no desenvolvimento de *Helicoverpa armigera* em recipientes com tamanhos diferentes no período de pré-individualização

Os dados da sobrevivência aos três, cinco e seis dias de idade de lagartas de *H. armigera* criadas em diferentes tamanhos de recipientes estão apresentados na Tabela 6. Aos três dias de idade não ocorreram diferenças significativas na sobrevivência de lagartas, independentemente do tamanho do recipiente ( $F_{3,44} = 1,64$ ;  $P = 0,1938$ ). Aos cinco dias, houve maior sobrevivência de lagartas criadas no recipiente de 1000 mL em comparação ao recipiente de 145 mL ( $F_{3,44} = 5,87$ ;  $P = 0,0018$ ). Aos seis dias de idade, houve variação significativa na sobrevivência das

lagartas, sendo a maior sobrevivência verificada no recipiente de 1000 mL, sobrevivência intermediária nos recipientes de 250 e 500 mL, e menor sobrevivência no recipiente de 145 mL ( $F_{3,44} = 17,31$ ;  $P < 0,0001$ ).

Além disso, houve diferença significativa entre os dias avaliados, de modo que em todos recipientes ocorreram decréscimo na sobrevivência ao longo do tempo, para o recipiente de 145 mL ( $F_{3,33} = 65,51$ ;  $P < 0,0001$ ), 250 mL ( $F_{3,33} = 50,63$ ;  $P < 0,0001$ ), 500 mL ( $F_{3,33} = 39,79$ ;  $P < 0,0001$ ), 1000 mL ( $F_{3,33} = 0,69$ ;  $P = 0,5084$ ).

O peso de lagartas foi influenciado em função do tamanho do recipiente; maior peso foi verificado em lagartas criadas no recipiente de 1000 mL e menor peso no recipiente de 145 mL ( $F_{3,44} = 24,53$ ;  $P < 0,0001$ ).

Na densidade de 120 lagartas de *H. armigera* por recipiente, o confinamento inicial até a individualização das lagartas é influenciado pelo tamanho do recipiente; verificou-se com os resultados dos parâmetros avaliados que foram diretamente relacionados com espaço disponível para o inseto. Assim, selecionou-se o recipiente de 1000 mL para criação de lagartas de *H. armigera* até a individualização.

Tabela 6. Médias ( $\pm$  EP) da sobrevivência *Helicoverpa armigera* aos três, cinco e seis dias de idade e médias ( $\pm$  EP) do peso de 10 lagartas aos seis dias de idade criadas em recipientes de diferentes tamanhos. T  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; UR  $60 \pm 5\%$ ; Fotofase 12h.

Recipiente	Sobrevivência (%)			Peso (mg)
	3 (dias)	5 (dias)	6 (dias)	6 (dias)
145 mL	84,50 $\pm$ 2,86 aC	55,17 $\pm$ 3,08 aB	43,92 $\pm$ 1,58 aA	340,89 $\pm$ 9,67 a
250 mL	84,75 $\pm$ 2,68 aC	63,67 $\pm$ 2,53 abB	51,25 $\pm$ 1,85 bA	386,87 $\pm$ 7,92 a
500 mL	87,25 $\pm$ 3,24 aC	64,75 $\pm$ 3,34 abB	52,25 $\pm$ 1,42 bA	435,19 $\pm$ 14,71 b
1000 mL	91,92 $\pm$ 1,74 aC	71,83 $\pm$ 2,18 bB	60,67 $\pm$ 1,71 cA	482,75 $\pm$ 15,42 c

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### 3.5 Estágios imaturos em *Helicoverpa armigera*

A duração das fases larval e pupal, largura da cápsula cefálica e razão de crescimento para cada ínstar estão apresentados na Tabela 7. No estágio larval

ocorreram cinco estádios com duração total média de 16,5 dias. O quinto ínstar incluindo a pré-pupa apresentou em média 7,1 dias, e o estágio pupal durou em média 11,9 dias. As cápsulas cefálicas variaram em largura de 0,3 a 3,0 mm no período de desenvolvimento larval de *H. armigera*, e a razão média de crescimento foi de 1,8. Pela análise da curva de frequências das larguras das cápsulas cefálicas, pode ser observado quatro picos distintos, representando os cinco ínstares larvais de *H. armigera* (Figura 1).

As medidas do comprimento do corpo de *H. armigera* nos períodos de desenvolvimento larval e pupal estão apresentadas na Figura 2. Pela distribuição do crescimento, observa-se um desenvolvimento harmônico em todo o período. O comprimento do corpo no início do primeiro ínstar apresentou 1,4 mm e no final foi de 3,2 mm. No segundo ínstar, variou de 5,1 a 6,7 mm, com razão de crescimento média de 2,9. O comprimento inicial no terceiro ínstar foi de 11,0 mm e o final de 12,8 mm, com razão de crescimento médio de 2,0. Para o quarto ínstar, iniciou-se com 17,2 mm e finalizou com 22,2 mm, com razão de crescimento de 1,6. No quinto ínstar, durante a fase em que a lagarta alimentou, o crescimento variou de 27,0 a 34,9 mm, com razão de crescimento de 1,5 e no período sem alimentação (pré-pupa) o comprimento médio foi de 25,8 mm. As pupas apresentaram comprimento médio de 21,3 mm.

Tabela 7. Médias ( $\pm$  EP) da duração (dias) dos cinco estádios larvais e estágio pupal, da largura da cápsula cefálica, razão de crescimento, comprimento inicial e final e razão de crescimento inicial e final de *Helicoverpa armigera*. T 26  $\pm$  1°C; UR 60  $\pm$  5%; Fotofase 12h.

Fase de desenvolvimento	Duração (dias)	Cápsula cefálica	
		Largura (mm)	Razão de crescimento
1º ínstar	3,02 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,00	-
2º ínstar	2,00 $\pm$ 0,00	0,52 $\pm$ 0,01	1,72
3º ínstar	2,00 $\pm$ 0,00	1,10 $\pm$ 0,00	2,20
4º ínstar	2,32 $\pm$ 0,01	1,99 $\pm$ 0,11	1,81
5º ínstar	4,14 $\pm$ 0,01	3,07 $\pm$ 0,01	1,54
5º (pré-pupa)	3,68 $\pm$ 0,11	-	-
Pupa	11,92 $\pm$ 0,06	-	-

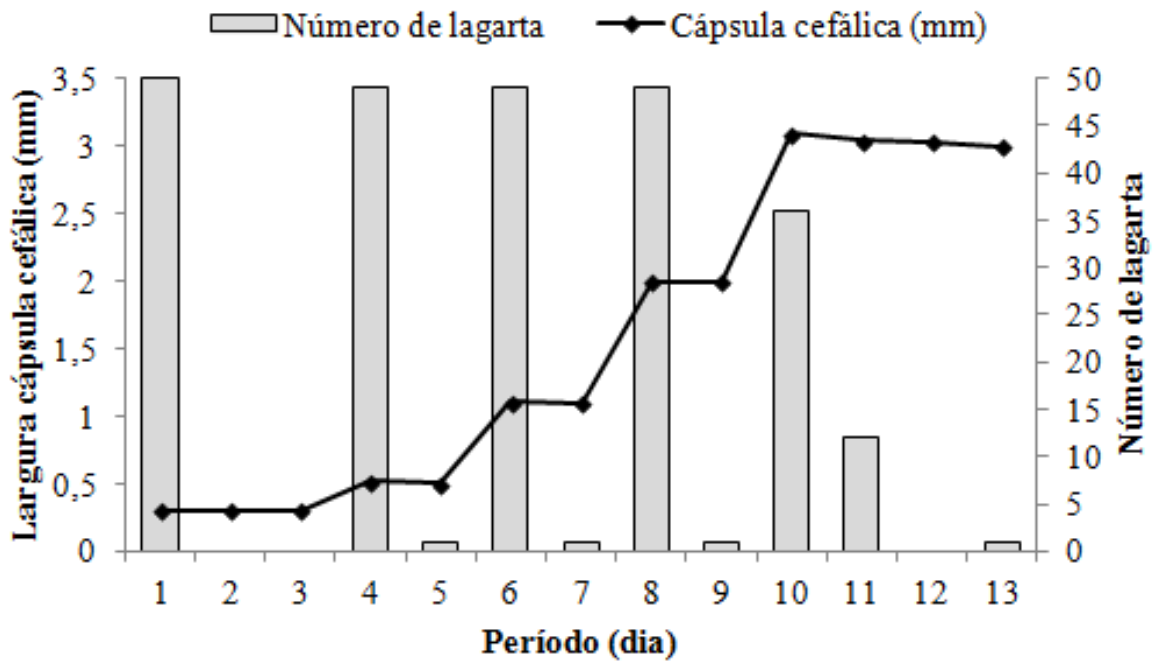


Figura 1. Largura da cápsula cefálica (mm) no período de desenvolvimento de lagartas de *Helicoverpa armigera* em dieta artificial. (T  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; UR  $60 \pm 5\%$ ; Fotofase 12h.).

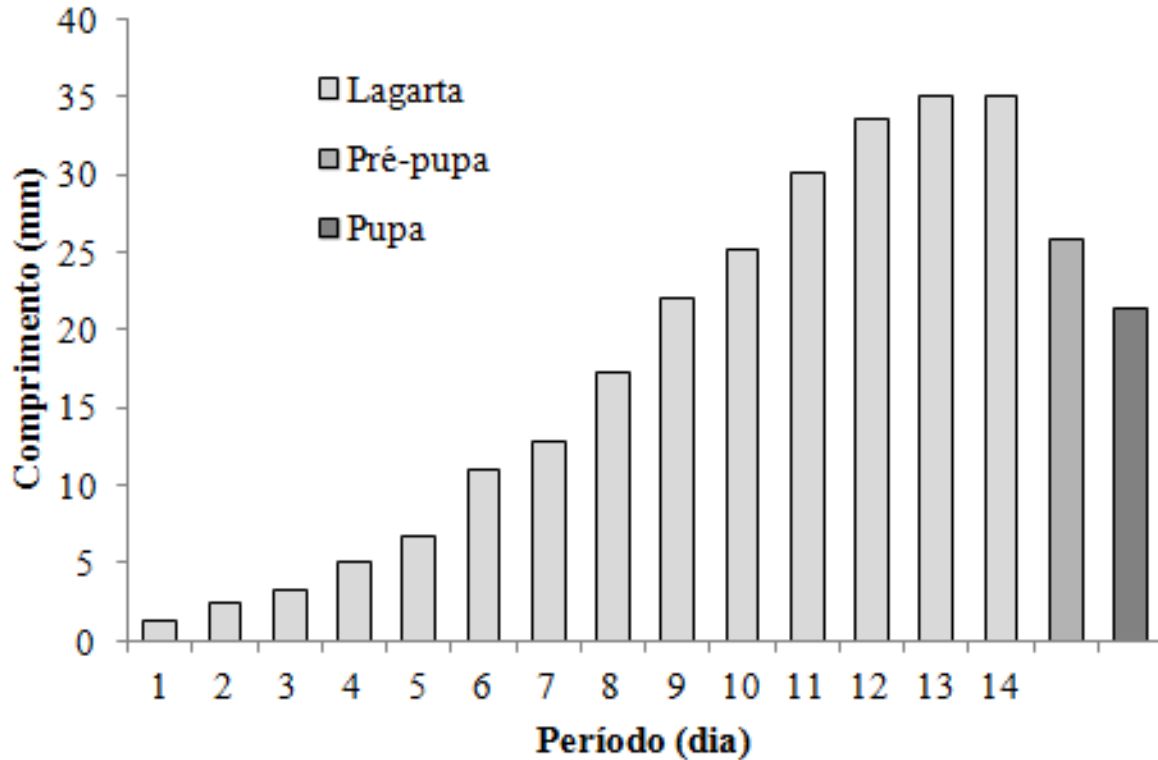


Figura 2. Comprimento (mm) corporal no período de desenvolvimento de *Helicoverpa armigera* em dieta artificial. (T  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; UR  $60 \pm 5\%$ ; Fotofase 12h.).

### 3.6 Gaiola de oviposição e densidade de casais por gaiola para criação de *Helicoverpa armigera*

Os dados dos parâmetros reprodutivos de *H. armigera* em diferentes tamanhos de gaiolas e densidades estão apresentados na Tabela 8. Houve interação significativa entre o tamanho de gaiola e a densidade de casais por gaiola ( $F_{4,45} = 21,04$ ;  $P < 0,0001$ ) no número de ovos totais de *H. armigera*. De maneira geral, a gaiola maior (gaiola 3) proporcionou maior número de ovos, porém, utilizando-se um casal por gaiola o tamanho da gaiola não influenciou significativamente o número de ovos ( $F_{2,45} = 0,16$ ;  $P = 0,8538$ ). Por outro lado, para cinco ( $F_{2,45} = 15,31$ ;  $P < 0,0001$ ) e 10 casais ( $F_{2,45} = 80,80$ ;  $P < 0,0001$ ) por gaiola foi possível observar diferenças significativas no número total de ovos, com maior número observado na gaiola 3. Em relação à densidade de casais, foi possível observar que em todas as densidades, um ( $F_{2,45} = 38,57$ ;  $P < 0,0001$ ), cinco ( $F_{2,45} = 89,25$ ;  $P < 0,0001$ ) e 10 ( $F_{2,45} = 204,33$ ;  $P < 0,0001$ ) casais por gaiola, houve diferenças significativas; as densidades de cinco e 10 casais proporcionaram maior número de ovos nas gaiolas 1 e 2, enquanto na gaiola 3, maior número de ovos foram observados na densidade de 10 casais, que diferiu significativamente das densidades de um e cinco casais, aos quais diferiram entre si.

Para o número de ovos por fêmea, a interação entre o tamanho de gaiola e a densidade de casais por gaiola foi significativa ( $F_{4,45} = 5,21$ ;  $P = 0,0015$ ). O tamanho da gaiola não influenciou significativamente o número de ovos por fêmea na densidade de um casal ( $F_{2,45} = 0,58$ ;  $P = 0,5639$ ), porém, na densidade de cinco casais, o tamanho da gaiola influenciou significativamente o número de ovos por fêmea ( $F_{2,45} = 10,05$ ;  $P = 0,0002$ ), com maiores valores na gaiola 3 e menores na gaiola 1. Na densidade de 10 casais, maior número de ovos foi observado na gaiola 3 ( $F_{2,45} = 15,78$ ;  $P < 0,0001$ ). Considerando o fator densidade de casais em relação ao tamanho da gaiola, foi possível verificar diferença significativa no número de ovos por fêmea, onde na gaiola 1 o maior número de ovos por fêmea foi observado na densidade de um casal ( $F_{2,45} = 39,45$ ;  $P < 0,0001$ ). Também foi observado maior número de ovos por fêmea na densidade de um casal na gaiola 2 ( $F_{2,45} = 27,43$ ;  $P <$

0,0001), enquanto para a gaiola 3, menor número de ovos por fêmea foi observado na densidade de 10 casais ( $F_{2,45} = 5,80$ ;  $P = 0,0057$ ).

A interação tamanho de gaiola x densidade de casais por gaiola para a viabilidade de ovos totais foi significativa ( $F_{4,45} = 19,89$ ;  $P < 0,0001$ ). O tamanho da gaiola não influenciou no número de ovos viáveis para a densidade de um casal ( $F_{2,45} = 0,11$ ;  $P = 0,8969$ ), porém, houve diferença significativa entre as gaiolas na densidade de cinco ( $F_{2,45} = 20,91$ ;  $P < 0,0001$ ) e 10 ( $F_{2,45} = 80,12$ ;  $P < 0,0001$ ) casais, onde maior número de ovos viáveis foram observados na gaiola 3. Foram verificadas diferenças significativas para as densidades na gaiola 1 ( $F_{2,45} = 25,93$ ;  $P < 0,0001$ ), 2 ( $F_{2,45} = 79,55$ ;  $P < 0,0001$ ) e 3 ( $F_{2,45} = 166,72$ ;  $P < 0,0001$ ), onde as densidade de cinco e 10 casais obtiveram as maiores médias para o número de ovos viáveis nas gaiolas 1 e 2. As densidades de casais diferiram significativamente entre si na gaiola 3, onde foi verificado que a densidade de 10 casais proporcionou maior número de ovos viáveis.

Em relação ao parâmetro número de ovos viáveis por fêmea houve interação significativa entre tamanho de gaiola e densidade de casais ( $F_{4,45} = 3,96$ ;  $P = 0,0077$ ). Foi possível visualizar a ocorrência de maior número de ovos viáveis por fêmea na densidade de um casal ( $F_{2,45} = 30,28$ ;  $P < 0,0001$ ) em insetos confinados em gaiola 1. Na gaiola 2 ( $F_{2,45} = 18,22$ ;  $P < 0,0001$ ) e gaiola 3 ( $F_{2,45} = 6,99$ ;  $P = 0,0023$ ) o número de ovos viáveis por fêmea foi maior nas densidades de um e cinco casais. Foi observado ainda que o tamanho da gaiola não interfere no número de ovos viáveis por fêmea na densidade de um casal ( $F_{2,45} = 0,40$ ;  $P = 0,6722$ ). Na densidade de cinco casais, maior número de ovos viáveis por fêmea foi observado na gaiola 3 ( $F_{2,45} = 12,35$ ;  $P < 0,0001$ ) e para a densidade de 10 casais, maiores valores foram obtidos nas gaiolas 2 e 3 ( $F_{2,45} = 12,41$ ;  $P < 0,0001$ ).

Para a fertilidade dos ovos, a interação dos fatores avaliados também foi significativa ( $F_{4,45} = 8,17$ ;  $P < 0,0001$ ). Não foi observada diferença entre as gaiolas para a densidade de um casal ( $F_{2,45} = 0,33$ ;  $P = 0,7176$ ). Por outro lado, o tamanho de gaiola diferiu significativamente para as densidades de 5 ( $F_{2,45} = 5,89$ ;  $P = 0,0054$ ) e 10 ( $F_{2,45} = 21,39$ ;  $P < 0,0001$ ) casais, onde maiores fertilidades ocorreram na gaiola 3 para a densidade de cinco casais e na gaiola 2 para 10 casais. Não houve diferença significativa para a fertilidade de ovos nas densidades de casais na gaiola

1 ( $F_{2,45} = 3,06$ ;  $P = 0,0566$ ). A densidade de casais teve significância para a gaiola 2 ( $F_{2,45} = 11,94$ ;  $P < 0,0001$ ) e 3 ( $F_{2,45} = 6,79$ ;  $P < 0,0026$ ), onde maiores índices de fertilidade ocorreram nas densidades de 10 e cinco casais nas gaiolas 2 e 3, respectivamente.

Em relação à longevidade de adultos de *H. armigera*, a interação tamanho de gaiola x densidade de casais por gaiola foi significativa ( $F_{4,45} = 10,76$ ;  $P < 0,0001$ ). De maneira geral, a gaiola 3 proporcionou maior longevidade dos adultos, porém, para um casal por gaiola o tamanho da gaiola não influenciou significativamente esse parâmetro ( $F_{2,45} = 1,79$ ;  $P = 0,1782$ ). Por outro lado, os adultos apresentaram menor longevidade na gaiola 1, na densidade de cinco ( $F_{2,45} = 18,22$ ;  $P < 0,0001$ ) e 10 ( $F_{2,45} = 38,52$ ;  $P < 0,0001$ ) casais. Além disso, a longevidade de adultos na densidade de um casal foi maior, diferindo das densidades de cinco e 10 casais, que por sua vez diferiram entre si nas gaiolas 1 ( $F_{2,45} = 176,44$ ;  $P < 0,0001$ ) e 2 ( $F_{2,45} = 68,60$ ;  $P < 0,0001$ ). A longevidade de adultos de *H. armigera* foi maior na densidade de um casal na gaiola 3, diferindo das densidades de cinco e 10 casais, que não diferiram entre si ( $F_{2,45} = 51,72$ ;  $P < 0,0001$ ). O tamanho da gaiola de oviposição e a densidade de casais por gaiola são variáveis importantes a serem consideradas, e nesse experimento constatou-se que o tamanho da gaiola para oviposição e a densidade de casais interferem na reprodução em criação massal de *H. armigera*. Desta forma, para a metodologia de criação massal de *H. armigera*, adotou-se a gaiola de PVC de 20 cm de comprimento x 20 cm diâmetro para oviposição e a densidade de cinco casais por gaiola, em razão do maior número de ovos totais e viáveis por fêmea, o que sugere que a gaiola e a densidade selecionadas foram adequadas ao inseto a desempenhar suas funções reprodutivas.



Tabela 8. Médias ( $\pm$  EP) dos parâmetros reprodutivos de *Helicoverpa armigera* em diferentes tamanhos de gaiola e densidades de casais. T  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; UR  $60 \pm 5\%$ ; Fotofase 12h.

Interação tamanho da gaiola x densidade de casais para número de ovos totais			
Tamanho de gaiola	Densidade de casais		
	1	5	10
1 <sup>1</sup>	1093,50 $\pm$ 74,89 aA	3214,50 $\pm$ 187,45 aB	2745,00 $\pm$ 820,10 aB
2 <sup>2</sup>	1163,67 $\pm$ 77,50 aA	4268,33 $\pm$ 159,72 bB	4805,67 $\pm$ 500,10 bB
3 <sup>3</sup>	1067,50 $\pm$ 114,09 aA	5284,50 $\pm$ 431,07 cB	7898,33 $\pm$ 363,75 cC
Interação tamanho da gaiola x densidade de casais para número de ovos por fêmea			
1	1093,50 $\pm$ 74,89 aC	642,90 $\pm$ 37,49 aB	274,50 $\pm$ 8,20 aA
2	1163,67 $\pm$ 77,50 aC	853,67 $\pm$ 31,94 abB	480,57 $\pm$ 50,01 aA
3	1067,50 $\pm$ 114,09 aB	1056,90 $\pm$ 86,21 bB	789,83 $\pm$ 36,37 bA
Interação tamanho da gaiola x densidade de casais para número de ovos viáveis totais			
1	681,17 $\pm$ 50,66 aA	1922,17 $\pm$ 133,66 aB	1459,83 $\pm$ 52,67 aB
2	740,00 $\pm$ 67,55 aA	2717,00 $\pm$ 77,52 bB	3242,67 $\pm$ 370,46 bB
3	694,50 $\pm$ 84,08 aA	3633,33 $\pm$ 337,09 cB	4891,50 $\pm$ 164,15 cC
Interação tamanho da gaiola x densidade de casais para número de ovos viáveis por fêmea			
1	681,17 $\pm$ 50,66 aC	384,43 $\pm$ 26,73 aB	145,98 $\pm$ 5,27 aA
2	740,00 $\pm$ 67,55 aB	543,40 $\pm$ 15,51 abB	324,27 $\pm$ 37,05 abA
3	694,50 $\pm$ 84,08 aAB	726,67 $\pm$ 67,42 bB	489,15 $\pm$ 16,41 bA
Interação tamanho da gaiola x densidade de casais para fertilidade (%)			
1	50,66 $\pm$ 1,11 aA	52,52 $\pm$ 1,42 aA	47,24 $\pm$ 0,81 aA
2	51,02 $\pm$ 2,75 aA	54,15 $\pm$ 1,17 aA	61,35 $\pm$ 1,16 cB
3	52,35 $\pm$ 2,01 aA	59,63 $\pm$ 0,89 bB	53,13 $\pm$ 1,46 bA
Interação tamanho da gaiola x densidade de casais para longevidade			
1	21,17 $\pm$ 0,75 aC	9,58 $\pm$ 0,39 aB	7,52 $\pm$ 0,37 aA
2	19,50 $\pm$ 1,15 aC	11,92 $\pm$ 0,41 bB	10,09 $\pm$ 0,20 bA
3	21,50 $\pm$ 1,06 aC	13,50 $\pm$ 0,39 bB	12,41 $\pm$ 0,42 cA

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

<sup>1</sup> gaiola de tubo de PVC de 20 cm de altura x 10 cm de diâmetro.

<sup>2</sup> gaiola de tubo de PVC de 20 cm de altura x 15 cm de diâmetro.

<sup>3</sup> gaiola de tubo de PVC de 20 cm de altura x 20 cm de diâmetro.

### 3.7 Validação da metodologia de criação de *Helicoverpa armigera*

Os dados do desenvolvimento larval e pupal de *H. armigera* ao longo de gerações estão apresentados na Tabela 9. Houve diferenças significativas no tempo de desenvolvimento no estágio larval ( $F_{3,36} = 67,74$ ;  $P < 0,0001$ ). Ao longo das gerações o período larval apresentou oscilação entre as gerações, enquanto para o período de desenvolvimento pupal ( $F_{3,36} = 1,94$ ;  $P = 0,1399$ ) não ocorreu diferenças entre as gerações.

Houve diferenças significativas no peso corpóreo de lagartas ( $F_{3,36} = 41,07$ ;  $P < 0,0001$ ) e pupas ( $H_{3,36} = 20,93$ ;  $P < 0,0001$ ) em *H. armigera* criada nas diferentes gerações. Lagartas e pupas na ultima geração avaliada foram mais pesadas, enquanto as lagartas da primeira geração foram as mais leves. A sobrevivência nas fases larval ( $H_{3,36} = 0,78$ ;  $P = 0,8542$ ) e pupal ( $H_{3,36} = 1,5554$ ;  $P < 0,6696$ ) não foram significativamente diferentes entre as gerações.

Os índices de desenvolvimento foram variáveis entre as gerações de *H. armigera*. O índice larval foi significativamente diferente ( $H_{3,36} = 11,16$ ;  $P < 0,0109$ ) entre as gerações; as lagartas da oitava geração apresentaram maiores índices de desenvolvimento em comparação com as lagartas da segunda geração. O índice de desenvolvimento pupal ( $H_{3,36} = 0,6749$ ;  $P = 0,8791$ ) não apresentou diferença entre as gerações. De forma geral, os resultados verificados na metodologia utilizada ao longo das gerações não apresentaram grandes variações, o que reforça ser uma metodologia adequada a ser utilizada na criação de *H. armigera* em laboratório.

Tabela 9. Médias ( $\pm$  EP) dos parâmetros de desenvolvimento de *Helicoverpa armigera* ao longo de gerações (2<sup>a</sup>; 4<sup>a</sup>; 8<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup>). T  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ; UR  $60 \pm 5\%$ ; Fotofase 12h.

Parâmetros	Geração			
	2 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>
<i>Período de desenvolvimento (dias)</i>				
Larval <sup>1</sup>	18,60 $\pm$ 0,17 d	16,45 $\pm$ 0,15 b	15,57 $\pm$ 0,16 a	17,23 $\pm$ 0,13 c
Pupal <sup>1</sup>	11,66 $\pm$ 0,11 a	11,61 $\pm$ 0,12 a	11,65 $\pm$ 0,08 a	11,90 $\pm$ 0,07 a
<i>Peso (mg)</i>				
Larval <sup>1</sup>	300,96 $\pm$ 14,79 a	419,16 $\pm$ 4,60 b	337,83 $\pm$ 12,30 a	470,23 $\pm$ 13,57 c
Pupal <sup>2</sup>	384,54 $\pm$ 21,25 a	378,29 $\pm$ 7,20 a	398,21 $\pm$ 5,37 a	466,33 $\pm$ 6,46 b
<i>Sobrevivência (%)</i>				
Larval <sup>2</sup>	88,00 $\pm$ 3,27 a	90,00 $\pm$ 3,33 a	90,00 $\pm$ 3,33 a	92,00 $\pm$ 3,27 a
Pupal <sup>2</sup>	89,00 $\pm$ 3,71 a	89,50 $\pm$ 3,53 a	91,50 $\pm$ 3,50 a	94,00 $\pm$ 3,05 a
<i>Índice de desenvolvimento</i>				
Larval <sup>2</sup>	4,73 $\pm$ 0,17 a	5,47 $\pm$ 0,19 ab	5,79 $\pm$ 0,23 b	5,34 $\pm$ 0,20 ab
Pupal <sup>2</sup>	7,63 $\pm$ 0,32 a	7,71 $\pm$ 0,30 a	7,87 $\pm$ 0,33 a	7,90 $\pm$ 0,26 a

Médias seguidas por letras diferentes nas linhas são significativamente diferentes pelo teste de Tukey<sup>1</sup> ou Dunn<sup>2</sup> ( $P < 0,05$ ).

#### 4 Discussão

A escolha de uma metodologia adequada é parte fundamental no sucesso de criações massais de insetos. O desenvolvimento de uma metodologia ideal requer estudos que abordem tanto a qualidade nutricional do alimento quanto a qualidade ambiental fornecida para o desenvolvimento do inseto alvo. Para isso, deve-se desenvolver uma metodologia eficiente e prática, que de forma simples facilite a obtenção de insetos saudáveis e em quantidades desejáveis. Neste estudo, ao desenvolver uma metodologia prática de criação para *H. armigera*, procurou-se ter como meta o bem-estar dos insetos multiplicados em laboratório, pois se acredita que o bem-estar está diretamente relacionado com a qualidade ambiental fornecida para o desenvolvimento do inseto.

Muitos fatores no processo de criação podem afetar o desempenho de *H. armigera*. Por exemplo, o controle nutricional é um fator importante para a criação do inseto em laboratório, e conseqüentemente para qualquer estudo sobre insetos (COHEN, 2001). Segundo Simpson et al. (2004), é primordial fornecer uma alimentação nutricionalmente equilibrada para os insetos, de forma que ocorra o mínimo custo adaptativo. Nesta pesquisa foi adotada a dieta artificial cuja composição proporcionou adequado desenvolvimento e elevados índices nutricionais e populacionais a *H. armigera*.

Os resultados deste estudo demonstram que o conceito do bem-estar animal é totalmente aplicável em criação massal de *H. armigera*. O recipiente, a densidade larval, a forma de disponibilidade, quantidade de alimento utilizado no desenvolvimento larval dos insetos, a gaiola de oviposição e a densidade de casais em cada gaiola podem resultar em maior eficiência na criação de *H. armigera* em laboratório. Desse modo, a otimização do método de criação está necessariamente relacionada com o bem-estar do inseto, haja vista que em muitos casos as respostas obtidas no desenvolvimento e no comportamento dos insetos estão diretamente relacionadas com alimentação e estrutura de condução da criação. Assim, esses fatores conferem o bem-estar aos insetos e proporcionam a manutenção contínua da criação durante longo período de tempo, com uniformidade biológica requerida para finalidades de pesquisas. Apesar dos interessantes resultados obtidos, alguns ajustes ainda podem ser necessários para o aperfeiçoamento da metodologia escolhida para que o bem-estar do inseto seja aumentado. As implicações sobre os resultados obtidos nesse estudo, e algumas sugestões para potenciais melhorias na metodologia de criação de *H. armigera* em laboratório são discutidas a seguir.

Para o pleno desenvolvimento, o local de contenção do inseto deve garantir espaço suficiente para locomoção, abrigo e facilidade na localização do alimento (DeGOEDE et al., 2013). No presente estudo foi observada variação nos parâmetros biológicos de *H. armigera* quando criada em diferentes recipientes durante a fase larval. Logo após a eclosão e inoculação, as lagartas neonatas apresentaram dificuldade para localizar o alimento no recipiente maior, em decorrência do comportamento natural das lagartas em locomover para a região superior do recipiente de criação e posteriormente localizar o alimento. Esse tempo inicial sem

alimento pode ocasionar retardo no desenvolvimento ou mortalidade como verificado nos resultados. A disponibilidade do alimento também interferiu nos parâmetros biológicos analisados; a maior facilidade de alcance do alimento quando se utilizou o tubo de vidro de fundo chato e a placa de Petri com a dieta artificial formando ângulo de 15° na lateral favoreceram a localização imediata do alimento pelas lagartas. De forma geral, o bioensaio demonstrou que o tubo de vidro de fundo chato e a placa de Petri com a dieta artificial formando ângulo na lateral foram os recipientes e a disponibilidade de alimento mais adequados para o desenvolvimento de *H. armigera* por proporcionar os melhores resultados nos parâmetros biológicos do inseto.

A placa de Petri com a dieta artificial formando ângulo na lateral do recipiente foi escolhida para ser utilizada na criação massal por apresentar vantagens em relação ao tubo de fundo chato. Em decorrência do tamanho das lagartas no final do desenvolvimento, a área livre no tubo de vidro chato foi um fator limitante para a locomoção do inseto, além da dificuldade na retirada das pupas e o potencial risco de acidente com o manuseio de vidrarias. Por outro lado, a placa de Petri proporcionou espaço suficiente para locomoção do inseto, maior ganho operacional na condução da criação e a forma de disponibilização conferiu maior aproveitamento do alimento.

Vale ressaltar que disponibilizando o alimento concentrado em uma área e formando-se um ângulo de 15° proporcionaram melhores características físicas à dieta em relação à utilização de porções cortadas ao centro do recipiente, fator este que tem relevância em criações massais com dietas artificiais (COHEN, 2015). Verificou-se que no início da alimentação, as lagartas preferiram se alimentar da fina camada formada entre o recipiente e a borda da dieta artificial. Outra ocorrência observada, devido à disposição da dieta, foi menor o contato do alimento com as fezes do inseto; assim, após o terceiro ínstar, as lagartas se acomodavam no fundo do recipiente, se alimentavam e depositavam os excrementos fecais separadamente da dieta artificial. Este comportamento não ocorreu quando a dieta artificial foi depositada completamente no fundo dos recipientes, onde o alimento estava em constante contato com as fezes das lagartas de *H. armigera*. Com a escolha do recipiente e forma de disponibilidade do alimento mais adequado ao inseto foi possível contemplar o seu bem-estar, evitando o consumo do alimento em contato

com as fezes. Também, com o menor contato do alimento com as fezes, a sanidade da criação pode ser favorecida com a menor ocorrência de fungos e bactérias nas dietas, que pode levar a perda da unidade de produção (MALDONADO; POLANÍA, 2010; GRENIER, 2012).

Em uma criação massal, um dos maiores impactos no custo operacional está relacionado com o alto preço dos ingredientes necessários para a produção da dieta artificial. Embora tenha ocorrido algum sucesso nos esforços para produzir uma dieta artificial para *H. armigera* com menor custo de produção (AHMED; KHALIQUE; MALIK, 1998; ABBASI et al., 2007), em muitos casos ocorre decréscimo no desenvolvimento do inseto, afetando os aspectos nutricionais e em longo prazo o potencial demográfico de *H. armigera* quando a alimentação não é adequada. Como resultado, a razão de redução de custos é diminuída. Dessa forma, uma variável que pode ser trabalhada para diminuir os custos de produção é referente à quantidade de alimento disponibilizada para alimentação na fase larval. Assim, evita-se o desperdício de alimento quando oferecido *ad libitum* e atende-se perfeitamente o princípio do bem-estar do inseto quanto a mantê-los livres de fome e, portanto, com alimento suficiente para uma adequada nutrição e pleno desenvolvimento.

Os resultados obtidos no ensaio onde foi avaliada a quantidade de alimento requerida para o desenvolvimento larval de *H. armigera* mostraram que os valores quantitativos oferecidos foram suficientes um desenvolvimento adequado. Mesmo que nem todos os aspectos biológicos tenham sido diferentes entre os tratamentos, a menor quantidade de dieta oferecida, em alguns casos foi exigida dos insetos uma restrição alimentar no final da fase larval. Para insetos holometábolos a qualidade e quantidade de alimento ingerido na fase larval são de grande importância, pois após o forrageamento o alimento é metabolizado e posteriormente utilizado para a manutenção das atividades biológicas, como crescimento, alimentação, armazenamento de reservas nutricionais, reprodução ou outras atividades para produzir o conjunto da história de vida (SCHOWALTER, 2011; PARRA; PANIZZI; HADDAD, 2012).

A teoria de história de vida e modelos de alocação de recursos prevê compensações entre características iniciais e finais do desenvolvimento animal, de tal forma que a alocação de recursos na fase imatura irá interferir na vida útil e

reprodutiva da fase adulta (ZERA; HARSHMAN, 2001; BOGGS, 2009; NIITEPÖLD; PEREZ; BOGGS, 2014). Quando ocorre restrição alimentar na fase larval, pode ser requerido do inseto alocação de recursos destinados para uma determinada atividade para atender outra função (BOGGS, 2009); por exemplo, os recursos nutricionais armazenados para reprodução serem gastos para a manutenção na fase jovem (DMITRIEW; ROWE, 2011). Como esperado, a restrição alimentar durante a fase larval influenciou significativamente algumas características de *H. armigera*, com maiores mortalidades larval e pupal e redução no peso das pupas.

Resultados comparáveis em relação aos efeitos da restrição alimentar foram encontrados (BAUERFEIND; FISCHER, 2005), onde foi verificado que a restrição na fase larval de *Bicyclus anynana* (Butler) (Lepidoptera: Nymphalidae) ocasionou prolongamento no desenvolvimento e redução da taxa de crescimento e na fase adulta, os efeitos prejudiciais ocorreram na reprodução, onde se observou menor fecundidade. Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo apoia a visão convencional de que a restrição de recursos durante o desenvolvimento larval se traduz em qualidade de desenvolvimento inferior devido aos efeitos prejudiciais nas fases posteriores do inseto. Assim, adotou-se o valor quantitativo de 5,5g de dieta artificial oferecido por inseto na fase larval da criação de *H. armigera* em laboratório, pois foi a quantidade de alimento suficiente para o pleno desenvolvimento larval, com menor perda de alimento em comparação com o maior volume oferecido.

A densidade utilizada em criações tem sido considerada um fator importante que influencia o desenvolvimento e sobrevivência dos insetos (SONLEITNER, 1964). A competição intraespecífica pode ter efeitos benéficos (DENNO; BENREY, 1997; SILLANPÄÄ, 2008) ou deletérios no desenvolvimento de insetos (DUTTA; DEKA; DEVI, 2013). Em alta densidade, os insetos tendem a apresentar variação no desenvolvimento pré-imaginal em comparação com indivíduos da mesma espécie criados em baixa densidade. Essas variações podem ser observadas em várias características como, peso de lagartas e pupas, tempo de desenvolvimento e comportamento, além de maior predisposição a doenças.

Os efeitos da densidade de criação nos parâmetros biológicos de *H. armigera* diferiram entre os níveis de densidade, porém, o fator mais importante a ser considerado está relacionado com o período de tempo de confinamento agregado.

Em lepidópteros, a maior competição por alimento e espaço ocorre em ínstares mais adiantados (MASON; CANNIZZO; RAFFA, 2014). Resultados semelhantes foram observados no presente estudo, onde foi possível verificar que os efeitos deletérios ao desenvolvimento aumentaram em decorrência da maior idade das lagartas. Dessa forma, para criação massal, a manutenção de lagartas de *H. armigera* agregadas deve ocorrer apenas nos primeiros dias de desenvolvimento. Segundo Kakimoto, Fujisaki e Miyatake (2003), para *H. armigera*, em condições de campo, a mudança na distribuição espacial ao longo do tempo de agregada para uniforme é o resultado da competição por espaço e recursos alimentares.

De acordo com Hoffmann, Collins e Woods (2002) alterações no desenvolvimento e nas características morfológicas de *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) foram relacionadas com o estresse ambiental. Assim, o regime de confinamento agregado nos primeiros dias de vida de *H. armigera* foi possível desde que foram utilizados adequadamente densidade, período e espaço.

A fecundidade (número de ovos produzidos) e a fertilidade (número de larvas eclodidas) são fatores importantes que devem ser abordados para o sucesso na criação massal de insetos. Para o pleno desempenho das funções reprodutivas, os insetos adultos requerem condições estruturais e nutricionais ideais (PETERS; BARBOSA, 1977). Para lepidópteros em particular, a alimentação ingerida e as reservas nutricionais adquiridas na fase larval são de grande importância, pois irão influenciar a reprodução na fase adulta (HONEK, 1993; ARRESE; SOULAGES, 2010; SCHOWALTER, 2011). Em estudos anteriores, foi observado que o potencial reprodutivo de *H. armigera* sofreu influência da alimentação recebida na fase larval (WAKIL et al., 2011), enquanto para a fase adulta, a alimentação com açúcar e água foi suficiente para manter o desempenho reprodutivo da espécie (SONG et al., 2007; NIMBALKAR; GIRI, 2015).

Nesse sentido, foi realizado um ensaio para demonstrar que a longevidade, o período de oviposição, a fecundidade e a fertilidade também são influenciados pelas condições estruturais. A influência da densidade populacional de adultos de *H. armigera* em criações massais de laboratório, embora importante, raramente tem sido investigada. No presente estudo, observou-se que a densidade de casais e o tamanho da gaiola influenciaram a fecundidade e a sobrevivência de *H. armigera*, o



que permite afirmar que o espaço é um fator limitante para a oviposição. Assim, para garantir o crescimento na população de *H. armigera* em laboratório, o mais indicado seria a utilização de menor número de casais por gaiolas ou utilizar gaiolas de maior tamanho, o que resultará em maior produção de ovos.

Com a análise conjunta de todos os dados foi possível determinar uma metodologia adequada de criação massal de *H. armigera* em laboratório, onde buscou-se fornecer ao inseto as melhores condições para seu desenvolvimento na fase imatura. Assim, seguindo a metodologia, foram determinados o período de tempo nos ínstaes do estágio larval, período pupal, comprimento da cápsula cefálica e do corpo do inseto imaturo e a razão de crescimento. O crescimento dos insetos pode ser acompanhado pelas mudanças no tamanho da cápsula cefálica. A lei de Dyar sugere que as partes esclerotizadas crescem em progressão linear, aumentando em razão regular de 1,2 a 1,4 em estádios sucessivos (DYAR, 1890). De acordo com a regra de Przibam, a razão de crescimento nas estruturas aumenta de forma constante de 1,26 (CHAPMAN; SIMPSON; DOUGLAS, 2013). Embora a determinação do número de ínstaes baseada em regras empíricas ser amplamente utilizada e considerada invariável dentro das espécies, esses métodos têm recebido críticas por não se aplicar a certos grupos de insetos, indicarem falsos estádios e também pelo fato de a variabilidade intraespecífica no número de estádios não ser um fenômeno excepcional (GAINES; CAMPBELL, 1935; SEHNAL, 1985; CHEN; SEYBOLD, 2013).

Com base em medições diárias da largura da cápsula cefálica, este estudo verificou a formação de cinco grupos bem definidos, cada um indicando um estágio larval de *H. armigera* utilizando-se a metodologia proposta. A razão de crescimento das cápsulas cefálicas não se ajustou às regras empíricas. Estudos anteriores encontraram divergências quanto ao número de ínstaes de *H. armigera*, apresentando cinco, seis ou sete entre alguns estudos (STAVRIDIS, et al., 2003; MOHAMMADI et al., 2010; KHORASIYA et al., 2014; BARBOSA et al., 2016). De acordo com Casimero et al. (2000), cinco ínstaes larvais em *H. armigera* foi a ocorrência mais predominante nas lagartas alimentadas em dieta artificial e estruturas reprodutivas do algodão, quiabo e milho.

Vários fatores podem estar relacionados em influenciar o número de ínstaes, em particular aqueles relacionados com as condições do ambiente, qualidade e quantidade de alimento e metodologia utilizada na criação dos insetos, e normalmente em condições inadequadas o número de ínstaes tende a aumentar (SLANSKY JR; RODRIGUEZ, 1987; ESPERK; TAMMARU; NYLIN, 2007). No presente estudo, a ocorrência de cinco ínstaes bem definidos, medidas de cápsulas cefálicas bem ajustadas, crescimento do corpo de forma constante e regular e desenvolvimento em período de tempo curto demonstram que a metodologia proposta para criação de *H. armigera* foi eficiente. Assim, em decorrência do desenvolvimento harmonioso dos insetos, acredita-se que o bem-estar de *H. armigera* foi atendido com sucesso.

Os insetos multiplicados em criação massal em laboratório são submetidos a vários processos não naturais, incluindo proteção contra interações bióticas e abióticas por longo período de tempo. Esses por sua vez, devem manter as características biológicas naturais iniciais para garantir um padrão de qualidade a serem utilizados em uma ampla gama de estudos. Infelizmente, em contraste com a seleção natural que favorece um conjunto de características biológicas nos insetos, a manutenção de colônias de insetos em laboratório pode ocasionar algumas alterações. Segundo Sørensen, Addison e Terblanche (2012), a manutenção de colônias em laboratório pode causar mudanças fenotípicas e genotípicas nos insetos, como decréscimo no potencial biológico, diminuição da heterozigose e alterações nas interações intra e interespecíficas. Assim, as consequências das adaptações em laboratório vão depender das características de interesse.

Para manter a qualidade biológica em criações massais é exigido um considerável esforço (FRITZ et al., 2016). Nesse sentido restrito, o que define o esforço para produzir insetos de qualidade desejada pode estar relacionado à adoção de procedimentos que minimizem o decréscimo biológico ou que mantêm o nível de desempenho semelhante ao do natural. Assim, a adaptabilidade de *H. armigera* em laboratório, a capacidade de desenvolver em muitas dietas artificiais e a manutenção das características mensuráveis, como o tempo de desenvolvimento, os pesos de lagartas e pupas e sobrevivência ao longo do tempo possam ser variáveis que auxiliem no controle de qualidade. As variações nos parâmetros

biológicos ao longo do tempo podem estar relacionadas com adaptações de *H. armigera* na metodologia proposta. Vários estudos demonstraram aumento nos parâmetros de desenvolvimento com insetos alimentados em dietas artificiais. Em relação a *H. armigera*, foi verificado que o maior desenvolvimento biológico ocorreu em insetos alimentados em dietas artificiais em comparação com estruturas de vegetais (CASIMERO et al., 2000; JHA; CHI; TANG, 2012). Dessa forma, em criações massais de *H. armigera* em dietas artificiais é de se esperar que os insetos apresentem maior peso e menor tempo de desenvolvimento em decorrência da alimentação equilibrada fornecida.

Verificaram-se algumas diferenças no desempenho de *H. armigera* ao longo das gerações, uma consideração importante para futuros estudos que utilizam insetos criados em laboratório por muitas gerações e extrapolam para as populações selvagens, pois o desempenho de colônias laboratoriais podem não representar semelhanças com as populações naturais. O alimento oferecido na fase larval também pode ocasionar variações na suscetibilidade de *H. armigera* à proteína Bt ao longo do tempo (NIMBALKAR; GIRI, 2015). Da mesma forma, Mahon, Olsen e Downes (2008) concluíram que as variações na ocorrência de alelos que conferem resistência de *H. armigera* à proteína Cry2Ab estavam relacionadas com adaptações de caráter genético ocorridas em colônias de laboratório ao longo de gerações.

Mediante os resultados obtidos no desenvolvimento de *H. armigera*, constatou-se que a metodologia utilizada foi apropriada para o inseto em criação massal em laboratório por longo período de tempo (12 gerações). Para superar os efeitos adaptativos no desenvolvimento de insetos criados em laboratório e otimizar a produção de insetos com padrão de qualidade e características semelhantes às das populações selvagens, novas abordagens e investigações interdisciplinares devem ser implementadas. Para *H. armigera*, a depressão gênica por endogamia e a seleção inadvertida podem ser superadas com o estabelecimento inicial da colônia de laboratório com um grande número de insetos obtidos de diferentes regiões, mantendo estes insetos em uma única população ou em grupos de insetos separados por região, e ao longo do tempo estabelecer cruzamentos entre os grupos.

Outra importante medida que pode ser implementada para evitar a perda do potencial biótico em laboratório está relacionada com a introdução periódica de insetos selvagens na criação massal, proporcionando cruzamentos entre machos e fêmeas de populações distintas. Assim, é de se esperar que os efeitos deletérios na criação massal ao longo do tempo possam ser amenizados. Quanto à qualidade do potencial biológico de *H. armigera* em criações massais, a realização de estudos comparativos com insetos selvagens podem ser verificados em teste comportamentais e biológicos mais importantes para a sobrevivência do inseto (HUETTEL, 1976), por exemplo, a aceitação de hospedeiros preferenciais, capacidade de dispersão, parâmetros relacionados com a história de vida e suscetibilidade a produtos químicos e biológicos.

## 5 Conclusão

A metodologia desenvolvida é apropriada para criação massal de *H. armigera* em laboratório.

Placa de Petri de acrílico (6,0 cm de diâmetro x 2,0 cm de altura) é o recipiente mais adequado para criação de *H. armigera* na fase larval.

A forma de oferecimento da dieta artificial mais indicada para lagartas de *H. armigera* é a dieta concentrada na metade do recipiente formando ângulo de 15 graus.

A quantidade de 5,5 gramas de dieta artificial MAG (dieta artificial modificada da dieta artificial para lagarta-da-soja) atente as necessidades quantitativas de alimento para *H. armigera* na fase larval.

Cinco dias é o período máximo para ocorrer à individualização de lagartas de *H. armigera* nas densidades de 20, 40, 80 e 120 lagartas por recipiente.

O recipiente de 1000 mL é o mais indicado para criação de *H. armigera* no período pré-individualização.

*Helicoverpa armigera* apresenta cinco ínstares larvais na metodologia de criação desenvolvida.

A gaiola 3 de oviposição (20 cm de diâmetro x 20 cm de altura) é a mais indicada para criação de *H. armigera*.

A densidade de cinco casais na gaiola 3 é a que mais favorece a fecundidade e fertilidade de *H. armigera*.

Os parâmetros de desenvolvimento e reprodutivos de *H. armigera* estão condicionados com as condições estruturais oferecidas.

A adoção do conceito de bem-estar animal em criações de insetos é pertinente para a adoção de protocolos laboratoriais.

Com o uso das condições ambientais, estruturais e de alimentação preconizadas na metodologia de criação para *H. armigera* o bem-estar do inseto é atendido.

## 6 Referências

ABBASI, B. H.; AHMED, K.; KHALIQUE, F.; AYUB, N.; LIU, H. J.; KAZMI, S. A. R.; AFTAB, M. N. Rearing the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, on a tapioca-based artificial diet. **Journal of Insect Science**, Annapolis, v. 7, p. 1-7, 2007.

ADAMO, S. A.; BAKER, J. L. Conserved features of chronic stress across phyla: the effects of long-term stress on behavior and the concentration of the neurohormone octopamine in the cricket, *Gryllus texensis*. **Hormones and Behavior**, New York, v. 60, p. 478-483, 2011.

ADAMO, S. A. Why should an immune response activate the stress response?. Insights from the insects (the cricket *Gryllus texensis*). **Brain, Behavior, and Immunity**, Amsterdam, v. 24, p. 194-200, 2010.

AHMED, K.; KHALIQUE, F.; MALIK, B. A. Modified artificial dieta for mass rearing of chickpea pod borer, *Helicoverpa (Heliothis) armigera* (Hübner). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Dubai, v. 1, p. 183-187, 1998.

AKHURST, R. J.; JAMES, W. J.; BIRD, L. J.; BEARD, C. Resistance to the Cry1Ac  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 96, p. 1290-1299, 2003.

ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 55, p. 207-225, 2010.

BAILES, E. J.; OLLERTON, J.; PATTRICK, J. G.; GLOVER, B. J. How can an understanding of plant–pollinator interactions contribute to global food security?. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 26, p. 72-79, 2015.

BARBOSA, T. A. N.; MENDES, S. M.; RODRIGUES, G. T.; RIBEIRO, P. E. A.; SANTOS, C. A.; VALICENTE, F. H.; OLIVEIRA, C. M. Comparison of biology between *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) reared on artificial diets. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 99, p. 72-76, 2016.

BAUERFEIND, S. S.; FISCHER, K. Effects of food stress and density in different life stages on reproduction in a butterfly. **Oikos**, Copenhagen, v. 111, p. 514-524, 2005.

BOGGS, C. L. Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. **Functional Ecology**, Oxford, v. 23, p. 27-37, 2009.

BOLLER, E. F.; CHAMBERS, D. L. Quality aspects of mass-reared insects. In: RIDGWAY, R. L.; VINSON, S. B. (Eds.), **Biological Control by Augmentation of Natural Enemies**. New York: Plenum Press, 1977. p. 219-235.

BOXALL, R. A. Post-harvest losses to insects – a world overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 48, p. 137-152, 2001.

BRAMBELL, R. **Report of the technical committee to enquire into the welfare of animals kept under intensive livestock husbandry systems**. London: Her Majesty's Stationary Office. London: H. M. Stationery Office, 1965. p. 9-15.

CASIMERO, V.; TSUKUDA, R.; NAKASUJI, F.; FUJISAKI, K. Effect of larval diets on the survival and development of larvae in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 35, p. 69-74, 2000.

CHAMBERS, D. L. Quality control in mass rearing. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 22, p. 289-308, 1977.

CHAPMAN, R. F.; SIMPSON, S. J.; DOUGLAS, A. E. **The insects**: structure and function. Cambridge: Cambridge University Press. 2013. p. 398-462.

CHEN, Y.; SEYBOLD, S. J. Application of a frequency distribution method for determining instars of the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) from widths of cast head capsules. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.106, p. 800-806, 2013.

COHEN, A. C. Formalizing insect rearing and artificial diet technology. **American Entomologist**, Lanham, v. 47, p. 198-206, 2001.

COHEN, A. C. **Insect diets**: science and technology, Boca Raton: CRC Press, 2015. p. 1-164.

CUNNINGHAM, J. P.; ZALUCKI, M. P.; WEST, S. A. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): a new look at the behaviour and control of a polyphagous pest. **Bulletin of Entomological Research**, Barking, v. 89, p. 201-207, 1999.

DeGOEDE, D. M.; ERENS, J.; KAPSOMENOU, E.; PETERS, M. "Large scale insect rearing and animal welfare". In: RÖCKLINSBERG, H.; SANDIN, P. (Eds.). **The ethics of consumption**: the citizen, the market and the law. Wageningen: Academic Publishers, 2013. p. 236-242.

DEGRANDE, P. E.; OMOTO, C. Pragas: estancar prejuízos. **Revista Cultivar**, Pelotas, v. 15, p. 30-34, 2013.

DENNO, R. F.; BENREY, B. Aggregation facilitates larval growth in the neotropical nymphalid butterfly *Chlosyne janais*. **Ecological Entomology**, Oxford, v. 22, p. 133-141, 1997.

DMITRIEW, C.; ROWE, L. The effects of larval nutrition on reproductive performance in a food-limited adult environment. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, e17399, 2011.

DOWNES, S.; PARKER, T.; MAHON, R. Incipient resistance of *Helicoverpa punctigera* to the Cry2Ab Bt toxin in Bollgard II cotton. **PloS One**, San Francisco, v. 5, e12567, 2010.

DUTTA, S.; DEKA, M.; DEVI, D. Impact of crowding on larval traits and silk synthesis in eri silkworm. **Entomological News**, Lancaster, v. 123, p. 49-58, 2013.

DYAR, H. G. The number of molts of lepidopterous larvae. **Psyche**, Cambridge, v. 5, p. 420-422, 1890.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Ações emergenciais propostas pela Embrapa para o manejo integrado de *Helicoverpa* spp. em áreas agrícolas**, 2003. Disponível em:

<[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/Manejo-Helicoverpa%20\(2\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Manejo-Helicoverpa%20(2).pdf)>. Acesso em: 22 de set. 2016.

ERENS, J.; van ES, S.; HAVERKORT, F.; KAPSOMENOU, E.; LUIJBEN, A. **A bug's life: large-scale insect rearing in relation to animal welfare: project 1052**. Wageningen: Wageningen University, 2012. p. 7-17.

ESPERK, T.; TAMMARU, T.; NYLIN, S. Intraspecific variability in number of larval instars in insects. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, p. 627-645, 2007.

FITT, G. P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 34, p. 17-52, 1989.

FRITZ, M. L.; PAA, S.; BALTZEGAR, J.; GOULD, F. Application of a dense genetic map for assessment of genomic responses to selection and inbreeding in *Heliothis virescens*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 25, p. 385-400, 2016.

GAINES, J. C.; CAMPBELL, F. L. Dyar's rule as related to the number of instars of the corn earworm, *Heliothis obsoleta* (Fab.), collected in the field. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 28, p. 445-461, 1935.

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 69, p. 487-488, 1976.

GRENIER, S. Artificial rearing of entomophagous insects, with emphasis on nutrition and parasitoids - general outlines from personal experience. **Karaelmas Science and Engineering Journal**, Istanbul, v. 2, p. 1-12, 2012.



HOFFMANN, A. A.; COLLINS E.; WOODS, R. Wing shape and wing size changes as indicators of environmental stress in *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) moths: comparing shifts in means, variances, and asymmetries. **Environmental Entomology**, College Park, v. 31, p. 965-971, 2002.

HONEK, A. Intraspecific variation in body size and fecundity in insects: a general relationship. **Oikos**, Copenhagen, v. 66, p. 483-492, 1993.

HUETTEL, M. D. Monitoring the quality of laboratory-reared insects: a biological and behavioral perspective. **Environmental Entomology**, College Park, v. 5, p. 807-814, 1976.

JHA, R. K.; CHI, H.; TANG, L. C. A comparison of artificial diet and hybrid sweet corn for the rearing of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) based on life table characteristics. **Environmental Entomology**, College Park, v. 41, p. 30-39, 2012.

KAKIMOTO, T.; FUJISAKI, K.; MIYATAKE, T. Egg laying preference, larval dispersion, and cannibalism in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 96, p. 793-798, 2003.

KHORASIYA, S. G.; VYAS, H. J.; JETHA, D. M.; JOSHI, P. H. Biometrical analysis of *Helicoverpa armigera* (Hübner) Hardwick on pigeonpea. **International Journal of Plant Protection**, Muzaffarnagar, v. 7, p. 393-396, 2014.

KOGAN, M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 43, p. 243-270, 1998.

KRITICOS, D. J.; OTA, N.; HUTCHISON, W. D.; BEDDOW, J.; WALSH, T.; TAY, W. T.; BORCHERT, D. M.; PAULA-MORAES, S. V.; CZEPAK, C.; ZALUCKI, M. P. The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: is it just a matter of time?. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, e0133224, 2015.

LEPPLA, N. C.; MORALES-RAMOS, J. A.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; ROJAS, M. G. Introduction. In: MORALES-RAMOS, J. A.; ROJAS, M. G.; SHAPIRO-ILAN, D. I. (Eds.). **Mass production of beneficial organisms: invertebrates and entomopathogens**. London: Elsevier, 2014. p. 3-16.

MAHON, R. J.; OLSEN, K. M. DOWNES, S. Isolations of Cry2Ab resistance in australian populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) are allelic. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 101, p. 909-914, 2008.

MAKKAR, H. P. S.; TRAN, G.; HEUZÉ, V.; ANKERS, P. State-of-the-art on use of insects as animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 197, p. 1-33, 2014.

MALDONADO, H. A.; POLANÍA, I. Z. Evaluation of meridic diets suitable for efficient rearing of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica**, Calle, v. 13, p. 163-173, 2010.

MARTIN, E. A.; REINEKING, B.; SEO, B.; STEFFAN-DEWENTER, I. Natural enemy interactions constrain pest control in complex agricultural landscapes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, p. 5534-5539, 2013.

MARTIN, T.; OCHOU, G. O.; DJIHINTO, A.; TRAORE, D.; TOGOLA, M.; VASSAL J. M.; VAISSAYRE, M.; FOURNIER, D. Controlling an insecticide-resistant bollworm in West Africa. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 107, p. 409-411, 2005.

MASON, C. J.; CANNIZZO, Z.; RAFFA, K. F. Influence of diet and density on laboratory cannibalism behaviors in gypsy moth larvae (*Lymantria dispar* L.). **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 27, p. 693-700, 2014.

MASON, G. J. Species differences in responses to captivity: stress, welfare and the comparative method. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 25, n. 12, 2010.

McCAFFERY, A. R. Resistance to insecticides in heliothine lepidoptera: a global view. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, London, v. 353, p. 1735-1750, 1998.

McCULLOCH, S. P. A critique of FAWC's five freedoms as a framework for the analysis of animal welfare. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, New York, v. 26, p. 959-975, 2013.

MEIJDEN, E. van der. Herbivorous insects – a threat for crop production. In: LUGTENBERG, B. (Ed.). **Principles of plant-microbe interactions**. London: Springer, 2015. p. 103-114.

MOHAMMADI, D.; ABAD, R. F. P.; RASHIDI, M. R.; MOHAMMADI, S. A. Study of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) using Dyar's rule. **Munis Entomology & Zoology**, Ankara, v. 5, p. 216-224, 2010.

NASERI, B.; FATHIPOUR, Y.; MOHARRAMIPOUR, S.; HOSSEININAVEH, V. Comparative life history and fecundity of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on different soybean varieties. **Entomological Science**, Tokyo, v. 12, p. 147-154, 2009.

NIITEPÖLD, K.; PEREZ, A.; BOGGS, C. L. Aging, life span, and energetics under adult dietary restriction in Lepidoptera. **Physiological and Biochemical Zoology**, Chicago, v. 87, p. 684-694, 2014.

NIMBALKAR, R. K.; GIRI, N. R. Influence of agronomic hosts on the susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically modified (Bollgard®) and conventional cotton plants. **Bioscience Discovery**, Jalna, v. 6, p. 138-144, 2015.

OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A. M.; MENDES, S. M.; FRIZZAS, M. R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, Guildford, v. 56, p. 50-54, 2014.

PARRA, J. R. P. The evolution of artificial diets and their interactions in science and technology. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.) **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. Boca Ratón: CRC Press, 2012. p. 51-92.

PETERS, T. M.; BARBOSA, P. Influence of population density on size, fecundity, and developmental rate of insects in culture. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 22, p. 431-450, 1977.

ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, New York, v. 24, p. 63-71, 2006.

ROWAN, A. N. Formulation of ethical standards for use of animals in medical research. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 68, p. 63-71, 1993.

RUMPOLD, B. A.; SCHLÜTER, O. K. Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 17, p. 1-11, 2013.

SAS INSTITUTE. Sas/Stat User Software: Changes and 14 Enhancements through Release. Estados Unidos, Cary. Version 9.3. 2011.

SCHOWALTER, T. D. **Insect ecology**: an ecosystem approach, Elsevier: San Diego, 2011. p. 53-93.

SEHNAL, F. Growth and life cycles. In: KERKUT, G. A.; GIBERT, G. A. (Eds.), **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. v. 2. Oxford: Pergamon Press, 1985. p. 1-86.

SHARMA, H. C. Climate change effects on insects: implications for crop protection and food security. **Journal of Crop Improvement**, Tehran, v. 28, p. 229-259, 2014.

SILLANPÄÄ, S. How do food quality and larval crowding affect performance of the autumnal moth, *Epirrita autumnata*?. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 129, p. 286-294, 2008.

SIMPSON, S. J.; SIBLY, R. M.; LEE, K. P.; BEHMER, S. T.; RAUBENHEIMER, D. Optimal foraging when regulating intake of multiple nutrients. **Animal Behaviour**, London, v. 68, p. 1299-1311, 2004.

SLANSKY JR., F.; RODRIGUEZ, J. G. Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates: an overview. In: SLANSKY JR., F.; RODRIGUEZ, J. G. (Eds.), **Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates**. New York: J. Wiley & Sons, 1987. p. 1-69.

SMITH, J. A. A question of pain in invertebrates. **Institute of Laboratory Animal Resources Journal**, Washington, v. 33, p. 25-31, 1991.

SONG, Z. M.; LI, Z.; LI, D. M.; XIE, B. Y.; XIA, J. Y. Adult feeding increases fecundity in female *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **European Journal of Entomology**, České Budějovice, v. 104, p. 721-724, 2007.

SONLEITNER, F. J. The stress factor in insect colonies. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 31, p. 545-549, 1964.

SØRENSEN, J. G.; ADDISON, M. F.; TERBLANCHE, J. S. Mass-rearing of insects for pest management: challenges, synergies and advances from evolutionary physiology. **Crop Protection**, Guildford, v. 38, p. 87-94, 2012.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S. V.; LOPES-LIMA, A.; YANO, S. A. C.; MICHELI, A.; MORAIS, E. G. F.; GALLO, P.; PEREIRA, P. R. V. S.; SALVADORI, J. R.; BOTTON, M.; ZENKER, M. M.; AZEVEDO-FILHO, W. S. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliiothinae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 60, p. 101-104, 2016.

STAVRIDIS, D. G.; IPSILANDIS, C. G.; KATARACHIAS, P. C.; MILONAS, P. G.; IFOULIS, A. A.; SAVOPOULOU-SOULTANI, M. Determination of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larval instars and age based on head capsule width and larval weight. **Entomologia Hellenica**, Athens, v. 15, p. 53-61, 2003.

TABASHNIK, B. E.; van RENSBURG J. B. J.; CARRIERE, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, p. 2011-2025, 2009.

TAY, W. T.; SORIA, M. F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G. T.; ANDERSON, C.; DOWNES, S. A brave New World for an Old World pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PloS One**, San Francisco, v. 8, e80134, 2013.

van HUIS, A. Potential of insects as food and feed in assuring food security. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 58, p. 563-583, 2012.

WAKIL, W.; GHAZANFAR, M. U.; SAHI, S. T.; KWON, Y. J.; QAYYUM, M. A. Effect of modified meridic diet on the development and growth of tomato fruitworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Entomological Research**, Seoul, v. 41, p. 88-94, 2011.

ZERA, A. J.; HARSHMAN, L. G. The physiology of life history trade-offs in animals. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo alto, v. 32, p. 95-126, 2001.

## **CAPÍTULO 4 - Considerações finais**

Com a maior integração entre os países nas relações comerciais e turísticas, as barreiras sanitárias cada vez mais se tornam insuficientes em evitar a entrada de organismos biológicos em locais diferentes de sua ocorrência natural. No caso de insetos, com o estabelecimento e multiplicação podem atingir o “status” de praga e ocasionar impactos negativos ao ecossistema e aos cultivos agrícolas.

A espécie *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) constitui uma importante praga em muitas espécies de plantas, possui alta capacidade de desenvolvimento e reprodução, apresenta estratégias efetivas de dispersão em longas distâncias e capacidade para adaptar a diferentes condições ambientais. O estabelecimento da praga no Continente Americano ocasionou perdas consideráveis na produção agrícola tornando-se um problema grave devido à intensificação de aplicações de produtos químicos para seu controle. Desse modo, estudos relacionados à biologia de *H. armigera* são fundamentais para fornecer subsídios na construção de um programa de manejo para o inseto.

A manutenção e multiplicação de *H. armigera* em laboratório são de fundamental importância para garantir insetos em quantidade e qualidade suficientes para realização de pesquisas. Essa demanda gerou a necessidade estudos para elaboração de um protocolo metodológico adequado de criação específico para o inseto-alvo, onde fossem devidamente atendidas as necessidades nutricionais e estruturais para seu desenvolvimento biológico.

Esse trabalho iniciou com a escolha de uma dieta artificial que fosse capaz de atender as exigências nutricionais do inseto. Para isso foram selecionadas dietas artificiais utilizadas para outros lepidópteros, incluindo a dieta desenvolvida por Kasten Jr, Precetti e Parra (1978) para a criação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), escolhida por ser de baixo custo, atender com eficiência a produção do inseto e pela similaridade na família Noctuidae; dieta para a broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), desenvolvida por King e Hartley (1985) e selecionada por não apresentar na formulação o feijão como fonte proteica e apresentar elevada quantidade de

carboidrato; dieta para a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae), desenvolvida por Greene, Leppa e Dickerson (1976) e foi utilizada por ser a dieta base da maioria das dietas modificadas para os insetos; e uma dieta originária de modificação da dieta para a lagarta-da-soja.

Como critério de avaliação das dietas artificiais utilizou-se parâmetros de desenvolvimento, índices nutricionais e índices populacionais. Os ensaios resultaram em dados interessantes sobre o desenvolvimento, exigências nutricionais e o potencial reprodutivo da praga. Como conclusões desses experimentos, verificou-se que *H. armigera* foi capaz de completar o ciclo de vida nas quatro dietas avaliadas, entretanto com alterações no seu desenvolvimento dependendo do alimento oferecido na fase larval. As possíveis causas do alto ou baixo desempenho do inseto estão relacionadas com as características físicas das dietas e a variação quantitativa e qualitativa dos nutrientes. A dieta artificial desenvolvida para *A. gemmatalis* afetou positivamente os parâmetros biológicos de *H. armigera*. Além disso, a modificação realizada na dieta nesse estudo promoveu excelente desenvolvimento de *H. armigera*, com elevados valores nos índices populacionais e nutricionais, e sem decréscimo no vigor e potencial reprodutivo, sendo a mais indicada para criação massal do inseto para fins de estudo em manejo integrado de pragas.

A partir da escolha da dieta, o segundo estudo avaliou o desenvolvimento de *H. armigera* em diferentes condições estruturais. Nesse experimento para determinar as melhores condições de desenvolvimento larval do inseto foi analisado diferentes densidades e recipientes, formas de disponibilidade e quantidade de alimento. Para os insetos adultos três tamanhos de gaiolas e densidades de casais foram analisados. Em longo prazo, a metodologia proposta foi acompanhada em gerações subsequentes à definição do sistema de criação (12 gerações), registrando-se vários parâmetros de desenvolvimento como critérios de avaliação. Em todos os testes realizados, procurou-se determinar as melhores condições estruturais que favorecesse o bem-estar do animal. Os resultados indicaram alterações nos parâmetros biológicos de *H. armigera* em função das condições oferecidas para o desenvolvimento de *H. armigera* nas fases larval e adulta. A sobrevivência e a fertilidade foram diretamente relacionadas com a densidade e o tamanho da gaiola de criação. A eficiência demonstrada na metodologia de criação facilita a produção



massal de *H. armigera* em laboratório, com baixa complexidade operacional, fornecendo condições adequadas para o desenvolvimento do inseto, o que sugere bem-estar.

O conjunto de conhecimentos básicos acerca das necessidades nutricionais e condições estruturais de criação de *H. armigera* obtidos neste estudo fornece subsídios para criação massal do inseto em laboratório e proporciona condições para a realização de estudos nas mais diversas áreas. Com a abordagem referente ao bem-estar animal procurou-se esclarecer da importância da compreensão de todos os fatores que estão relacionados com o sucesso em criações massais de insetos em laboratório e servir de subsídios em laudos referente à ética em pesquisas científicas com uso de animais.

## Referências

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 69, p. 487-488, 1976.

KASTEN JR, P.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 53, p. 68-78, 1978.

KING, E. G.; HARTLEY, G. G. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH, P.; MOORE, R. F. (Eds.). **Handbook of insect rearing**. New York: Elsevier, 1985. p. 265-270.