

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS

PAULO ROBERTO RODRIGUES

POTENCIAL DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COMERCIAIS
PARA O CONTROLE DE *Alphitobius diaperinus* (PANZER)
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DOIS VIZINHOS – PR
2019

PAULO ROBERTO RODRIGUES

**POTENCIAL DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COMERCIAIS
PARA O CONTROLE DE *Alphitobius diaperinus* (PANZER)
(COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agroecossistemas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Michele Potrich
Co-orientador: Prof. Dr. Everton Ricardi
Lozano da Silva

**DOIS VIZINHOS – PR
2019**

R696p Rodrigues, Paulo Roberto.
Potencial de fungos entomopatogênicos comerciais para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). / Paulo Roberto Rodrigues – Dois Vizinhos, 2019.
65f.:il.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Michele Potrich.
Coorientador: Prof^o Dr. Everton Ricardi Lozano da Silva.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Dois Vizinhos, 2019.
Bibliografia p.57-65.

1. Pragas - Controle biológico. 2. Entomologia. 3. Aviários.
I. Potrich, Michele, orient. II. Silva, Everton Ricardi Lozano da, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos. VI. Título

CDD: 632.7

Ficha catalográfica elaborada por Keli Rodrigues do Amaral Benin CRB: 9/1559

Biblioteca da UTFPR-Dois Vizinhos



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Dois Vizinhos
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n° 32

POTENCIAL DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COMERCIAIS PARA O CONTROLE DE *Alphitobius diaperinus* (PANZER) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

Paulo Roberto Rodrigues

Dissertação apresentada às oito horas do dia vinte e cinco de fevereiro de dois mil e dezenove, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGROECOSSISTEMAS, Linha de Pesquisa – Manejo e Conservação de Agroecossistemas, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas (Área de Concentração: Agroecossistemas), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho

Banca examinadora:

Dra. Michele Potrich
UTFPR - DV

Dra. Daiara Manfio
UTFPR - DV

Dra. Juliana Cristina dos Santos
IFSC - São Miguel do Oeste

Coordenador(a) do PPGSIS
Assinatura e carimbo

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas.

Dedico este trabalho à minha família.
À ela todo meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelas bênçãos recebidas e pela oportunidade de concretização de mais uma etapa.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, toda minha gratidão por proporcionar muitos dias de aprendizagem e evolução.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas por me proporcionar todas as condições necessárias para a superação de todos os desafios nesta jornada de aprendizado.

A Simbiose Indústria e Comércio de Fertilizantes e Insumos Microbiológicos LTDA pelo auxílio financeiro determinante neste período.

Ao meu pai Paulo Vilmar Rodrigues e a minha mãe Maria Gorete Vebra do Nascimento, pelo companheirismo, compreensão e apoio durante esta caminhada.

Aos meus orientadores Prof^a. Dr^a. Michele Potrich e Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano da Silva o reconhecimento pelo esforço, pelos ensinamentos, conselhos, paciência e sabedoria... A eles os meus mais sinceros agradecimentos. Obrigado pelo espírito e pela oportunidade.

A minha namorada Sabrina Rafaela de Lima pelo companheirismo, pelas palavras de alento e ânimo nos momentos de dificuldades.

Aos meus colegas de Mestrado Diego, Fernanda e Rodrigo, obrigado pela amizade, empatia e contribuições valorosas.

A todos os colegas do Laboratório de Controle Biológico pelas contribuições na instalação dos bioensaios, que me proporcionaram chegar até este momento.

E a todos que de forma direta ou indireta, contribuíram para a finalização desta etapa.

“Não despreze a tradição que vem de anos longínquos; talvez as velhas avós guardem na memória relatos sobre coisas que alguma vez foram úteis para o conhecimento dos sábios”

Tolkien, J. R. R

RESUMO

RODRIGUES, Paulo R. **POTENCIAL DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COMERCIAIS PARA O CONTROLE DE *Alphitobius diaperinus* (PANZER) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)**. 2019. 65 folhas.

Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2019.

Alphitobius diaperinus (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) conhecido como cascudinho-de-aviário é o principal inseto-praga da avicultura de corte. Causa prejuízos nutricionais, sanitários, desconforto às aves e danos estruturais as unidades de produção. Assim, objetivou-se avaliar o potencial dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (IBCB 66 e Bb2), *Metarhizium anisopliae* (IBCB 425 e Ma2) e *Isaria fumosorosea* (If1) em metodologias distintas de aplicação sobre larvas e adultos de *A. diaperinus*, em condições de laboratório e semicampo. Em laboratório, os tratamentos consistiram na aplicação de 1 mL das suspensões dos isolados de fungos entomopatogênicos (1×10^9 conídios.mL⁻¹). Como testemunhas utilizou-se água destilada esterilizada, água destilada esterilizada com Tween® (0,01%) e inseticida químico (cipermetrina+clorpirifós+but.piperonila). Bioensaio 1) Avaliou-se a patogenicidade dos isolados sobre larvas e adultos de *A. diaperinus* e; Bioensaio 2) os isolados mais promissores foram incorporados à ração das aves. Os insetos foram transferidos para as unidades experimentais (UEs), sendo placas de Petri (Ø15 cm) para adultos, e placas de acrílico com 12 poços (Ø1 cm por poço) para larvas, estas foram alocadas em estufa incubadora (27 ± 2 °C, U.R. 70 ± 10% e fotoperíodo de 14h). Cada tratamento foi composto por oito repetições, com 12 larvas e 12 adultos por repetição. Em semicampo, foram adotados os tratamentos que foram promissores no Bioensaio 1 de laboratório. Como testemunhas utilizou-se as mesmas adotadas nos bioensaios de laboratório. Bioensaio 1) testou-se a aplicação de 1,2 mL dos tratamentos à superfície das UEs de contato dos insetos e; Bioensaio 2) a incorporação de 10 mL dos tratamentos em meio a cama aviária. As UEs consistiram de caixas organizadoras, translúcidas, com 19L de volume, supridas com 0,003 m³ de cama aviária. Estas foram alocadas em sala climatizada sob condições 27 ± 2 °C, U.R. 70 ± 10% e fotoperíodo de 14h. Cada tratamento foi composto por cinco repetições, com 20 larvas e 20 adultos por repetição. As avaliações foram realizadas após 10 dias, para laboratório, e com sete e 10 dias, para semicampo. Sendo a variável-resposta a mortalidade. Em laboratório, no Bioensaio 1, os isolados BC2, IBCB 425 e IF1 foram patogênicos a larvas de *A. diaperinus*, provocando 40; 52,8 e 33,5% de mortalidade, respectivamente. Para adultos, apenas o isolado IBCB 425 foi patogênico, causando 38,3% de mortalidade. Tanto para Bioensaio 2 de laboratório, quanto para os bioensaios 1 e 2 de semicampo, estes foram considerados não significativos. Embora três isolados de fungos entomopatogênicos (Bb2, IBCB 425 e If1) tenham apresentado patogenicidade sobre larvas e adultos de *A. diaperinus*, sua virulência foi considerada baixa. Assim, sugere-se novos estudos com diferentes isolados das espécies utilizadas, bem como, de outras espécies de fungos afim de encontrar um isolado eficiente para o controle biológico de *A. diaperinus*.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*. *Metarhizium anisopliae*. *Isaria fumosorosea*. Metodologia de aplicação. Controle biológico. Cascudinho-de-aviário.

ABSTRACT

RODRIGUES, Paulo R. **POTENTIAL OF COMMERCIAL ENTOMOPATHOGENIC FUNGI FOR THE CONTROL OF *Alphitobius diaperinus* (PANZER) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)**. 2019. 65 pages.

Dissertation (Msc in Agroecosystems) - Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2019.

Alphitobius diaperinus (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) known as lesser mealworm is the main insect-plague of poultry houses. It causes nutritional losses, sanitary conditions, discomfort to birds and structural damage to production units. The objective of this study was to evaluate the potential of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (IBCB 66 and Bb2), *Metarhizium anisopliae* (IBCB 425 and Ma2) and *Isaria fumosorosea* (If1) in different application methodologies on larvae and adults of *A. diaperinus* under conditions laboratory and semi-field. In the laboratory, the treatments consisted in the application of 1 mL of the suspensions of the isolates of entomopathogenic fungi (1×10^9 conidia.mL⁻¹). Sterilized distilled water, distilled water sterilized with Tween® (0.01%) and chemical insecticide (cypermethrin+chlorpyrifos+piperonilabutoxide) were used as controls. Bioassay 1) The pathogenicity of the isolates was evaluated on larvae and adults of *A. diaperinus* and; Bioassay 2) the most promising isolates were incorporated into the poultry feed. The insects were transferred to the experimental units (UEs), being Petri dishes (Ø15 cm) for adults, and acrylic plates with 12 wells (Ø1 cm per well) for larvae, these were allocated in an incubator incubator (27 ± 2 ° C, RH $70 \pm 10\%$ and photoperiod of 14h). Each treatment consisted of eight replicates, with 12 larvae and 12 adults per replicate. In semi-field, the treatments that were promising were adopted in Bioassay 1 of the laboratory. As controls, the same ones used in laboratory bioassays were used. Bioassay 1) the application of 1.2 ml of the treatments on the surface of the contact UEs of the insects was tested; Bioassay 2) the incorporation of 10 mL of the treatments in medium to the litter. The UEs consisted of organizer boxes, translucent, with 19L of volume, supplied with 0.003 m³ of litter. These were allocated in an air conditioned room under conditions 27 ± 2 ° C, U.R. $70 \pm 10\%$ and photoperiod of 14h. Each treatment consisted of five replicates, with 20 larvae and 20 adults per replicate. The evaluations were performed after 10 days, for laboratory, and with seven and 10 days, for semi-field. The variable-response is mortality. In laboratory, in Bioassay 1, isolates BC2, IBCB 425 and IF1 were pathogenic to larvae of *A. diaperinus*, causing 40; 52.8 and 33.5% mortality, respectively. For adults, only IBCB 425 isolate was pathogenic, causing a 38.3% mortality. For both Laboratory Bioassay 2 and semi-field bioassays 1 and 2, these were considered to be non-significant. Although three isolates of entomopathogenic fungi (Bb2, IBCB 425 and If1) showed pathogenicity on larvae and adults of *A. diaperinus*, their virulence was considered low. Thus, it is suggested new studies with different isolates of the species used, as well as other fungi species in order to find an efficient isolate for the biological control of *A. diaperinus*.

Keywords: *Beauveria bassiana*. *Metarhizium anisopliae*. *Isaria fumosorosea*. Methodology of application. Biological control. Lesser mealworm.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Aviário comercial, localizado na cidade de Abelardo Luz -SC, de onde foram obtidas as populações de *A. diaperinus* utilizadas nos bioensaios. A) Vista externa do aviário comercial de corte; B) Vista interna de aviário comercial em período inicial de alojamento.....34
- Figura 2** - Preparação dos tratamentos em câmara de fluxo horizontal. A – Pesagem e diluição de conídios dos fungos entomopatogênicos em água. B – Erlenmeyer contendo as soluções com os tratamentos prontos para uso.....37
- Figura 3** - Unidades experimentais utilizadas nos bioensaios “In vitro”. A- Placa de acrílico com 12 poços, com papel filtro umidificado, 0,5g de ração e uma larva por poço. B- Placa de Petri, com papel filtro umidificado, 6g de ração por placa e total de 12 indivíduos adultos.....37
- Figura 4** - Unidades experimentais acondicionadas em estufa incubadora, com controle de temperatura e fotoperíodo. A – Placas de poços com larvas acondicionadas durante 240h. B – Placas de Petri com adultos acondicionadas durante 240h.38
- Figura 5** - Avaliação diária de mortalidade de larvas e adultos de *A. diaperinus*, durante 10 dias, sendo os indivíduos mortos submetidos à câmara úmida.38
- Figura 6** - Presença de micélio característico nos cadáveres de *A. diaperinus* confirmando a morte pelo fungo. A- Micélio de *B. bassiana* sobre larva de *A. diaperinus* em câmara úmida. B- Micélio de *M. anisopliae* em larva de *A. diaperinus* em câmara úmida.....39
- Figura 7** - Aplicação dos tratamentos em na ração de aves. A – Aplicação de 10 mL de cada tratamento em 20g de ração de ave. B – Ração incorporada com os tratamentos e acondicionada em câmara de fluxo laminar para a evaporação da água e posterior acondicionamento nas unidades experimentais para testes de controle de *A. diaperinus*.40
- Figura 8** - Unidades experimentais adotadas em semicampo abastecidas com 0,003 m³ de cama aviária de sete lotes.42

Figura 9 - Seleção de <i>A. diaperinus</i> para realização de bioensaio de semicampo, acondicionamento em placas de acrílico (Ø 5 cm). A) Larvas de 4º a 7º ínstar e B) Adultos.	42
Figura 10 - A) Pulverização da solução contendo os tratamentos para controle de <i>A. diaperinus</i> , com auxílio de Aerógrafo e bomba de pressão, e B) UEs submetidas a câmara de fluxo laminar horizontal para evaporação da água.	43
Figura 11 - Montagem das unidades experimentais em câmara de fluxo. a - UE suprida com 0,003 m3 cama aviária; b – 20g de ração comercial de frangos; c – 20 larvas e 20 adultos de <i>A. diaperinus</i>	43
Figura 12 - Bioensaio de semicampo. A – Unidades experimentais acondicionadas em sala climatizada. B – Avaliação de mortalidade de larvas e adultos de <i>A. diaperinus</i>	44
Figura 13 - A) Preparação do bioensaio com aplicação dos tratamentos em meio a cama aviária para controle de <i>A. diaperinus</i> e B) Acondicionamento do bioensaio em câmara de fluxo laminar para evaporação da água.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das espécies dos fungos entomopatogênicos utilizados nos bioensaios, respectivos isolados e de suas respectivas concentrações obtidas dos produtos utilizados nos bioensaios.....	34
Tabela 2 - Tratamentos com fungos entomopatogênicos e um inseticida químico e suas respectivas concentrações utilizados nos bioensaios para o controle de larvas e adultos de <i>A. diaperinus</i>	36
Tabela 3 - Tratamentos com fungos entomopatogênicos e suas respectivas concentrações utilizados nos bioensaios para o controle de larvas e adultos de <i>A. diaperinus</i>	40
Tabela 4 - Porcentagem de mortalidade média (\pm EP) de larvas e adultos de <i>A. diaperinus</i> , após imersão 1 mL dos tratamentos compostos por isolados de fungos entomopatogênicos (1×10^9 conídios.mL ⁻¹) e inseticida químico sintético, acondicionados em estufa incubadora em temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas por 240 horas.....	46
Tabela 5 - Porcentagem de mortalidade média (\pm EP) de larvas e adultos de <i>A. diaperinus</i> , depois de 240 horas de incorporação dos tratamentos compostos por isolados de fungos entomopatogênicos (1×10^9 conídios.mL ⁻¹) à ração, em temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.....	47
Tabela 6 - Porcentagem de mortalidade média (\pm EP) de larvas e adultos de <i>A. diaperinus</i> , em avaliações de sete e 10 dias após a pulverização dos tratamentos compostos por isolados de fungos entomopatogênicos (1×10^9 conídios.mL ⁻¹) sobre a superfície das UEs, em temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.	48
Tabela 7 - Porcentagem de mortalidade média (\pm EP) de larvas e adultos de <i>A. diaperinus</i> , em avaliações de sete e 10 dias após a incorporação dos tratamentos compostos por isolados de fungos entomopatogênicos (1×10^9 conídios.mL ⁻¹) na cama aviária, em temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 AVICULTURA EM AGROECOSSISTEMAS	18
2.2 <i>Alphitobius diaperinus</i> (PANZER) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)	19
2.2.1 Ciclo de vida.....	20
2.2.2 Prejuízos	21
2.3 MÉTODOS DE CONTROLE DE <i>Alphitobius diaperinus</i>	22
2.3.1 Controle químico	23
2.3.2 Controle cultural e físico	23
2.3.3 Controle Biológico	24
2.3.3.1 Fungos entomopatogênicos.....	25
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuillemin	27
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch.) Sorokin.....	29
<i>Isaria fumosorosea</i>	30
2.4 MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE <i>Alphitobius diaperinus</i>	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 OBTENÇÃO DOS INSETOS, FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E CAMA AVIÁRIA.....	33
3.2 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE <i>Alphitobius diaperinus</i> EM CONDIÇÕES “ <i>IN VITRO</i> ”	35
3.2.1 Bioensaio 1: avaliação da patogenicidade de fungos entomopatogênicos sobre <i>A. diaperinus</i> – contato direto.....	36
3.2.2 Bioensaio 2: efeito de fungos entomopatogênicos, incorporado à ração, sobre <i>A. diaperinus</i>	39

3.3 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE <i>Alphitobius diaperinus</i> EM CONDIÇÕES DE SEMICAMPO	41
3.3.1 Bioensaio em semicampo 1: efeito de fungos entomopatogênicos pulverizados a superfície interna das unidades experimentais	42
3.3.2 Bioensaio em semicampo 2: efeito de fungos entomopatogênicos aplicados em meio a cama aviária	44
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4 RESULTADOS.....	46
4.1 Bioensaio 1: avaliação da patogenicidade de fungos entomopatogênicos sobre <i>A. diaperinus</i> – contato direto	46
4.2 Bioensaio 2: efeito de fungos entomopatogênicos, incorporado à ração, sobre <i>A. diaperinus</i>	47
4.3 Bioensaio em semicampo 1: efeito de fungos entomopatogênicos, pulverizados em superfície de contato, sobre <i>A. diaperinus</i>	48
4.4 Bioensaio em semicampo 2: efeito de fungos entomopatogênicos sobre <i>A. diaperinus</i> aplicados em meio a cama aviária	49
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES	56
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1 INTRODUÇÃO

A avicultura é uma atividade pecuária que consiste na criação de aves para a produção de alimentos, sendo o frango, a espécie mais explorada no Brasil e no Mundo. Contudo, codornas, marrecos, perus, avestruzes, entre outras espécies, também possuem importância econômica (ABPA, 2018; GODOY, 2017). A produção de carnes e ovos é o principal foco dentro desta atividade, sendo conhecida como avicultura de corte e postura, respectivamente.

Nas últimas décadas houve um direcionamento de esforços para o melhoramento de aspectos genéticos, nutricionais, ambientação e logística da referida cadeia de produção, o que propiciou ao Brasil país figurar entre os países mais competitivos na produção e comercialização de frangos (ABPA, 2018; GODOY, 2015; VENTURA, 2017). Contudo, alguns entraves técnicos ainda trazem impactos que podem causar perdas ao sistema de produção, podendo ser destacadas as falhas no controle de pragas. Insetos-praga podem ser responsáveis por perdas quantitativas e qualitativas, bem como, atuar como vetores de patógenos importantes, prejudiciais à saúde humana e animal, sendo *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), o principal inseto-praga da avicultura (CATELLI; PINHEIRO, 2014; JAPP; BICHO; SILVA, 2010).

Alphitobius diaperinus, também conhecido como “cascudinho-de-aviário”, é o principal inseto-praga dentro de aviários comerciais de corte e postura (CATELLI; PINHEIRO, 2014; JAPP; BICHO; SILVA, 2010; WOLF et al., 2014). É um inseto de origem africana (VAUGHAN; TURNER; RUSZLER, 1984), porém tornou-se cosmopolita sendo considerada uma praga importante para a avicultura mundial, devido as suas características biológicas e comportamentais (MENDES; POVALUK, 2017). É facilmente encontrado em altas densidades dentro dos aviários se alimentando de restos de ração, fezes e aves mortas que estão sobre a cama aviária (REZENDE et al., 2009). A presença de *A. diaperinus* no interior das instalações com alta adaptabilidade e prolificidade faz deste coleóptero um importante vetor de patógenos, tais como: bactérias, protozoários e vírus (CATELLI; PINHEIRO, 2014;

CHERNAKI-LEFFER et al., 2002; MENDES; POVALUK, 2017; SEGABINAZI et al., 2005).

O controle das condições ambientais dos aviários de produção para melhor conforto térmico das aves, juntamente com a cama aviária, forneceu um ambiente ideal para o desenvolvimento e reprodução do *A. diaperinus*, tornando as práticas de controle mais onerosas e com eficiência reduzida (ARENDS, 1987; CHERNAKI-LEFFER, 2004; SILVA; MICHELS; TOMA, 2007). A baixa eficiência dos métodos tradicionais de controle de pragas em aviários criou a necessidade de métodos alternativos mais adequados a este fim. O controle biológico como ferramenta para o controle de pragas é uma alternativa que vem ganhando espaço nas últimas décadas (ALVES; LOPES, 2008). Além disso, a busca por meios de produção que diminuam os impactos sobre o meio ambiente é uma demanda e logo poderá se tornar uma barreira para mercados mais exigentes (ALVES; LOPES, 2008).

Os fungos entomopatogênicos se destacam, no controle biológico, por apresentarem alta seletividade a organismos não-alvos e maior especificidade ao inseto-praga quando comparados aos inseticidas químicos sintéticos, baixa toxicidade ao ambiente e ao homem, ampla variabilidade genética, o que possibilita a identificação de isolados mais adequados para cada ordem ou família dos insetos-praga, e baixa pressão de seleção, que reduzem a possibilidade do surgimento de insetos resistentes (ALVES, 1998; ALVES; LOPES, 2008; BARROS et al., 2010). Vários estudos em laboratório e a campo tem sido conduzidos para avaliar a atividade inseticida de fungos entomopatogênicos sobre *A. diaperinus*, sendo a maioria dos estudos com as espécies *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. 1912 e *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokīn 1883 (ALVES et al., 2015; ROHDE et al., 2006; SILVA et al., 2006; SILVA; HOFF; DOYLE, 2005).

Apesar dos diversos estudos com o uso de espécies de fungos entomopatogênicos para o controle de *A. diaperinus* comprovarem sua eficácia de controle em condições de laboratório, poucos têm sido testados em condições a campo. O uso prático, em condições de campo, ainda não foi totalmente estabelecido, devido a um grande número de questionamentos que estão sem respostas, podendo-se citar a concentração de conídios, os isolados mais virulentos, a metodologia adequada e os equipamentos pertinentes para aplicação dos fungos. Além disso, poucos estudos têm sido realizados com fungos entomopatogênicos comerciais.

Estes, apresentam como vantagem o fato de já estarem registrados no mercado e terem tecnologia de produção já estabelecida, facilitando ao criador de aves ou ao técnico o acesso ao produto biológico.

Baseado neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de fungos entomopatogênicos comerciais no controle de *A. diaperinus* em diferentes metodologias de aplicação em condições de laboratório e semicampo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AVICULTURA EM AGROECOSSISTEMAS

A avicultura é uma das mais importantes cadeias de produção do país. É um dos pilares do agronegócio nacional gerando emprego e renda, contribuindo com uma parcela considerável do produto interno bruto (PIB) e para com o desenvolvimento do Brasil. Em escala global, a avicultura brasileira é a segunda maior em volume de produção e o maior exportador de carne de frango do mundo (ABPA, 2018; GODOY, 2015)

O fluxo de pessoas do meio rural para o urbano criou demanda de alimento fonte de proteínas de baixo custo e que possuísse aceitação da sociedade, então a modernização do setor foi uma exigência e uma oportunidade. A partir dos anos 60 o Brasil passou por um processo de modernização do setor, que até então, era considerado pouco eficiente, entrando em cena a integralização da cadeia de produção. Esta propiciou aos produtores, o acesso à tecnologia e assistência técnica necessária e o mercado de comercialização dos produtos (ABPA, 2018; VITAL; DROUVOT; SAMPAIO, 2009).

De acordo com o relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2018) a produção total de carne de frango é de 13,06 milhões de toneladas, o que confere ao país o segundo lugar no ranking mundial. Embora o Brasil seja o maior exportador de carne de frango do mundo, com 4,3 milhões de toneladas, isto representa apenas 33,1% do total produzido, sendo o restante comercializado com o mercado interno. Ou seja, 66,9% é consumido dentro do próprio país, mostrando a aceitação do brasileiro pela carne de frango, atingindo 42 kg hab. ano⁻¹.

O avanço e consolidação da atividade avícola brasileira nas últimas décadas impulsionou o avanço tecnológico, social e econômico de milhares de famílias (ABPA, 2018; GODOY, 2011; VENTURA, 2017). No entanto, há uma grande preocupação com os impactos gerados na cadeia de produção de frangos, já que é notório o seu impacto sobre a água, o solo, o ar, as aves e o homem, exigindo desta atividade

modelos e práticas alternativas para a minimização de danos ambientais (PALHARES, 2009). O uso de insumos químicos que de alguma forma ofereça riscos à saúde dos consumidores e mesmo dos colaboradores envolvidos no processo produtivo é uma preocupação crescente e novos métodos de controle vêm sendo desenvolvido e/ou pesquisados pelas integradoras em conjunto com a indústria, com os centros de pesquisas e com as universidades (VIEIRA, 2017).

A avicultura é uma atividade pecuária relacionada ao meio rural e aos agroecossistemas, pelo fato de suas unidades de produção de frango estarem inseridas em propriedades rurais, sendo esta, fonte principal ou parcial de renda. Alguns resíduos da produção de aves, tais como a cama aviária e as excretas são reaproveitados pelos agricultores como adubo. Logo, a utilização de produtos tóxicos e persistentes no processo produtivo, estarão contaminando os agroecossistemas envolvidos.

O ambiente interno das unidades de produção fornecem condições de umidade, temperatura, disponibilidade de alimento e ambiente relativamente seguro que propiciam com que a espécie goze de condições ideais para sua sobrevivência, comumente encontrados em altas densidades em meio à cama aviária (JAPP; BICHO; SILVA, 2010). Assim sendo, o uso de medidas sanitárias para o controle de *A. diaperinus* se faz necessária para reduzir os prejuízos ao sistema de produção atribuídos a este coleóptero. As medidas sanitárias comumente empregas são de produtos à base piretroides e organofosforados (HARRINGTON et al., 2011; JAPP; BICHO; SILVA, 2010; MUL et al., 2009), sendo o inseticida mais utilizado para o controle de *A. diaperinus*, em aviários de frango de corte, um composto de cipermetrina, clopirifós e butóxido de piperonila (CATELLI; PINHEIRO, 2014; OURO FINO, 2015).

2.2 *Alphitobius diaperinus* (PANZER) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)

Alphitobius diaperinus é uma espécie de inseto que pertence à ordem Coleoptera e à família Tenebrionidae, sendo conhecido popularmente como cascudinho-de-aviário. É de origem africana, porém tornou-se cosmopolita, sendo um importante inseto-praga de cereais armazenados e de rações, tendo migrado para o

interior dos aviários pela proximidade com fazendas ou através de rações infestadas (ATHIÉ; DE PAULA, 2002; REZENDE et al., 2009; VAUGHAN; TURNER; RUSZLER, 1984).

2.2.1 Ciclo de vida

Alphitobius diaperinus apresenta metamorfose completa (holometábolo), desenvolvendo seu ciclo de vida através das fases de ovo, larva, pupa e adultos. Em condições de laboratório, este besouro completa seu ciclo em até 55 dias, podendo ocorrer variações no período do seu ciclo em função da temperatura (CHERNAKI; ALMEIDA, 2001; SILVA; HOFF; DOYLE, 2005). Em condições de temperaturas inferiores a 20°C, há um decréscimo no consumo de oxigênio e, conseqüentemente, no seu metabolismo (RENAULT; BIJOU; HERVANT, 2012). Em temperaturas superiores a 45°C, larvas e adultos de *A. diaperinus* apresentam altas taxas de mortalidade (GAZONI et al., 2012; WOLF et al., 2014).

Em condições ambientais adequadas e constantes, tais como temperatura de 27 °C e umidade relativa de 80% e alimentação disponível, a fase de ovo dura em torno de cinco dias, com três dias de pré-oviposição. A postura é realizada nas ranhuras da ração, para facilitar o acesso da larva recém-eclodida à alimentação. Esta. As larvas possuem corpo alongado e afilado, eclodem com 1,2 mm de comprimento, podendo chegar a 13,8 mm e largura de 2 mm. Possuem cabeça prognata, com mandíbulas robustas e assimétricas. O período larval dura 38 dias, passando por oito mudas até empupar. A fase de pupa é completada com cinco dias, emergindo um adulto esbranquiçado, que após 20 dias, está pronto para a reprodução. O adulto de *A. diaperinus* apresenta dimorfismo sexual, ou seja, é possível fazer a distinção entre machos e fêmeas visualmente. As fêmeas são maiores e com coloração avermelhada, enquanto que os machos são menores e escuros. Também há a possibilidade de externar os respectivos órgãos reprodutores, de machos e fêmeas, mediante compressão suave do abdômen do inseto com uma pinça (SILVA; HOFF; DOYLE, 2005).

O ciclo do cascudinho está diretamente relacionado a temperatura do ambiente, sendo que a 32°C ocorre a redução do período de desenvolvimento de

ovos, larvas e adultos, sendo a mais adequada para a forma imatura do inseto. Em 22 °C já ocorre um aumento no período de cada fase, bem como redução da sobrevivência dos mesmos. Temperaturas inferiores a 16,5 °C passam a contribuir para o controle e redução da população (CHERNAKI; ALMEIDA, 2001).

2.2.2 Prejuízos

Alphitobius diaperinus é um inseto com alta prolificidade e adaptabilidade, que encontrou no interior das instalações aviárias condições adequadas para a manutenção de altas densidades de sua população. Os danos relacionados a este coleóptero podem gerar perdas significativas ao sistema de produção.

A presença de micro-organismos nocivos à saúde humana e animal, como *Salmonella spp*, *Escherichia coli* e outros, tanto na cama aviária quanto sobre os insetos, são comumente observados em larvas, adultos e na cama aviária na qual *A. diaperinus* infestam (CARVALHO et al., 2017; CATELLI; PINHEIRO, 2014; CHERNAKI-LEFFER et al., 2002; CRIPPEN et al., 2012; CRIPPEN; POOLE, 2009; SEGABINAZI et al., 2005; VITTORI et al., 2007). Em granjas avícolas nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, foram encontradas 14 espécies de 10 gêneros de enterobactérias habitando a superfície externa e interna de *A. diaperinus* (SEGABINAZI et al., 2005). A presença destes, comprova que o inseto é um potencial reservatório de bactérias patogênicas. Em condições de laboratório, larvas de *A. diaperinus* foram infectadas com *Campylobacter jejuni* e *Salmonella enterica* Serovar *Paratyphi B Variant Java* e então, submetidos a alimentação dos frangos. Todas as aves que se alimentaram de insetos infectados apresentaram colonização por *S. enterica* e *C. jejuni*. A transmissão de patógenos entre insetos também é um fator que deve ser levado em consideração como um fator que pode contribuir para a dissiminação, sendo que larvas e adultos de *A. diaperinus* tem capacidade de armazenar e disseminar estes agentes patogênicos (SEGABINAZI et al., 2005). Assim, medidas de controle da densidade populacional do inseto, faz-se necessário para evitar eventuais problemas sanitários (HAZELEGER et al., 2008).

Outro aspecto a ser considerado nos potenciais danos causados por *A. diaperinus*, é a substituição da ração por larvas e adultos do inseto na alimentação,

por parte das aves, que é um comportamento típico destas. Esta situação diminui a ingestão de alimento balanceado e interfere no ganho de peso final. Com isso, os índices zootécnicos, tais como: ganho de peso diário, ganho de peso final e conversão alimentar ficam comprometidos (DESPINS; AXTELL, 1995; JAPP, 2008). Além disso, quando as aves se alimentam dos adultos os élitros podem ferir o sistema gastrointestinal e abrir porta de entrada para infecção de organismos oportunistas (CATELLI; PINHEIRO, 2014; JAPP, 2008; JAPP; BICHO; SILVA, 2010).

A presença de *A. diaperinus* em meio a cama aviária e em contato direto com as aves pode acarretar em prejuízos e estresse às mesmas e, em consequência, afetar a produtividade de forma qualitativa e quantitativa (LAY JR et al., 2011). *Alphitobius diaperinus* ao atacar os frangos que estão deitados sobre a cama aviária, perfuram o tecido epitelial do abdômen, causando dermatites no local, acarretando em danos nas carcaças das aves e, conseqüentemente, afetando o abate e comercialização da carne (ELOWNI; ELBIHARI, 1979).

Além de todos os danos supramencionados, destaca-se o potencial de avaria que os insetos podem causar às instalações (JAPP; BICHO; SILVA, 2010). As larvas escavam galerias nos componentes estruturais das instalações (muretas e material isolante) para empupar, comportamento natural da espécie, causando prejuízos estruturais (CATELLI; PINHEIRO, 2014; DESPINS; TURNER; RUSZLER, 1987). Sendo assim, o controle deste inseto é um dos mais importantes manejos dentro da avicultura.

2.3 MÉTODOS DE CONTROLE DE *Alphitobius diaperinus*

Alphitobius diaperinus é considerado uma praga de difícil controle. A complexidade das condições internas das instalações, bem como a biologia e comportamento da praga e ainda, a presença das aves, que tornam medidas de controle mais restritivas são aspectos que propiciam baixa eficiência nos métodos de controle tradicionalmente utilizados.

2.3.1 Controle químico

O controle químico do cascudinho é realizado com o uso de inseticidas químicos sintéticos do grupo dos piretroides e organofosforados (LAMBKIN; FURLONG, 2011; OLIVEIRA et al., 2016). Os inseticidas tradicionais baseados nos grupos químicos supracitados, apresentam percentuais de controle acima de 90%, em condições de laboratório (OLIVEIRA et al., 2016; RODRÍGUEZ et al., 2013; WOLF et al., 2015).

Contudo, o uso contínuo de inseticidas químicos sem haver rotação de princípios ativos tem gerado uma alta pressão de seleção, e conseqüentemente, gerado uma predisposição ao aparecimento de populações resistentes (CHERNAKILLEFFER et al., 2011; JAPP; BICHO; SILVA, 2010; LAMBKIN; FURLONG, 2011). Ainda, aumenta o risco de contaminação ambiental, humana e animal, que pode gerar entraves comerciais para determinados mercados consumidores (JAPP; BICHO; SILVA, 2010; PACHECO NETO et al., 2018; PALHARES, 2009).

A aplicação do método de controle químico é restrito ao período de vazio sanitário, ou seja, no intervalo entre lotes. No período de acomodação, pela presença da cama aviária que concentra um grande volume de matéria orgânica, esta, pode interferir na eficiência do controle, bem como na saúde das aves (CATELLI; PINHEIRO, 2014; JAPP; BICHO; SILVA, 2010; OLIVEIRA et al., 2016).

2.3.2 Controle cultural e físico

Embora o método de controle químico ainda seja amplamente empregado nas unidades de produção de frangos alguns métodos que levam em consideração aspectos culturais e físicos têm sido utilizados em paralelo ao método de controle principal. O método cultural consiste em algumas práticas simples como a retirada de aves mortas e destinação adequada dos cadáveres são iniciativas que reduzem a fonte de alimento do inseto-praga em meio ao ambiente de produção. Enquanto que, o método físico leva em consideração fatores de natureza física como a temperatura

para o controle da população de *A. diaperinus* nas unidades de produção (CATELLI; PINHEIRO, 2014).

O uso de técnicas e práticas de forma integrada, levando em consideração os aspectos biológicos e comportamentais do inseto-praga, é uma ferramenta importante para a redução da população de *A. diaperinus* dentro das instalações de produção. Métodos de avaliação da densidade populacional de *A. diaperinus* foram desenvolvidos, com o objetivo de mensurar a eficiência de controle dos métodos empregados, bem como a taxa de reinfestação dos aviários (GODINHO; ALVES, 2009).

A construção dos aviários comerciais levando em consideração alguns detalhes que favorecerão o manejo da cama aviária, resíduos e a higienização é um aspecto relevante (JAPP; BICHO; SILVA, 2010; SALLET, 2013). Apesar de algumas práticas pontuais serem trabalhosas, exigindo monitoramento e atenção dos colaboradores, a retirada e o descarte correto de aves morta ou moribundas são aspectos importantes para o controle do *A. diaperinus*, já que este se alimenta e pode usar estas carcaças como meio de proliferação (CATELLI; PINHEIRO, 2014; GODINHO; ALVES, 2009; JAPP, 2008; JAPP; BICHO; SILVA, 2010; MENDES; POVALUK, 2017).

Algumas estratégias podem ser somadas para potencializar o controle de *A. diaperinus*. Em estudo simulando condições de campo, a cal hidratada, ao ser incorporada a cama aviária, promoveu redução na população de larvas e adultos deste inseto. A temperatura também mostrou-se com um fator de controle, quando larvas e adultos foram expostos a temperaturas acima 45 °C, houve o controle de 100% da população de larvas e adultos de *A. diaperinus* (WOLF et al., 2014). A abertura e limpeza dos aviários, bem como enleiramento e enlonamento da cama aviária, prática conhecida como fermentação, que propicia o aumento de temperatura da cama, são medidas importantes para a diminuição da densidade populacional de *A. diaperinus* (MENDES; POVALUK, 2017).

2.3.3 Controle Biológico

O uso de micro-organismos para o controle de pragas já é amplamente difundido e com exemplos de sucesso na agropecuária nacional (PARRA, 2014). No entanto, não existe um programa de controle microbiano para o controle de *A. diaperinus* devido à complexidade das condições internas dos aviários associado as espécies e isolados mais adequados.

O grande foco dos estudos, quando se trata de controle microbiano de *A. diaperinus*, está concentrado em fungos entomopatogênicos, principalmente com as espécies *B. bassiana* e *M. anisopliae* (ALVES et al., 2015; REZENDE et al., 2009; ROHDE et al., 2006; SANTORO et al., 2015a; SILVA et al., 2006; TIAGO; OLIVEIRA; LIMA, 2014). Estudos também foram realizados com nematoides entomopatogênicos para o controle de *A. diaperinus*, os quais demonstraram resultados promissores em condições laboratoriais (ALVES; ROHDE; ALVES, 2005; GUIDE et al., 2018). Sendo necessário a realização de novos estudos quanto a aplicação em aviários.

2.3.3.1 Fungos entomopatogênicos

O uso de fungos entomopatogênicos como alternativa ao método químico para o controle de pragas em culturas agrícolas já é uma prática conhecida e vem ganhando mais importância à medida que os produtos comerciais dos métodos tradicionais perdem sua eficiência (ALVES; LOPES, 2008). Vários estudos vêm sendo desenvolvidos para adequação da metodologia de aplicação, seleção de isolados mais específicos às pragas de interesse, e ainda, o entendimento dos mecanismos de controle que envolvem o ciclo de relação entre patógeno e hospedeiro, que podem servir para a seleção de toxinas com atividade inseticida, para o desenvolvimento de novos produtos.

A grande variabilidade genética destes entomopatógenos é considerada uma das vantagens no uso para o controle de pragas. Com a possibilidade de haver especificidades variáveis dentro de uma espécie de fungo (várias estirpes ou isolados) o que pode aumentar a gama de hospedeiros que este pode controlar. A ocorrência natural dos fungos, tanto enzoótica como epizooticamente, tem sido um fator preponderante na redução da população de pragas em diversos países (ALVES, 1998; ALVES; LOPES, 2008).

O controle biológico se baseia no uso de organismos vivos para a redução na população de organismos considerados pragas, sem interferir na população de inimigos naturais, e assim diminuir o uso de inseticidas químicos (BARROS et al., 2010; PARRA, 2014). No Brasil, com o sucesso do emprego de agentes de controle biológico para controle de pragas agrícolas e florestais, tornou essa prática uma ferramenta importante no manejo integrado de pragas (ALVES; LOPES, 2008; PARRA, 2014). Neste sentido, vários estudos foram conduzidos e demonstram o potencial que o uso de fungos entomopatogênicos, como alternativa ao método químico, para o controle de insetos-praga possui (BARBOSA; ANDRADE; POLANCZYK, 2018; PAULI et al., 2018; ROHDE et al., 2006; SANTORO et al., 2015a).

Os fungos entomopatogênicos se destacam no controle microbiano por apresentarem algumas vantagens, tais como: estar presente e em grande número em diversos ambientes e superfícies, com a possibilidade de causar epizootias naturais. Tem a capacidade de infectar seus hospedeiros e todas as fases de desenvolvimento, sendo esta uma característica desejável e muito peculiar deste grupo. E também a capacidade de penetrar em seu hospedeiro via tegumento, que lhe confere vantagem sobre outros organismos, que precisam penetrar via oral (ALVES, 1998; BARROS et al., 2010; QU; WANG, 2018). Ainda, possuem alta capacidade de disseminação horizontal, sendo levado por vários agentes de disseminação para locais muito distantes (ALVES, 1998; ALVES; LOPES, 2008).

O ciclo de relações patógeno/hospedeiro depende de uma série de fatores que variam desde as condições ambientais – umidade, temperatura, radiação UV, fotoperíodo – quanto das condições nutricionais e da suscetibilidade do hospedeiro, e também da espécie ou linhagem do fungo (BARROS; VARGAS; SCHRANK; BOLDO; SPECHT, 2010; ALVES, 1998;). A adesão e a germinação dos conídios sobre a cutícula do hospedeiro são as primeiras etapas do processo infecção do patógeno, seguida da penetração das hifas e colonização da hemolinfa, desencadeando respostas imunes por parte do hospedeiro (BARROS et al., 2010; QU; WANG, 2018). Os processos de reprodução e disseminação dos fungos no ambiente são fatores que torna os fungos agentes tão eficientes, pois, mantêm-se no meio e possuem alta capacidade de disseminação. Os mecanismos de adesão dos fungos ainda é um dos aspectos pouco conhecidos, porém sugere-se que forças eletrostáticas auxiliem neste

processo, ou ainda, que, uma interação hidrofóbica entre a cutícula do inseto e o fungo ocorra (BARROS et al., 2010).

A penetração do fungo na cutícula do inseto consiste basicamente de dois processos principais, o físico e o químico. O processo físico consiste no rompimento de áreas membranosas e esclerosadas da cutícula, e o químico, é resultante da síntese de proteases, lípases e quitinases que auxiliam no processo de penetração mecânica do fungo (ALVES, 1998; QU; WANG, 2018).

O processo de colonização do inseto consiste no engrossamento e ramificação da hifa na hemocele, porém, é só após a morte do inseto que há a colonização de todos os tecidos do inseto (ALVES, 1998). A morte do inseto ocorre pela produção de micotoxinas, ação histolítica, bloqueio mecânico do aparelho digestivo e outros danos físicos devido ao crescimento do micélio do fungo (BARROS et al., 2010).

Após a morte do inseto as hifas do fungo emergem por ação mecânica pelas áreas mais fracas da cutícula do cadáver, e sob condições de umidade e temperatura adequadas, são cobertas por uma massa pulverulenta, em decorrência da conidiogênese do fungo. A formação dos conídios ocorre de 24 a 48 horas da emergência das hifas em condições de alta umidade e temperatura. Após a formação dos conídios, estes podem ser disseminados por agentes abióticos ou ainda por insetos moribundos. Todas as fases do ciclo de relação entre patógeno-hospedeiro são altamente dependentes de umidade, temperatura e radiação ultravioleta para ocorrer (ALVES, 1998; QU; WANG, 2018).

Beauveria bassiana (Bals.) Vuillemin

Este entomopatógeno ocorre naturalmente em todos os países, podendo ser encontrado sob as mais diversas superfícies no meio (cadáveres de insetos infectados, solo, plantas, etc). Estes possuem a capacidade parasitar mais de 200 espécies de insetos, incluindo outros artrópodes. Podendo ocorrer de maneira enzoótica e/ou epizoótica em coleópteros, lepidópteros, hemípteros, dípteros, himenópteros, dermaptera, montodea, neuroptera, homóptera, isoptera, siphonaptera e ortópteros (ALVES, 1998; BARROS et al., 2010; MONZÓN; GUHARAY; KLINGEN,

2008; PRESTES et al., 2015). Alves et al., (2005) observaram a ocorrência natural de isolado da espécie *B. bassiana* controlando larvas e adultos de *A. diaperinus* em aviários comerciais.

Beauveria bassiana pertence à classe Sordariomycetes, e à família Cordycipitaceae (INDEX FUNGORUM, [s.d.]), sendo uma das espécies mais estudadas e com aplicação no controle de pragas (ALVES, 1998; BARROS et al., 2010; OLIVEIRA; ALVES; SOSA-GÓMEZ, 2014). Apresenta conídios globosos ou subglobosos com até 3 µm de diâmetro, com conidióforos formando densos cachos. A ocorrência e a duração das fases do ciclo das relações patógenos-hospedeiros são dependentes das espécies de insetos envolvidos e das condições ambientais. *Beauveria bassiana* pode se desenvolver em uma faixa de temperatura entre 5 e 35 °C, estando na faixa considerada adequada entre 23 a 28 °C, e umidade relativa em torno de 90% (ALVES, 1998).

Estudos com o objetivo de selecionar isolados de *B. bassiana* para o controle de *A. diaperinus* em laboratório e campo, foram e vêm sendo realizados ao longo dos últimos anos. Dentre os isolados avaliados de *B. bassiana* para o controle de *A. diaperinus* os mais eficientes foram UNIOESTE 04 e UNIOESTE 05. O primeiro atingiu percentuais de mortalidade de 100% e de 86,7%, o segundo, de 100% e de 85%, para larvas e adultos, respectivamente, sendo que as larvas foram mais sensíveis aos tratamentos (ROHDE et al., 2006). Isolados de *B. bassiana* testados sobre larvas e adultos, provocaram mortalidade confirmada de 50 e 26%, para larvas e adultos, respectivamente, mostrando-se promissores como potenciais agentes de controle de *A. diaperinus* (POPOWSKA-NOWAK; TUMIALIS; PEZOWICZ, 2017).

Em estudo conduzido em aviário comercial, houve a aplicação de solução de *B. bassiana* na concentração de $4,2 \times 10^9$ conídios.m² sobre chão batido sem a presença da cama aviária, durante o período de vazio sanitário. As avaliações realizadas demonstraram que *B. bassiana* provocou o controle de 56 e 73% na população do inseto aos 96 e 146 dias após a aplicação, respectivamente. No entanto aos 216 dias, o nível de infestação retornou aos valores próximos aos iniciais. Sugerindo que embora haja resultados satisfatórios há a necessidade de reaplicações do fungo de três e seis meses para manter a eficiência de controle (ALVES et al., 2015).

Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin

A partir da segunda metade do século XIX, vários estudos foram realizados com o objetivo de conhecer melhor o potencial inseticida de *M. anisopliae* sobre os insetos. Estima-se que este patógeno exerça controle natural sobre mais de 300 espécies de insetos, de diferentes ordens, incluindo pragas de importância econômica (ALVES et al., 2004; ALVES, 1998; ALVES; LOPES, 2008).

O fungo *M. anisopliae* é a primeira espécie de fungo entomopatogênico estudada dentro do controle microbiano de pragas (ALVES, 1998). Pertence à classe Sordariomycetes e à família Clavicipitaceae, de ocorrência natural, estando amplamente distribuído nos diversos ecossistemas (ALVES, 1998; INDEX FUNGORUM, [s.d.]). Apresenta patogenicidade a diversas espécies dentre as mais variadas ordens de insetos e a outros artrópodes. Assim como *Beauveria bassiana*, Alves et al., (2004) também observaram a presença de isolado de *M. anisopliae* controlando larvas e adultos de *A. diaperinus* em unidades de produção de frango de corte.

Apresenta conídios cilíndricos, que medem de 3 a 18 μm , que se formam sobre conidióforos cilíndricos, brancos, esverdeados, marrons a marrons-claros (ALVES, 1998). Seu desenvolvimento vegetativo ocorre em uma faixa de temperatura de 15 a 30 °C, sendo considerada ótima entre 25 a 30 °C (ALVES, 1998; BARROS et al., 2010). Ao final da conidiogênese, o cadáver do inseto, morto em decorrência da infecção, apresenta tons de verde que variam de claro a escuro, acinzentados ou ainda esbranquiçados com tons de verde, características estas da doença conhecida como muscardine verde, causada por *M. anisopliae* (ALVES, 1998).

Em bioensaio sobre patogenicidade sobre *A. diaperinus*, 41 Isolados de *M. anisopliae* causaram mortalidade que variaram entre 8,3 e 90%, para larvas, e entre 0 e 90%, para adultos. Os melhores resultados foram obtidos pelo isolado IBCB 320 atingiu percentuais de controle de 90% para larvas e adultos de *A. diaperinus* (ROHDE et al., 2006). O isolado de *M. anisopliae* (UEL 50), na concentração de 1×10^8 conídios.mL⁻¹, provocou percentuais de controle de 50 e 0% para larvas e adultos de *A. diaperinus*, respectivamente, sob temperatura de 26 °C. Este isolado caracterizou uma capacidade de supressão sobre larvas, contudo, não efetivo sobre adultos

(SANTOS et al., 2006). A ampla variabilidade genética de *M. anisopliae* pode possibilitar a identificação de isolados que apresentem patogenicidade e virulência a *A. diaperinus*.

CHERNAKI-LEFFER et al. (2007) realizaram um estudo com isolados de *M. anisopliae* sobre *A. diaperinus* com o objetivo de selecionar os mais virulentos, então determinar a DL₅₀ de cada isolado para larvas e adultos. Contudo observaram a necessidade de uma alta concentração de conídios para causar a mortalidade de 50% da população, sugerindo a baixa suscetibilidade de *A. diaperinus* aos isolados testados. Ainda, observaram que larvas foram de 5 a 6 vezes mais suscetíveis que adultos assim como apontado por outros estudos, em que atingiu-se percentuais de controle de 100% das larvas quando submetidas a isolados de *M. anisopliae* (POPOWSKA-NOWAK; TUMIALIS; PEZOWICZ, 2017).

Isaria fumosorosea

O fungo *Isaria fumosorosea* pertence à classe Sordariomycetes e à família Cordycipitaceae, de ocorrência natural, estando amplamente distribuído nos diversos ecossistemas (ALVES, 1998; INDEX FUNGORUM, [s.d.]). Apresentam conidióforos simples ou em sinema e sustentando fiáides lisos com paredes não-coloridas. Os conídios são alongados e ovoides, menores ou igual a 3 µm, com coloração rosa bronzeado a rosa acinzentado (ALVES, 1998).

Esta espécie fúngica foi encontrada causando epizootias em populações de insetos de diversas ordens, como lepidópteros, coleópteros, hemípteros e ortópteros em regiões de São Paulo, Mato Grosso e Bahia, sendo, frequentemente, confundido com *B. bassiana* (ALVES, 1998; BARROS et al., 2010; SPECHT et al., 2009; ZIMMERMANN, 2008). Possuindo ampla variabilidade genética e, conseqüentemente, graus distintos de patogenicidade e virulência de acordo com a ordem e a espécie de inseto hospedeiro (ZIMMERMANN, 2008).

I. fumosorosea era conhecido como *Paecilomyces fumosoroseus*, porém, estudos sobre as relações taxonômicas do gênero *Paecilomyces* com *Isaria*, possibilitaram mudanças na nomenclatura de algumas espécies. Sendo realizados estudos moleculares e reagrupando algumas espécies em um grupo denominado

Isaria, na qual hoje encontram-se as espécies *Isaria fumosorosea*, *Isaria farinosa*, *Isaria javanicus*, entre outros (LUANGSA-ARD et al., 2005).

Assim como em outras espécies de fungos entomopatogênicos, as condições ambientais influenciam na infecção, desenvolvimento e virulência de *I. fumosorosea*. Sendo dependente de condições de temperatura, na faixa de 11 a 30 °C, com temperatura ótima de 25 °C, umidade relativa, radiação violeta e inseto-hospedeiro (ALVES, 1998; ZIMMERMANN, 2008).

Em teste de patogenicidade e virulência de 30 isolados de fungos, de sete espécies diferentes, sobre *A. diaperinus*, foram selecionados três isolados de *I. fumosorosea* (CNPSO-Pf79, CNPSO-Pf81 e CNPSO-Pf83). No entanto, estes não apresentaram-se patogênicos a *A. diaperinus*, sendo eliminados dos testes subsequentes de avaliação de DL50 (CHERNAKI-LEFFER; SOSA-GÓMEZ; ALMEIDA, 2007). Em outro estudo com isolados de *I. fumosorosea* não apresentaram patogenicidade sobre larvas e adultos de *A. diaperinus*, sendo preteridos às outras espécies de fungos envolvidas no estudo (POPOWSKA-NOWAK; TUMIALIS; PEZOWICZ, 2017).

A patogenicidade de isolados de *I. fumosorosea* também foram avaliadas sobre larvas e adultos de outras espécies de coleópteros (MONTEMAYOR; AVERY; CAVE, 2016; SEVIM et al., 2010). Os resultados obtidos por estes estudos permitem vislumbrar a identificação de um isolado com virulência que permita um controle viável de *A. diaperinus*.

2.4 MÉTODOS DE APLICAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE *Alphitobius diaperinus*

Embora estudos atestem a eficiência de determinados isolados das espécies de fungos entomopatogênicos sobre *A. diaperinus* (REZENDE et al., 2009; ROHDE et al., 2006; SANTORO et al., 2015a; SILVA et al., 2006), questões são levantadas quanto ao direcionamento das informações já atestadas em laboratório e levadas para o controle prático dentro das instalações. Isolado adequado, concentração, volume de aplicação, equipamentos adequados, condições de aplicação são amplamente debatidas.

Com o intuito de elucidar alguns destes pontos, estudos vem sendo conduzidos para adequar as metodologias de controle com o uso de fungos entomopatogênicos. Foram conduzidos trabalhos de seleção de isolados das espécies *B. bassiana* e *M. anisopliae* e concentração adequada destas (REZENDE et al., 2009; ROHDE et al., 2006; SANTORO et al., 2008, 2015a), análise da relação entre tempo de contato e adesão de esporos com a patogenicidade sobre *A. diaperinus* (CASSIANO et al., 2008), associação entre espécies de fungos (SANTOS et al., 2006), relação entre temperatura e patogenicidade dos fungos (SANTOS et al., 2006), avaliação de compatibilidade entre fungos e inseticidas utilizados no controle tradicional (OLIVEIRA et al., 2016) e também métodos de aplicação em aviários comerciais (ALVES et al., 2015).

No entanto, alguns pontos devem ser investigados para melhorar a eficiência de diferentes métodos de aplicação de fungos entomopatogênicos para o controle de *A. diaperinus*. Assim como a presença da cama aviária, e suas respectivas interações entre insetos, fungos e cama. Assim sendo, o presente trabalho foi direcionado para o desenvolvimento de uma metodologia eficiente de aplicação de fungos entomopatogênicos comerciais para condições laboratoriais e semicampo, avaliando por conseguinte o possível potencial destes isolados para o controle de *A. diaperinus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Controle Biológico, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, no Câmpus Dois vizinhos – PR.

3.1 OBTENÇÃO DOS INSETOS, FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E CAMA AVIÁRIA

Larvas e adultos de *Alphitobius diaperinus* foram obtidos de aviários comerciais de produção frangos de corte infestados, provenientes dos municípios de Dois Vizinhos – PR e Abelardo Luz – SC (Figura 1A e 1B). Estes foram coletados em cama aviária de pinus de média idade (sete lotes), em vários pontos de concentração dos insetos, dentro dos aviários, não recebendo triagem quanto a idade, sexo e sanidade, e acondicionados em caixas organizadoras de 50L, translúcidas. Os insetos foram então, transferidos para sala de criação, com temperatura de 28 ± 2 °C e umidade relativa de $70 \pm 10\%$, para aclimação dos mesmos às condições de laboratório, com período mínimo de sete dias, conforme metodologia adaptada de WOLF et al., (2014). Durante a aclimação, tanto as larvas quanto os adultos de *A. diaperinus* receberam cama aviária, livre de inseticidas, e foram alimentados com ração comercial de frangos, com o intuito de manter uma população de *A. diaperinus* que atendesse a demanda de indivíduos para os vários bioensaios.



Figura 1 - Aviário comercial, localizado na cidade de Abelardo Luz -SC, de onde foram obtidas as populações de *A. diaperinus* utilizadas nos bioensaios. A) Vista externa do aviário comercial de corte; B) Vista interna de aviário comercial em período inicial de alojamento.

Os isolados de fungos entomopatogênicos das espécies *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea* (Tabela 1) utilizados foram fornecidos por uma empresa de Comércio de Fertilizantes e Insumos Microbiológicos, parceira da UTFPR, sob Termo de Cooperação 06/2017 (Processo nº: 23064.002826.2017-11).

O inseticida químico sintético (cipermetrina+clorpirifós+citronelal) foi cedido por um produtor da cidade de Dois Vizinhos – PR, sendo o produto utilizado para o controle de *A. diaperinus* em períodos de vazio sanitário.

Tabela 1 - Descrição das espécies dos fungos entomopatogênicos utilizados nos bioensaios, respectivos isolados e de suas respectivas concentrações obtidas dos produtos utilizados nos bioensaios.

Espécie	Isolado	[] dos produtos (conídios viáveis.g ⁻¹)
<i>Beauveria bassiana</i>	IBCB 66	2 x 10 ⁹
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb2*	2 x 10 ⁹
<i>Metarhizium anisopliae</i>	IBCB 425	6 x 10 ⁸
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Ma2*	6 x 10 ⁸
<i>Isaria fumosorosea</i>	If1*	10 ⁹

* Isolado codificado por acordo de confidencialidade com a empresa financiadora.

A cama aviária utilizada nos bioensaios *in vitro* e em semicampo foi obtida junto a um aviário comercial de frangos de corte, no município de Dois Vizinhos – PR.

Ao ser obtida, estava em fase de alojamento de aves, com infestação de *A. diaperinus*. Esta foi acondicionada e mantida em caixas plásticas do aviário até a fase de implantação dos bioensaios. Estas caixas foram mantidas em sala climatizada, com temperatura de 28 ± 2 °C e umidade relativa de $70 \pm 10\%$, com o intuito de mantê-la fresca, preservando as características da cama. Para utilização nos bioensaios de semicampo, a cama foi transferida para sacos plásticos hermeticamente fechados por 15 dias para eliminação de *A. diaperinus* presente no material, seguindo metodologia adaptada WOLF et al., (2015).

3.2 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE *Alphitobius diaperinus* EM CONDIÇÕES “IN VITRO”

Para estabelecimento das concentrações utilizadas nos tratamentos com fungos entomopatogênicos, foi utilizado como parâmetro, o trabalho de Rohde et al. (2006), o qual avaliou a patogenicidade de dezenas de isolados de fungos das espécies *B. bassiana* e *M. anisopliae*. A concentração usada para o tratamento com o uso de inseticida químico sintético (cipermetrina + clorpirifós + citronelal) foi usada com base na recomendação da bula do produto, e um estudo que associava métodos físicos e químicos de controle de *A. diaperinus* (WOLF et al., 2015).

As soluções com os tratamentos de fungos foram preparadas na concentração de 1×10^9 conídios viáveis.mL⁻¹. Em Erlenmeyer foram adicionados 100 mL de água destilada esterilizada com Tween[®] 80 (0.01%), sendo então, os fungos adicionados e agitados, para melhor diluição, e posterior aplicação dos tratamentos. As concentrações de conídios viáveis de cada tratamento estão descrita na Tabela 2. Foram adotadas três testemunhas: Testemunha 1, consistiu em água destilada esterilizada; Testemunha 2, água destilada esterilizada contendo Tween[®] 80 (0,01%) e Testemunha 3, constituída de um inseticida químico (cipermetrina + clorpirifós + citronelal), na proporção de 1:400 (conforme concentração recomendada pelo fabricante), utilizado no controle convencional de *A. diaperinus*.

Os bioensaios de condições “*in vitro*”, consistem em uma metodologia de inoculação de fungos de contato forçado. Ou seja, no Bioensaio 1 e 2, com contato forçado, os insetos obrigatoriamente entraram em contato com os conídios dos

isolados empregados. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado (DIC) com oito repetições.

3.2.1 Bioensaio 1: avaliação da patogenicidade de fungos entomopatogênicos sobre *A. diaperinus* – contato direto

Este bioensaio consistiu na imersão de adultos e larvas de *A. diaperinus* em soluções de isolados de fungos entomopatogênicos (Tabela 2). Para isto, os insetos foram mergulhados, durante dez segundos, em 1 mL de solução contendo os tratamentos (Figura 2A e 2B), posteriormente foram alocados em uma placa contendo papel absorvente para a retirada do excesso de solução dos mesmos. Sendo então, transferidos para suas respectivas unidades experimentais (UE) de acordo com cada fase, placas de Petri para adultos e placas de poços para larvas.

Tabela 2 - Tratamentos com fungos entomopatogênicos e um inseticida químico e suas respectivas concentrações utilizados nos bioensaios para o controle de larvas e adultos de *A. diaperinus*.

Tratamentos	Descrição	[] conídios viáveis.mL ⁻¹
T1	Água	-
T2	Água +Tween 80® (0,01%)	-
T3	<i>B. bassiana</i> (IBCB 66)	1 x 10 ⁹
T4	<i>B. bassiana</i> (Bc2)	1 x 10 ⁹
T5	<i>M. anisopliae</i> (IBCB 425)	1 x 10 ⁹
T6	<i>M. anisopliae</i> (Ma2)	1 x 10 ⁹
T7	<i>I. fumosorosea</i> (If1)	1 x 10 ⁹
T8	Cipermetrina+Clorpirifós+butóxido de piperonila	1:400*

* 1L de produto comercial diluídos em 400L de água

Todo processo de preparação das soluções e aplicação dos tratamentos foi conduzido em câmara de fluxo laminar horizontal previamente higienizada. As unidades experimentais foram definidas conforme a fase do inseto a ser avaliada. As formas imaturas (larvas), foram acondicionadas em placas de acrílico com 12 poços (Ø 1cm), de maneira que cada larva ficasse isolada, devido ao seu comportamento canibal, sendo estas supridas com 0,5 g de ração comercial para aves por poço

(Figura 3A). Já para as formas maduras (adultos), foram preparadas placas de Petri (Ø 15 cm) supridas com 6g de ração comercial para aves, contendo 12 indivíduos por placa (Figura 3B).

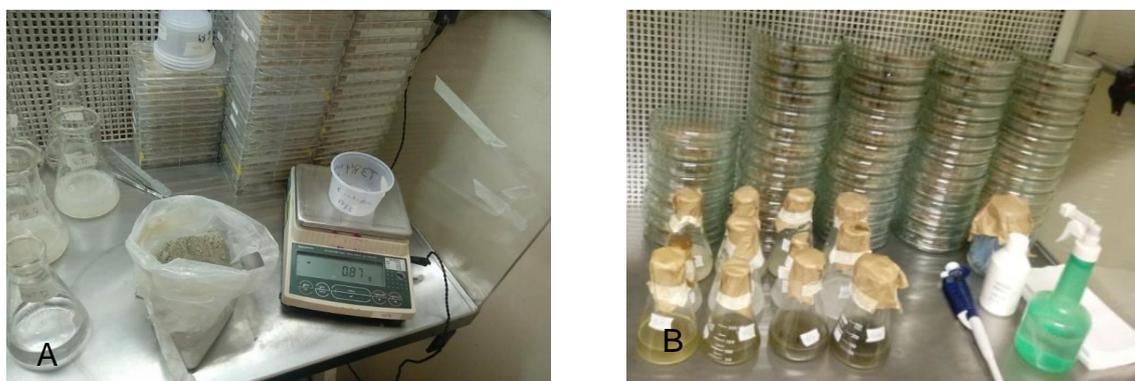


Figura 2 - Preparação dos tratamentos em câmara de fluxo horizontal. A – Pesagem e diluição de conídios dos fungos entomopatogênicos em água. B – Erlenmeyer contendo as soluções com os tratamentos prontos para uso.

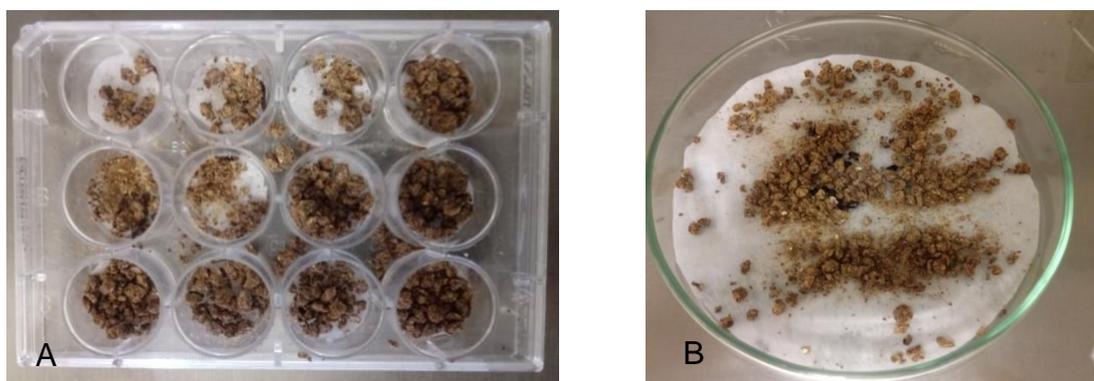


Figura 3 - Unidades experimentais utilizadas nos bioensaios “In vitro”. A- Placa de acrílico com 12 poços, com papel filtro umidificado, 0,5g de ração e uma larva por poço. B- Placa de Petri, com papel filtro umidificado, 6g de ração por placa e total de 12 indivíduos adultos.

Após a montagem do bioensaio, as unidades experimentais foram acondicionadas em estufa incubadora por 240 horas (10 dias), $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas (Figura 4). Durante o período de acondicionamento, foram realizadas dez (10) avaliações, a cada 24 horas (Figura 5), com o intuito de determinar a taxa de mortalidade dos insetos.

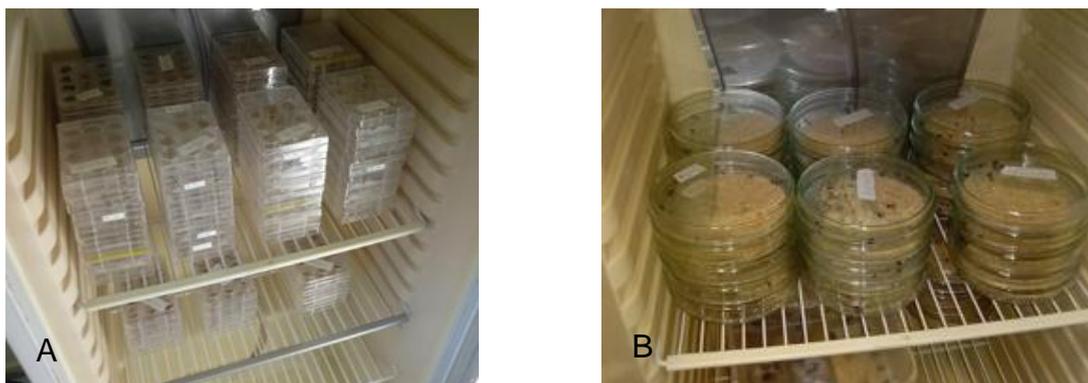


Figura 4 - Unidades experimentais acondicionadas em estufa incubadora, com controle de temperatura e fotoperíodo. A – Placas de poços com larvas acondicionadas durante 240h. B – Placas de Petri com adultos acondicionadas durante 240h.



Figura 5 - Avaliação diária de mortalidade de larvas e adultos de *A. diaperinus*, durante 10 dias, sendo os indivíduos mortos submetidos à câmara úmida.

Para a avaliação da mortalidade confirmada foi montada câmara úmida em placas de acrílico (\varnothing 5cm), devidamente esterilizadas, munidas com papel filtro umedecido. Nestas, foram acondicionados os cadáveres dos insetos os quais foram previamente, desinfetados em solução de álcool 70% e água destilada/esterilizada. As UEs foram identificadas com seu respectivo tratamento e repetição, sendo então, acondicionadas em câmara climatizada, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas (Figura 6A e 6B). As avaliações começaram a partir do terceiro dia de câmara úmida, considerando como mortalidade confirmada cadáveres que apresentaram micélio que caracterizavam a espécie de fungo de cada tratamento.

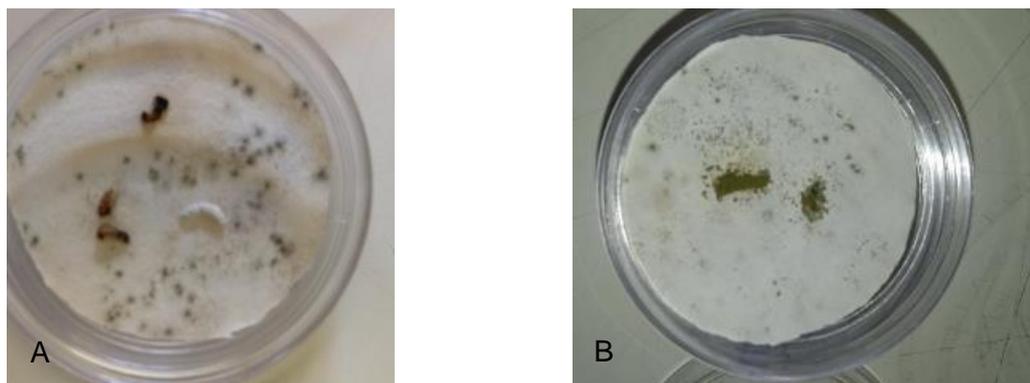


Figura 6 - Presença de micélio característico nos cadáveres de *A. diaperinus* confirmando a morte pelo fungo. A- Micélio de *B. bassiana* sobre larva de *A. diaperinus* em câmara úmida. B- Micélio de *M. anisopliae* em larva de *A. diaperinus* em câmara úmida.

3.2.2 Bioensaio 2: efeito de fungos entomopatogênicos, incorporado à ração, sobre *A. diaperinus*

Este bioensaio consistiu na incorporação dos tratamentos descritos na Tabela 3, na ração comercial de frangos ofertadas para os insetos. Os tratamentos que não apresentaram efeito patogênico sobre larvas no bioensaio1 não foram utilizados. Em placas de Petri (\varnothing 15 cm), as soluções (10 mL), contendo cada um dos isolados, foram incorporadas à ração esterilizada (20g). Posteriormente foram deixadas secar em câmara de fluxo laminar, e esta foi disponibilizada aos insetos, conforme descrito no bioensaio 1 (Figura 7). O inseticida químico a base de cipermetrina + clorpirifós + butóxido de piperonila, apesar de possuir efeito inseticida, não foi incorporado à ração, uma vez que sua presença na ração causaria intoxicação nas aves (OURO FINO, 2015), sendo então excluído deste bioensaio.

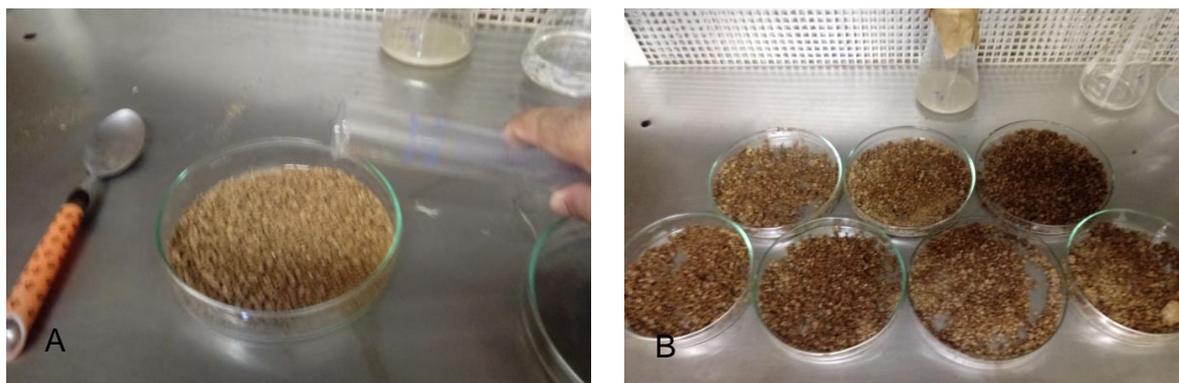


Figura 7 - Aplicação dos tratamentos em na ração de aves. A – Aplicação de 10 mL de cada tratamento em 20g de ração de ave. B – Ração incorporada com os tratamentos e acondicionada em câmara de fluxo laminar para a evaporação da água e posterior acondicionamento nas unidades experimentais para testes de controle de *A. diaperinus*.

Para a preparação de cada tratamento foram misturados 10 mL de solução em 20 g de ração de frango, previamente esterilizada (ver item 3.2.1), sendo esta mistura deixada em câmara de fluxo laminar horizontal para secar. Posteriormente, esta mistura foi separada em oito UEs, correspondente às repetições de cada tratamento. O preparo das soluções, a alocação dos insetos nas unidades experimentais, as condições de acondicionamento das UEs e a mortalidade confirmada, correspondem aos mesmos processos adotados no item 3.2.1.

Tabela 3 - Tratamentos com fungos entomopatogênicos e suas respectivas concentrações utilizados nos bioensaios para o controle de larvas e adultos de *A. diaperinus*.

Tratamentos	Descrição	[] conídios viáveis.mL ⁻¹
T1	Água	-
T2	Água +Tween 80® (0,01%)	-
T3	<i>B. bassiana</i> (Bc2)	1 x 10 ⁹
T4	<i>M. anisopliae</i> (IBCB 425)	1 x 10 ⁹
T5	<i>I. fumosorosea</i> (If1)	1 x 10 ⁹

3.3 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE *Alphitobius diaperinus* EM CONDIÇÕES DE SEMICAMPO

Para a realização destes bioensaios foi estabelecido uma metodologia adaptada de estudos com *A. diaperinus* em condições de semicampo (GINDIN et al., 2009; WOLF et al., 2014). Foram utilizadas como UEs, caixas plásticas, com tampa, com capacidade para 19 L (30 cm de comprimento x 20 cm de altura x 20 cm de largura), sendo as mesmas abastecidas com cama aviária (Figura 8).

A cama foi obtida de aviário comercial de frangos de corte, no município de Dois Vizinhos – PR, sendo uma cama composta de maravalha de Pinus de média idade, com sete lotes, sendo que o recomendado é a troca do material após o alojamento de 12 lotes de frangos. Após a mensuração dos volumes, em função do número de tratamentos e suas respectivas repetições, esta foi expurgada em saco plástico hermeticamente fechado durante 15 dias, para só então servir de substratos para o presente bioensaio.

As metodologias empregadas nas condições de semicampo, são de contato passivo e forçado. No bioensaio 1, com aplicações com o intuito de avaliar o potencial patogênicos de isolados que potencialmente entraram em contato com os insetos, ou seja, não há como confirmar o contato de ambos. No bioensaio 2, aplicações de isolados em meio à cama aviária, meio a qual se desenvolve o inseto, e sobre o qual é utilizada como substrato da metodologia. Ou seja, os insetos entraram em contato direto com a cama tratada. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições.



Figura 8 - Unidades experimentais adotadas em semicampo abastecidas com 0,003 m³ de cama aviária de sete lotes.

Na implantação dos bioensaios, cada unidade experimental recebeu o volume de 0,003 m³ de cama de aviário, correspondente a 5 cm de espessura, simulando as condições de aviários comerciais. Foram adicionados às unidades experimentais 20 insetos adultos, de coloração escura com tamanhos similares, e 20 larvas, de 3^o ao 7^o instar, de *A. diaperinus* (Figura 9), desprezando sexo e idade dos mesmos (WOLF et al., 2014).

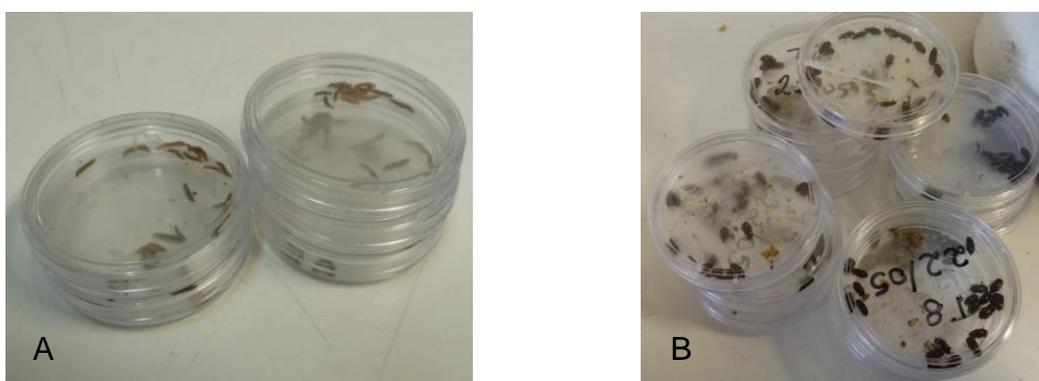


Figura 9 - Seleção de *A. diaperinus* para realização de bioensaio de semicampo, acondicionamento em placas de acrílico (Ø 5 cm). A) Larvas de 4^o a 7^o instar e B) Adultos.

3.3.1 Bioensaio em semicampo 1: efeito de fungos entomopatogênicos pulverizados a superfície interna das unidades experimentais

Com auxílio de aerógrafo (Pneumatic Sagyma[®]) acoplado a um compressor de ar (Fanem[®]) sob pressão constante de 1,2 Kgf cm⁻¹, foi aplicado 1,2 mL de solução

por UE (200 L.ha⁻¹) na superfície das mesmas (Figura 10). Os tratamentos, bem como as suas respectivas concentrações, estão descritos na Tabela 3.

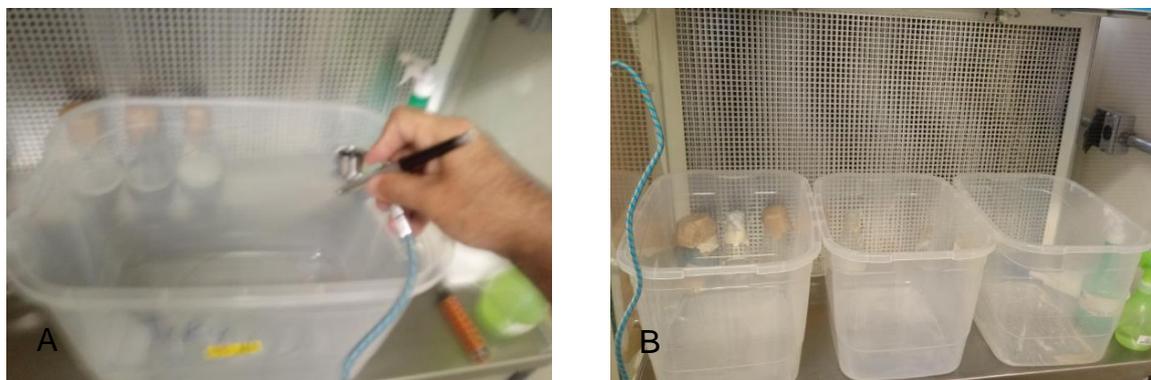


Figura 10 - A) Pulverização da solução contendo os tratamentos para controle de *A. diaperinus*, com auxílio de Aerógrafo e bomba de pressão, e B) UEs submetidas a câmara de fluxo laminar horizontal para evaporação da água.

Após a aplicação dos tratamentos, as UEs foram abastecidas com cama aviária (0,003 m³), ração comercial de frangos (20g) e 20 larvas e 20 adultos de *A. diaperinus* (Figura 11). Estas foram acondicionadas em sala climatizada por 240 horas (10 dias), com temperatura de 28 ± 2°C, UR de 70 ± 10% e fotofase de 14 horas (Figura 12A). As avaliações foram realizadas com sete dias e 10 dias, conforme metodologia adaptada WOLF et al., (2015). Após a implantação do bioensaio foram realizadas duas avaliações, sendo a mortalidade a variável resposta (Figura 12B). Os insetos mortos nos tratamentos com fungos, foram submetidos a câmara úmida, assim como nos bioensaios *in vitro*.

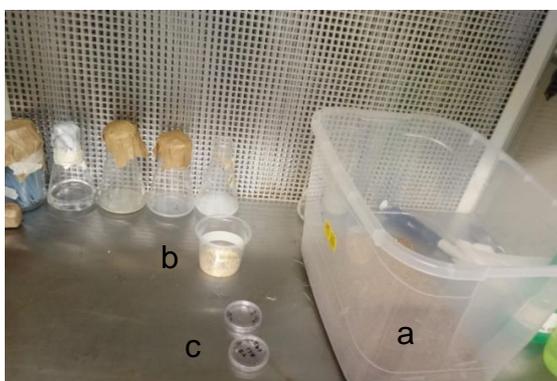


Figura 11 - Montagem das unidades experimentais em câmara de fluxo. a - UE suprida com 0,003 m³ cama aviária; b – 20g de ração comercial de frangos; c – 20 larvas e 20 adultos de *A. diaperinus*.

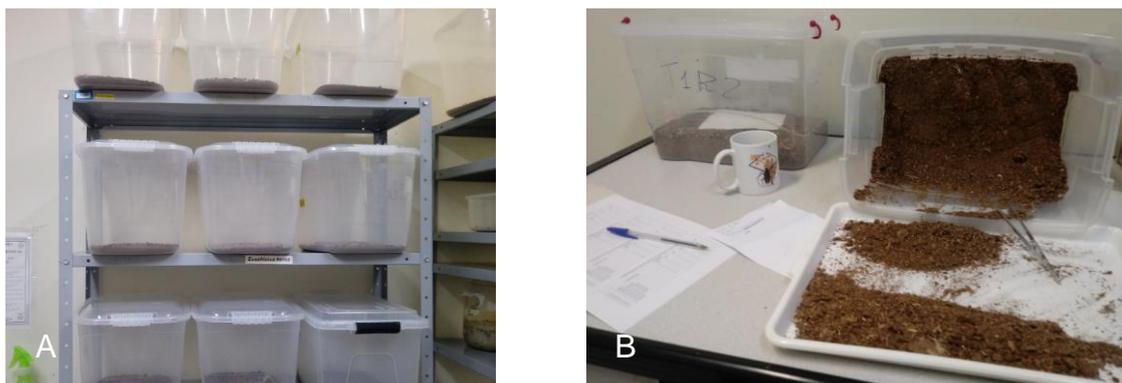


Figura 12 - Bioensaio de semicampo. A – Unidades experimentais acondicionadas em sala climatizada. B – Avaliação de mortalidade de larvas e adultos de *A. diaperinus*.

3.3.2 Bioensaio em semicampo 2: efeito de fungos entomopatogênicos aplicados em meio a cama aviária

Em câmara de fluxo horizontal, o volume de cama aviária de cada UE (0,003 m³) foi submetido a aplicação de 10 mL de solução de cada tratamento nas concentrações descritas na Tabela 3, de acordo com metodologia adaptada de GINDIN et al., (2009). Sendo então, mantidas por 2 horas para secagem em câmara de fluxo laminar horizontal (Figura 13). Posteriormente, a cama aviária tratada foi acondicionada em sua respectiva UE, juntamente com a ração comercial de frangos (20g) e 20 larvas e 20 adultos de *A. diaperinus*. As condições de acondicionamento das UEs, bem como as avaliações de mortalidade, são as descritas no item 3.3.1.

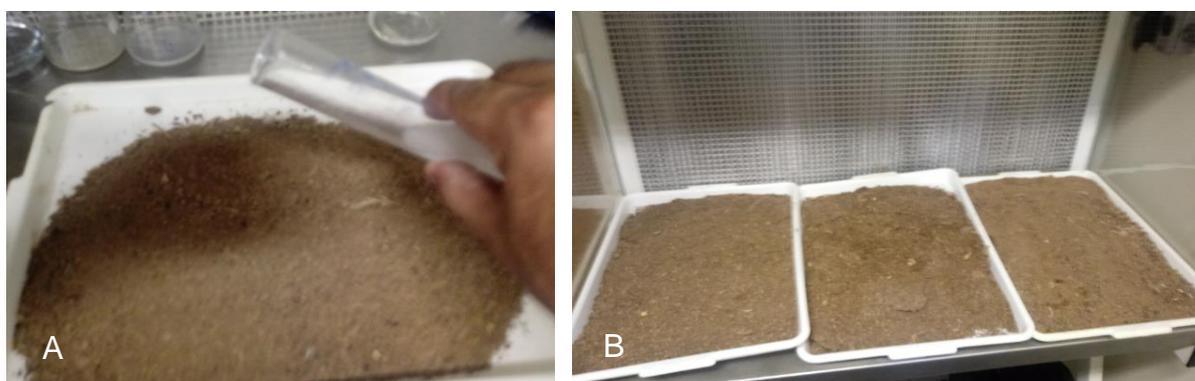


Figura 13 - A) Preparação do bioensaio com aplicação dos tratamentos em meio a cama aviária para controle de *A. diaperinus* e B) Acondicionamento do bioensaio em câmara de fluxo laminar para evaporação da água.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os bioensaios realizados receberam os mesmos tratamentos dos dados para a análise estatística. O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado (DIC) com oito e cinco repetições, para os bioensaios “*in vitro*” e semicampo, respectivamente. A variável-resposta analisada foi a mortalidade. Foram aplicados os testes de Bartlett e Shapiro-Wilk, para homogeneidade das variâncias e normalidade dos dados, respectivamente, afim de observar se os conjuntos de dados atendem a estes pressupostos. Quando estes pressupostos não foram atendidos, usou-se análise de dados não-paramétrica (Kruskal-Wallis) e o teste de médias de Duhn ($p > 0,05$), com auxílio do software Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2007).

4 RESULTADOS

4.1 Bioensaio 1: avaliação da patogenicidade de fungos entomopatogênicos sobre *A. diaperinus* – contato direto

Na avaliação de patogenicidade de isolados sobre larvas de *A. diaperinus*, os tratamentos T3 e T6, *B. bassiana* (IBCB 66) e *M. anisopliae* (Ma2), respectivamente, não diferiram das testemunhas Água (T1) e Água + Tween 80® 0,01% (T2). Os tratamentos T4, T5 e T7, *B. bassiana* (Bb2), *M. anisopliae* (IBCB 425) e *I. fumosorosea* (If1), respectivamente, provocaram médias de mortalidade sobre larvas de 40,0, 52,8 e 33,5%, as quais diferiram significativamente das testemunhas. O tratamento T8, correspondente ao inseticida químico (cipermetrina + clorpirifós + butóxido de piperonila), provocou a maior média de mortalidade, 58,3%, sobre larvas de *A. diaperinus*, diferindo dos demais tratamentos com exceção T5, *M. anisopliae* (IBCB 425) (Tabela 4).

Tabela 4 - Porcentagem de mortalidade média (\pm EP) de larvas e adultos de *A. diaperinus*, após imersão 1 mL dos tratamentos compostos por isolados de fungos entomopatogênicos (1×10^9 conídios.mL⁻¹) e inseticida químico sintético, acondicionados em estufa incubadora em temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas por 240 horas.

Tratamentos	Mortalidade média confirmada (%)	
	Larvas	Adultos
T1 Água	8,3 \pm 2,7 c	3,3 \pm 2,1 c
T2 Água+tween 80® (0,01%)	9,7 \pm 2,5 c	5,0 \pm 2,7 c
T3 <i>B. bassiana</i> – IBCB 66	14,0 \pm 2,6 c	13,3 \pm 3,1 c
T4 <i>B. bassiana</i> - Bb2	40,3 \pm 4,0 b	26,6 \pm 3,3 c
T5 <i>M. anisopliae</i> – IBCB 425	52,8 \pm 3,7 ab	38,3 \pm 3,7 b
T6 <i>M. anisopliae</i> - Ma2	11,0 \pm 4,2 c	28,3 \pm 3,9 c
T7 <i>I. fumosorosea</i> - If1	33,5 \pm 4,8 bc	21,7 \pm 3,3 c
T8 Inseticida químico	58,3 \pm 4,0 a	100,0 \pm 0,0 a
P - valor	0,0001	0,0001

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferenciam entre si pela análise não-paramétrica de Kruskal-wallis e pelo teste de médias de Duhn ($p < 0,05$).

Em relação à patogenicidade de isolados sobre adultos de *A. diaperinus*, os tratamentos T3, T4, T6 e T7, *B. bassiana* (IBCB 66), *B. bassiana* (Bb2), *M. anisopliae* (MA2) e *I. fumosorosea* (If1), respectivamente, provocaram médias de mortalidade que variaram de 13 a 28 % e não diferiram das testemunhas água (T1) e Água + Tween 80® 0,01% (T2). O tratamento T5, *M. anisopliae* (IBCB 425) provocou mortalidade média de 38,3%, diferindo dos tratamentos anteriormente, sendo o isolado com melhor resultado obtido sobre adultos de *A. diaperinus*. Contudo, a maior mortalidade média observada foi ocasionada pelo tratamento T8 (ciperermetrina + clorpirifós + butóxido de piperonila), correspondente ao inseticida químico sintético (Tabela 4).

4.2 Bioensaio 2: efeito de fungos entomopatogênicos, incorporado à ração, sobre *A. diaperinus*

As larvas de *A. diaperinus* que foram alimentadas com ração incorporada com os tratamentos apresentaram mortalidade média que variou de 3,2 a 9,8 %, para T5 [*I. fumosorosea* (IF1)] e T3 [*B. bassiana* (Bb2)], respectivamente. Enquanto que para os adultos, a variação de mortalidade foi de 9,8 a 13,4%, T5 [*I. fumosorosea* (IF1)] e T3 [*B. bassiana* (Bb2)], respectivamente. A mortalidade ocasionada pelos tratamentos, tanto nas larvas quanto nos adultos de *A. diaperinus*, não apresentou diferença significativa quando os tratamentos foram comparados entre si (Tabela 5).

Tabela 5 - Porcentagem de mortalidade média (\pm EP) de larvas e adultos de *A. diaperinus*, depois de 240 horas de incorporação dos tratamentos compostos por isolados de fungos entomopatogênicos (1×10^9 conídios.mL⁻¹) à ração, em temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

Tratamentos	Larvas (%) ns*	Adultos (%) ns*
T1 Água	6,4 \pm 1,9	1,6 \pm 1,9
T2 Água+tween (0,01%)	8,2 \pm 3,2	0,0 \pm 0,0
T3 <i>B. bassiana</i> - Bb2	9,8 \pm 3,0	13,4 \pm 3,1
T4 <i>M. anisopliae</i> – IBCB 425	4,8 \pm 2,1	6,6 \pm 2,7
T5 <i>I. fumosorosea</i> - If1	3,2 \pm 2,1	9,8 \pm 2,0
P - valor	0,8553	0,0600

Ns* Médias não diferem significativamente entre si pela análise não paramétrica de Kruskal-wallis ($p < 0,05$).

4.3 Bioensaio em semicampo 1: efeito de fungos entomopatogênicos, pulverizados em superfície de contato, sobre *A. diaperinus*

A mortalidade média de larvas de *A. diaperinus* avaliadas sete dias após o contato com superfície tratada, variou de 9 a 16%, com T5, *I. fumosorosea* (If1) e T4, *M. anisopliae* (IBCB 425), respectivamente. Em relação a avaliação aos 10 dias a média de mortalidade das larvas variou de 12 a 18%, com T5, *I. fumosorosea* (If1) e T4, *M. anisopliae* (IBCB 425), respectivamente. Em ambas as avaliações sete e 10 dias após a aplicação dos tratamentos, a mortalidade provocada pelos isolados sobre larvas de *A. diaperinus* não diferiu das testemunhas (Tabela 6).

Em relação a análise de mortalidade sobre adultos de *A. diaperinus* sete dias após o contato com superfície tratada as médias de mortalidade variaram de 8 a 10 %, com T5, *I. fumosorosea* (If1) e T4, *B. bassiana* (Bb2), respectivamente e, na avaliação aos 10 dias, variaram de 11 a 15 %, com T5, *B. bassiana* (Bb2) e T4, *M. anisopliae* (IBCB 425), respectivamente. Em ambas as avaliações sete e 10 dias após a aplicação dos tratamentos, as médias de mortalidade que os isolados provocaram sobre adultos de *A. diaperinus* não diferiu das médias das testemunhas, T1 (água) e T2 (água+tween 80® 0,01%) (Tabela 6).

Tabela 6 - Porcentagem de mortalidade média (\pm EP) de larvas e adultos de *A. diaperinus*, em avaliações de sete e 10 dias após a pulverização dos tratamentos compostos por isolados de fungos entomopatogênicos (1×10^9 conídios.mL⁻¹) sobre a superfície das UEs, em temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

Tratamentos	Média mortalidade larvas (%)		Média mortalidade adultos (%)	
	7 dias ns	10 dias ns	7 dias ns	10 dias ns
T1 Água	4,0 \pm 1,9	6,0 \pm 1,9	1,0 \pm 1,4	2,0 \pm 1,6
T2 Água+tween (0,01%)	6,0 \pm 2,4	8,0 \pm 2,0	4,0 \pm 1,9	5,0 \pm 2,1
T3 <i>B. bassiana</i> - Bb2	13,0 \pm 2,9	15,0 \pm 2,9	8,0 \pm 2,3	11,0 \pm 1,9
T4 <i>M. anisopliae</i> – IBCB425	16,0 \pm 3,4	18,0 \pm 3,6	10,0 \pm 3,4	15,0 \pm 3,6
T5 <i>I. fumosorosea</i> - If1	9,0 \pm 2,6	12,0 \pm 2,3	9,0 \pm 3,1	12,0 \pm 3,3
P - valor	0,3072	0,2404	0,3907	0,0792

Ns* não significativo pela análise não paramétrica de Kruskal-wallis ($p < 0,05$).

4.4 Bioensaio em semicampo 2: efeito de fungos entomopatogênicos sobre *A. diaperinus* aplicados em meio a cama aviária

As médias de mortalidades ocasionadas pelos isolados para larvas e adultos de *A. diaperinus*, avaliados sete e 10 dias após o contato destes com a cama aviária tratada, não diferiram das médias obtidas quando em contato com as testemunhas. Na avaliação da mortalidade de larvas de *A. diaperinus* aos sete dias após o contato com a cama aviária tratada, verificou-se que os tratamentos causaram mortalidade média acumulada que variou entre 8,8 e 13,8%, para T4, *M. anisopliae* (IBCB 425) e T3, *B. bassiana* (Bb2), respectivamente. Em relação a mortalidade larval avaliada aos 10 dias, após o contato com a cama aviária tratada, a média acumulada variou entre 15,0 e 18,8 %, para T4, *M. anisopliae* (IBCB 425) e T3, *B. bassiana* (Bb2), respectivamente (Tabela 7).

Para os adultos de *A. diaperinus*, os tratamentos incorporados na cama aviária provocaram baixa mortalidade, tanto quando avaliados após sete dias (8,8; 8,8 e 6,8% de mortalidade provocada por T3, *B. bassiana* (Bb2), T4, *M. anisopliae* (IBCB 425) e T5, *I. fumosorosea* (If1), respectivamente, quanto quando avaliados depois de 10 dias (13,8, 12,5 e 13,8% de mortalidade provocada por T3, *B. bassiana* (Bb2), T4, *M. anisopliae* (IBCB 425) e T5, *I. fumosorosea* (If1), respectivamente) (Tabela 7).

Tabela 7 - Porcentagem de mortalidade média (\pm EP) de larvas e adultos de *A. diaperinus*, em avaliações de sete e 10 dias após a incorporação dos tratamentos compostos por isolados de fungos entomopatogênicos (1×10^9 conídios.mL⁻¹) na cama aviária, em temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

Tratamentos	Larvas (ns)		Adultos (ns)	
	7 dias	10 dias	7 dias	10 dias
T1 Água	8,8 \pm 3,4	10,0 \pm 3,3	1,3 \pm 1,6	1,3 \pm 1,6
T2 Água+tween (0,01%)	11,3 \pm 2,2	13,8 \pm 2,9	3,8 \pm 2,2	8,8 \pm 2,9
T3 <i>B. bassiana</i> - Bb2	13,8 \pm 3,3	18,8 \pm 2,9	8,8 \pm 3,3	13,8 \pm 2,7
T4 <i>M. anisopliae</i> – IBCB 425	8,8 \pm 2,2	15,0 \pm 3,3	8,8 \pm 2,5	12,5 \pm 1,7
T5 <i>I. fumosorosea</i> - If1	12,5 \pm 3,1	16,3 \pm 3,6	6,8 \pm 3,1	13,8 \pm 2,9
P valor	0,8762	0,7048	0,5017	0,0614

Ns* não significativo pela análise ñ paramétrica de Kruskal-wallis ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Observou-se que o percentual de controle de *A. diaperinus* variou de acordo com cada isolado dos fungos entomopatogênicos utilizados e com o estágio de desenvolvimento do inseto (larva ou adulto). Dos cinco isolados de fungos utilizados apenas três apresentaram patogenicidade sobre larvas e apenas um apresentou patogenicidade sobre adultos.

Em relação aos isolados da espécie *B. bassiana*, o isolado IBCB 66 não apresentou patogenicidade sobre larvas e adultos, enquanto que o Bb2, apresentou-se patogênico apenas para larvas. Em bioensaio de patogenicidade similar ao realizado no presente trabalho, Rohde et al., (2006) avaliaram o potencial patogênico de 58 isolados de *B. bassiana* sobre larvas e adultos de *A. diaperinus* na concentração de 10^9 conídios.mL⁻¹. Os resultados de mortalidade confirmada sobre larvas variaram de 6,7 a 100%, e para adultos, de 0 a 86,7%. Ao avaliar o isolado de *B. bassiana*, IBCB 66 obtiveram resultados de mortalidade sobre larvas e adultos de *A. diaperinus*, de 50 e 0%, respectivamente. Enquanto que ao avaliar o isolado IBCB 425, de *M. anisopliae* obtiveram resultados de mortalidade sobre larvas e adultos de *A. diaperinus*, de 45 e 6,7%, respectivamente. Contudo, apesar de outros isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* apresentarem percentuais de mortalidades que atingiram 100%, estes ainda não foram explorados de forma comercial. Resultados similares foram obtidos por Santoro et al., (2008) que ao avaliarem a patogenicidade de 30 isolados de *B. bassiana* sobre adultos de *A. diaperinus*, verificaram índices de mortalidade de 0 a 67,2%.

A ampla variação de patogenicidade entre os isolados testados nos estudos citados corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho para os isolados de *B. bassiana* testados. O mesmo também foi verificado em outros estudos que avaliaram a patogenicidade de isolados de *B. bassiana* sobre *A. diaperinus* (GINDIN et al., 2009; PRADO-REBOLLEDO et al., 2014; SANTORO et al., 2015b). Seleção de isolados com alta virulência foram obtidos em estudos realizados por Prado-Rebolledo et al., (2014); Rezende et al., (2009); Rohde et al., (2006); Santoro et al., (2015b); Santos et al., (2006) em condições de laboratório e semicampo sobre estágios de

larvas e adultos, inferindo que a obtenção de controle eficiente de *A. diaperinus* com *B. bassiana*, depende da seleção de um isolado adequado a este inseto-praga.

Em relação aos isolados da espécie *M. anisopliae*, o isolado IBCB 425 apresentou patogenicidade sobre larvas e adultos, enquanto que o Ma2 não apresentou patogenicidade a *A. diaperinus*, independente dos estágios avaliados. Resultados similares foram obtidos por Gindin et al., (2009) ao avaliar a patogenicidade de 18 isolados sobre larvas de *A. diaperinus* na densidade de $2,5 \times 10^5$ conídios.cm⁻². Estes autores verificaram mortalidade confirmada entre 5 a 97,5% das larvas e destes apenas nove isolados provocaram mortalidade acima de 40%. Outros estudos de avaliação de patogenicidade de isolados de *M. anisopliae* demonstram variabilidade na patogenicidade e virulência de isolados sobre larvas e adultos de *A. diaperinus* (CHERNAKI-LEFFER; SOSA-GÓMEZ; ALMEIDA, 2007; SANTOS et al., 2006).

Isolados de *M. anisopliae* apresentam potencial no controle de *A. diaperinus*, com índices de controle de até 98% (CASSIANO et al., 2008). Entretanto, há uma variabilidade genética conhecida entre diferentes isolados, como verificado no presente trabalho. Neste sentido, outros estudos também verificaram baixa virulência de isolados de *M. anisopliae* sobre *A. diaperinus* (POPOWSKA-NOWAK; TUMIALIS; PEZOWICZ, 2017).

Trabalhos já realizados demonstram o baixo potencial inseticida de *I. fumosorosea* sobre *A. diaperinus*, conforme destacado por Chernaki-Leffer; Sosa-Gómez; Almeida, (2007) que avaliaram a patogenicidade de três isolados de *I. fumosorosea* (CNPSo-Pf79, CNPSo-Pf81 e CNPSo-Pf83) sobre adultos de *A. diaperinus* em condições de laboratório. Resultados similares foram obtidos por Popowska-Nowak; Tumialis; Pezowicz, (2017), em condições de laboratório. Entretanto, estudos que avaliaram efeito de *I. fumosorosea* sobre outros coleópteros foram conduzidos por Montemayor; Avery; Cave (2016) e Sevim et al., (2010), os quais verificaram patogenicidade de *I. fumosorosea* sobre os referidos insetos. Montemayor; Avery; Cave (2016) verificaram que um isolado de *I. fumosorosea* na concentração de 10^9 conídios.mL⁻¹ foi avaliado quanto à sua patogenicidade em relação aos diferentes estágios de *Microtheca ochroloma* (Stal) (Coleoptera: Chrysomelidae), verificando 31 e 39% de mortalidade em larvas de 1º e 3º instar, respectivamente. Estes resultados obtidos em relação ao efeito entomopatogênico entre *I. fumosorosea* e insetos da

ordem coleóptera, corroboram com os obtidos no presente trabalho, onde o isolado de *I. fumosorosea* promoveu mortalidade de 33,5% sobre larvas e não apresentou patogenicidade sobre adultos para *A. diaperinus*.

A literatura traz relatos de *I. fumosorosea* controlando espécies de insetos de diferentes famílias da ordem Coleoptera, tais como: Anobiidae, Carabidae, Cerambycidae, Chrysomelidae, Coccinellidae e Curculionidae (ZIMMERMANN, 2008). Dessa forma, pode-se inferir que a identificação e a seleção de isolados de *I. fumosorosea* patogênicos e mais virulentos para o controle de *A. diaperinus* é viável para uma possível utilização em programas de controle biológico de *A. diaperinus*.

No que diz respeito a patogenicidade de isolados das espécies *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* sobre larvas e adultos de *A. diaperinus* infere-se que ela é variável. A patogenicidade é variável entre espécies de fungos entomopatogênicos, entre os isolados dentro da mesma espécie, entre as espécies de insetos e dentre as fases de desenvolvimento do inseto no qual é aplicado. Alves (1998); Alves; Lopes (2008); Barros et al., (2010); Zimmermann (2008) descrevem a ampla variabilidade genética dos fungos entomopatogênicos e as relacionam com seus respectivos hospedeiros. Pedrini (2018); Qu; Wang (2018) descrevem que o ciclo das relações patógeno-hospedeiro pode influenciar em maior ou menor suscetibilidade do inseto-praga ao fungo, no qual mecanismos do sistema imune do inseto, celular e humoral, atuam para suprimir às infecções. Ainda, os insetos podem produzir sobre a cutícula substâncias antimicrobianas que visam reduzir a atividade fúngica, podendo reduzir a germinação de conídios. No entanto, mesmo que a infecção de um isolado ocorra o sistema imune pode suprimir a colonização da hemocele do inseto, através de processos de fagocitose, encapsulação, melanização e produção de substâncias antimicrobianas (QU; WANG, 2018). Ou seja, o inseto não é um organismo passivo, ele responde a estímulos de agressão, e esta resposta pode acarretar na tolerância ou resistência de um inseto a determinados isolados.

Outro aspecto observado no presente trabalho e que deve ser destacado, é a maior suscetibilidade de larvas em relação aos adultos. Vários estudos destacam maior suscetibilidade de larvas aos isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* quando comparado aos adultos desta mesma espécie (ALVES et al., 2015; CHERNAKILEFFER; SOSA-GÓMEZ; ALMEIDA, 2007; GINDIN et al., 2009; ROHDE et al., 2006). Tal fato pode ser atribuído a cutícula dos insetos adultos ser mais espessa, a qual

confere maior resistência e proteção a agentes externos em relação à cutícula da fase larval. Além disso, o fungo deverá gastar mais energia para penetrar infectar um inseto adulto (QU; WANG, 2018), em especial insetos com cutícula espessa, como é o caso de *A. diaperinus*. Sendo o estágio larval, um período crítico ao ciclo de vida do inseto, sendo um momento oportuno para o uso de fungos entomopatogênicos. Um fator que pode aumentar a virulência de isolados de *B. bassiana*, de acordo com Santoro et al., (2015b), são as sucessivas passagens dos isolados pelo cadáver de *A. diaperinus*, sendo este aspecto biológico dos isolados uma oportunidade para estudos futuros, inclusive com os mesmos isolados testados no presente trabalho.

As condições ambientais são preponderantes para o desencadeamento das fases do ciclo das relações patógeno-hospedeiro, principalmente temperatura e umidade (ALVES, 1998; BARROS et al., 2010; QU; WANG, 2018). Em estudo conduzido por Santos et al., (2006) ao avaliarem o efeito patogênico de um isolado de *B. bassiana* sobre larvas e adultos de *A. diaperinus* em temperaturas de 26 °C, obtiveram mortalidade acima de 80% para ambos. Sendo 26 °C de temperatura considerada ideal para esta espécie. No presente trabalho, as condições de temperaturas impostas aos tratamentos foi de 28 ± 2 °C, nas metodologias de laboratório e semicampo, permitindo inferir que o fator temperatura não teve influência sobre os resultados dos isolados.

Em relação ao tratamento com inseticida químico sintético, este promoveu os maiores percentuais de controle, tanto para larvas quanto para adultos de *A. diaperinus*, em relação aos tratamentos com fungos entomopatogênicos. Resultados similares foram obtidos por Wolf et al., (2015) ao submeter larvas e adultos a inseticida químico (cipermetrina + clorpirifós + citronelal) na proporção de 1:400 (1L de produto comercial em 400L de água) o qual provocou percentuais de mortalidade de 68 e 100%, para larvas e adultos, respectivamente, em condições de semicampo. Resultados similares foram obtidos no presente trabalho. A temperatura, bem como a presença da cama aviária pode ter interferido na eficiência de controle das larvas. Contudo, estes fatores não interferiram nos resultados obtidos por este trabalho, já que não eram objetos de interesse nos bioensaios de laboratório.

Chernaki-Leffer et al., (2011) relataram variação na suscetibilidade de populações distintas de *A. diaperinus* à cipermetrina, diclorvós e triflumurom, e enfatizaram a importância do manejo de inseticidas químicos para minimizar a

pressão de seleção e conseqüentemente, o surgimento de populações resistentes. Efeito este, que não pode ser relacionado no presente trabalho, uma vez que o inseto se mostrou suscetível ao inseticida químico sintético utilizado.

A metodologia de inoculação dos isolados entomopatogênicos em meio à ração não obteve resultados sobre a mortalidade de larvas e adultos de *A. diaperinus* em condições de laboratório. Cassiano et al., (2008) testou metodologia similar ao avaliar o efeito da adesão de conídios de *M. anisopliae* ao submeter os insetos a caminhada por tempo determinado sobre uma superfície tratada com fungos. Esta metodologia pode ser considerada similar à usada no presente trabalho, por avaliar o efeito do contato entre os isolados e os insetos. O ensaio demonstrou uma interação entre tempo exposto e adesão de conídios que resultou em um percentual de 74% de mortalidade sobre larvas após 48 horas, e 50% de mortalidade sobre adultos após 15 dias de exposição ao fungo. A não mortalidade observada no presente trabalho pode estar atribuída aos isolados e não a metodologia de emprego, uma vez que Gindin et al., (2009) verificaram, com metodologia similar, percentuais de mortalidade que variaram de 60 a 97%, sobre larvas de *A. diaperinus*.

De acordo com Alves (1998); Pedrini (2018); Qu; Wang (2018) a adesão, germinação e penetração são fases importantes e complexas dentre as fases do ciclo patógeno-hospedeiro. Estas, precedem a colonização e aparecimento dos sintomas e são responsáveis pela patogenicidade de um isolado. Submeter insetos ao contato com os fungos proporciona a adesão dos conídios dos isolados à cutícula do inseto. Logo, o fato de não haver patogenicidade pode ser resposta dos insetos aos estímulos dos fungos entomopatogênicos.

Em relação a aplicação de fungos sobre as superfícies a qual o inseto entra em contato em condições em que há a presença de cama aviária, não provocaram a mortalidade de *A. diaperinus*. Alves et al., (2015) avaliaram o efeito de um isolado de *B. bassiana* ($4,2 \times 10^9$ conídios.m²) aplicado sobre as superfícies de um aviário comercial (muretas, chão e vigas) sem a presença da cama, sendo esta introduzida após 48 horas. Estes verificaram que houve redução na população de insetos de 56 e 73%, quando avaliados 96 e 146 dias após a aplicação dos tratamentos. No entanto, a população de insetos voltou a níveis próximos aos iniciais após 216 dias. Contudo deve-se destacar que o isolado empregado, UNIOESTE 04, de *B. bassiana*, possuía virulência comprovada em testes preliminares, sendo um dos requisitos

imprescindíveis para o sucesso desta prática. Assim averigua-se que não ocorrer a mortalidade de *A. diaperinus* na metodologia de aplicação em superfícies de contato é em decorrência dos isolados inadequados ao controle deste inseto e não a metodologia em si. Resultados similares foram averiguados por Geden; Steinkraus (2003); Gindin et al., (2009) com metodologia de aplicação de isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* para a supressão de larvas de *A. diaperinus*. Observação de isolados das espécies *B. bassiana* e *M. anisopliae* ocorrendo naturalmente no interior de aviários comerciais controlando *A. diaperinus* (ALVES et al., 2004, 2005). Permitindo inferir que a cama aviária e seus constituintes não afetam a viabilidade de conídios das espécies de *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

No que diz respeito às metodologias de aplicação de fungos, forçadas ou passivas, elas são dependentes primeiramente dos parâmetros biológicos dos isolados. Germinação, produção de conídios, patogenicidade e virulências são aspectos que devem ser considerados para um isolado eficiente (ALVES, 1998; BARROS et al., 2010; QU; WANG, 2018). Ou seja, ao trabalhar com isolados com baixa patogenicidade reduz-se o potencial de qualquer metodologia de aplicação expressar percentuais de controle satisfatórios para *A. diaperinus*. Ou seja, com base nos resultados de baixa virulência observados nos resultados de laboratório (aplicação forçada), infere-se que a baixa eficiência dos métodos de aplicação é em decorrência dos isolados e não da metodologia empregada.

Apesar dos resultados de mortalidade de larvas e adultos de *A. diaperinus* obtidos pelo presente trabalho apresentarem-se abaixo do que é considerado viável para o controle de *A. diaperinus* com fungos entomopatogênicos, novos estudos devem ser conduzidos para investigar outras possibilidades. Dentre essas possibilidades destacam-se ensaios com outros isolados de fungos entomopatogênicos, determinação de concentrações mais adequadas, estimativa de DL_{50} para os isolados empregados, bem como, o uso de outras espécies são pontos que podem ser explorados em estudos futuros. Investigar a influência das propriedades da cama aviária sobre os parâmetros biológicos dos isolados e a possível interferência destas sobre o ciclo das relações patógeno-hospedeiro é um fator que também poderá ser considerado.

6 CONCLUSÕES

Os fungos entomopatogênicos das espécies *B. bassiana* (Bb2), *M. anisopliae* (IBCB 425) e *I. fumosorosea* (If1) apresentam potencial para o controle de *A. diaperinus*, conforme metodologia de contato direto “*in vitro*” de insetos.

Os demais isolados não apresentaram patogenicidade a este inseto nas diferentes metodologias avaliadas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA. **Relatório anual de atividades 2018**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

ALVES, L. F. A. et al. Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em adultos de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) em aviários comerciais em Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 793–795, 2004.

ALVES, L. F. A. et al. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman (Moniliales: Moniliaceae) sobre o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), em aviário comercial de Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 3, p. 507–510, 2005.

ALVES, L. F. A. et al. *Beauveria Bassiana* Applied to Broiler Chicken Houses as Biocontrol of *Alphitobius Diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae), an Avian Pathogens Vector. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 17, n. 4, p. 459–466, 2015.

ALVES, L. F. A.; ROHDE, C.; ALVES, V. S. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Nematoda : Rhabdita) Contra o Cascudinho , *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera : Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 139–141, 2005.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2a. ed. Piracicaba: Fealq, 1998.

ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle microbiano de pragas na América Latina**. III ed. Piracicaba: Fealq, 2008.

ATHIÉ, I.; DE PAULA, D. C. **Insetos de grãos armazenados: aspectos biológicos e identificação**. II ed. São Paulo: Livraria Varela, 2002.

AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém - PA, 2007.

BARBOSA, S.; ANDRADE, D. J. DE; POLANCZYK, R. A. Susceptibility of *Tetranychus ogmophallos* (Acari : Tetranychidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium*

anisopliae Susceptibility of Tetranychus ogmophallos (Acari : Tetranychidae) to Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae. **Florida Entomologist**, v. 101, n. 2, p. 249–253, 2018.

BARROS, N. M. et al. **Fungos - Uma Introdução À Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. II ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010.

CARVALHO, D. et al. Susceptibilidade de duas linhagens comerciais de frango de corte no desenvolvimento de dermatite necrótica e possível relação dos genes *iss* e *iutA* de *Escherichia coli* com a reprodução experimental da doença. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1395–1400, 2017.

CASSIANO, J. A. et al. Análise de adesão do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para o controle de *Alphitobius diaperinus* (cascudinho) em instalações avícolas. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v. 45, n. 5, p. 348–353, 2008.

CATELLI, L.; PINHEIRO, J. G. Programa integrado de controle de pragas: controle estratégico do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*). **A revista do Avisite**, p. 46–47, set. 2014.

CHERNAKI-LEFFER, A. M. et al. Isolamento de Enterobactérias em *Alphitobius Diaperinus* e na Cama de Aviários no Oeste do Estado do Paraná , Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 3, p. 243–247, 2002.

CHERNAKI-LEFFER, A. M. et al. Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera , Tenebrionidae) to cypermethrin , dichlorvos and triflumuron in southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, n. 1, p. 125–128, 2011.

CHERNAKI-LEFFER, A. M.; SOSA-GÒMEZ, D. R.; ALMEIDA, L. M. Selection for entomopathogenic fungi and LD50 of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. for the Lesser Mealworm *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 9, n. 3, p. 187–191, 2007.

CHERNAKI, A. M.; ALMEIDA, L. M. Exigências Térmicas, Período de Desenvolvimento e Sobrevivência de Imaturos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 3, p. 365–368, 2001.

CRIPPEN, T. L. et al. Transient gut retention and persistence of *Salmonella* through metamorphosis in the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 5, p. 920–926, 2012.

CRIPPEN, T. L.; POOLE, T. L. Conjugative Transfer of Plasmid-Located Antibiotic Resistance Genes Within the Gastrointestinal Tract of Lesser Mealworm Larvae, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Foodborne pathogens and Disease**, v. 6, n. 7, p. 907–915, 2009.

DESPINS, J. L.; AXTELL, R. C. Feeding behavior and growth of broiler chicks fed larvae of the Darkling Beetle, *Alphitobius diaperinus*. **Poultry Science**, v. 74, p. 331–336, 1995.

DESPINS, J. L.; TURNER, C. J.; RUSZLER, P. L. Construction Profiles of High Rise Caged Layer Houses in Association with Insulation Damage Caused by the Lesser Mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) in Virginia. **Poultry Science**, v. 66, p. 243–250, 1987.

ELOWNI, E. E.; ELBIHARI, S. Natural and experimental infection of the beetle, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) with *Choanotaenia infundibulum* and other chicken tapeworms. **Veterinary Science Communications**, v. 3, n. 1, p. 171–173, 1979.

GAZONI, F. L. et al. Avaliação da resistência do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) a diferentes temperaturas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 1, p. 69–74, 2012.

GEDEN, C. J.; STEINKRAUS, D. C. Evaluation of three formulations of *Beauveria bassiana* for control of lesser mealworm and hide beetle in Georgia poultry houses. **Journal of economic entomology**, v. 96, n. 5, p. 1602–1607, 2003.

GINDIN, G. et al. Entomopathogenic fungi as a potential control agent against the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* in broiler houses. **BioControl**, v. 54, n. 4, p. 549–558, 2009.

GODINHO, R. P.; ALVES, L. F. A. Método de avaliação de população de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) Panzer em aviários de frango de corte. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v. 76, n. 1, p. 107–110, 2009.

GODOY, P. Avicultura: A mais social das atividades agropecuárias. **Avi Site - Produção Animal - Avicultura**, v. V, n. 54, p. 32–44, 2011.

GODOY, P. Brasil: segundo maior produtor de carne de frango do mundo. **A revista do Avisite**, p. 22–28, dez. 2015.

- GODOY, P. Os “bons Ventos” da Avicultura. **A revista do Avisite**, p. 4–5, jul. 2017.
- GUIDE, B. A. et al. Selection of entomopathogenic nematodes and evaluation of their compatibility with cyantraniliprole for the control of *Hypothenemus hampei*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 4, p. 1489, 2018.
- HARRINGTON, D. W. J. et al. Opportunities for integrated pest management to control the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. **World’s Poultry Science Journal**, v. 67, n. 1, p. 83–94, 2011.
- HAZELEGER, W. C. et al. Darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae as potential vectors for the transfer of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B Variant Java between successive broiler flocks. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 22, p. 6887–6891, 2008.
- INDEX FUNGORUM, I. **Metarhizium anisopliae**. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>>. Acesso em: 1 fev. 2019a.
- INDEX FUNGORUM, I. **Isaria fumosorosea**. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>>. Acesso em: 20 jan. 2019b.
- JAPP, A. K. **INFLUÊNCIA DO *Alphitobius diaperinus* (PANZER, 1797) (COLEOPTERA, TENEBRIONIDAE) NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE FRANGOS DE CORTE E AVALIAÇÃO DA TERRA DIATOMÁCEA COMO ESTRATÉGIA PARA O SEU CONTROLE**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2008.
- JAPP, A. K.; BICHO, C. DE L.; SILVA, A. V. F. DA. Importance and measures of control for *Alphitobius diaperinus* in poultry houses. **Ciência Rural**, v. 40, n. julho, p. 1668–1673, 2010.
- LAMBKIN, T. A.; FURLONG, M. J. Metabolic Mechanisms Only Partially Explain Resistance to Pyrethroids in Australian Broiler House Populations of Lesser Mealworm (Coleoptera : Tenebrionidae) Metabolic Mechanisms Only Partially Explain Resistance to Pyrethroids in Australian Broiler House. **JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY**, v. 104, n. 2, p. 629–635, 2011.
- LAY JR, D. C. et al. Hen welfare in different housing systems. **Poultry Science**, v. 90, p. 278–294, 2011.
- LUANGSA-ARD, J. J. et al. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea*

species. **Mycological Research**, v. 109, n. 5, p. 581–589, 2005.

MENDES, L. R.; POVALUK, M. CICLO E CONTROLE DO *Alphitobius diaperinus* (COLEOPTERA, TENEBRIONIDAE) NO MUNICÍPIO DE QUITANDINHA, PR. **Saúde & Meio Ambiente**, v. 6, n. 1, p. 107–122, 2017.

MONTEMAYOR, C. O.; AVERY, P. B.; CAVE, R. D. Infection and mortality of *Microtheca ochroloma* (Coleoptera: Chrysomelidae) by *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) under laboratory conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 26, n. 5, p. 605–616, 2016.

MONZÓN, A. J.; GUHARAY, F.; KLINGEN, I. Natural occurrence of *Beauveria bassiana* in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) populations in unsprayed coffee fields. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, n. 2, p. 134–141, 2008.

MUL, M. et al. Control methods for *Dermanyssus gallinae* in systems for laying hens: Results of an international seminar. **World's Poultry Science Journal**, v. 65, n. 4, p. 589–599, 2009.

OLIVEIRA, D. G. . et al. Laboratory and Field Evaluation of a Cypermethrin- Based Insecticide for the Control of *Alphitobius Diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae) and Its In-Vitro Effects on *Beauveria Bassiana* Bals. Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae). **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 18, n. 3, p. 371–380, 2016.

OLIVEIRA, D. G. .; ALVES, L. F. .; SOSA-GÓMEZ, D. R. Advances and Perspectives of the use of the entomopathogenic fungi *beauveria bassiana* and *metarhizium anisopliae* for the control of arthropod pests in poultry production. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 16, n. 1, p. 01-12, 2014.

OURO FINO, S. A. **Colosso avicultura**. Disponível em: <<https://www.ourofinosaudeanimal.com/produtos/aves/ectoparasiticidas/colosso-avicultura/>>. Acesso em: 12 dez. 2018.

PACHECO NETO, G. et al. Avaliação dos impactos ambientais de atividade avicultora em Pinhal da Serra , Rio Grande do Sul , Brasil. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 5, n. 9, p. 41–48, 2018.

PALHARES, J. C. P. **IMPACTO AMBIENTAL DA PRODUÇÃO DE FRANGOS DE**

CORTE. Disponível em:

<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/57056/1/impacto-ambiental-da-producao.pdf>>. Acesso em: 4 dez. 2018.

PARRA, J. R. P. Biological Control in Brazil : An overview. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 5, p. 345–355, 2014.

PAULI, G. et al. Within-Host Competition between Two Entomopathogenic Fungi and a Granulovirus in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Insects**, v. 9, n. 2, p. 64, 2018.

PEDRINI, N. Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. **Fungal Biology**, v. 122, n. 6, p. 538–545, 2018.

POPOWSKA-NOWAK, E.; TUMIALIS, D.; PEZOWICZ, E. Susceptibility of lesser mealworm , *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera : Tenebrionidae) to entomopathogenic fungi isolated from poultry houses litter and nearby soil. **Studia Ecologiae et Bioethicae**, v. 15, n. 4, p. 31–39, 2017.

PRADO-REBOLLEDO, O. et al. Patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) en adultos del escarabajo *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera : Tenebrionidae) de casetas avícolas del estado de Colima. **Revista Iberoamericana de Ciencias**, v. 1, n. 1, p. 88–93, 2014.

PRESTES, T. M. V. et al. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Moniliales: Moniliaceae) e patogenicidade sobre *Protortonia navesi* Fonseca (Hemiptera: Monophlebiidae) na cultura da mandioca, em Marechal Cândido Rondon, Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, n. 0, p. 1–4, 2015.

QU, S.; WANG, S. Interaction of entomopathogenic fungi with the host immune system. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 83, p. 1–8, 2018.

RENAULT, D.; BIJOU, A.; HERVANT, F. Impact of different acclimation temperatures and duration on the chill coma temperature and oxygen consumption in the tenebrionid beetle *Alphitobius diaperinus*. **Physiological Entomology**, v. 37, n. 4, p. 354–359, 2012.

REZENDE, S. R. F. et al. Control of the *Alphitobius Diaperinus* (Panzer) (Coleoptera :

Tenebrionidae) with Entomopathogenic Fungi. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 11, n. 2, p. 121–127, 2009.

RODRÍGUEZ, D. et al. Evaluación en condiciones de laboratorio de la eficacia de tres insecticidas de nuevo uso en la avicultura cubana para el control de *Alphitobius diaperinus*. **Revista Salud Animal**, v. 35, n. 3, p. 197–200, 2013.

ROHDE, C. . et al. Seleção de Isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill . e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok . contra o Cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera : Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 2, p. 231–240, 2006.

SALLET, L. A. P. **Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae)**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2013.

SANTORO, P. H. et al. Selection of *Beauveria bassiana* isolates to control *Alphitobius diaperinus*. **Journal of INVERTEBRATE PATHOLOGY**, v. 97, n. 2008, p. 83–90, 2008.

SANTORO, P. H. et al. Quality of *Beauveria bassiana* conidia after sucessive passages through *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 41, n. 1, p. 87–94, 2015a.

SANTORO, P. H. et al. Quality of *Beauveria bassiana* conidia after successive passages through *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 41, n. 1, p. 87–94, 2015b.

SANTOS, J. C. et al. Efeito da combinação de espécies de fungos entomopatogênicos e de temperatura de incubação na mortalidade de *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera : Tenebrionidae) Effect of combinations of entomopathogenic fungi species and incubation temperatures. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 525–531, 2006.

SEGABINAZI, S. D. et al. Bactérias da família Enterobacteriaceae em *Alphitobius diaperinus* oriundos de granjas avícolas dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina , Brasil * Enterobacteriaceae in the *Alphitobius diaperinus* got from avian farms from Rio Grande do Sul. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 51–55, 2005.

SEVIM, A. et al. Screening of entomopathogenic fungi against the European spruce bark beetle, *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 20, n. 1, p. 3–11, 2010.

SILVA, A. S. et al. Ação do fungo *Beauveria bassiana*, isolado 986, sobre o ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1944–1947, 2006.

SILVA, A. S.; HOFF, G.; DOYLE, R. L. Ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 2, p. 177–181, 2005.

SPECHT, A. et al. Ocorrência do fungo entomopatogênico *Isaria javanica* (Frieder. & Bally) Samson & Hywell-Jones (Fungi, Sordariomycetes) em lagartas de *Lonomia obliqua* Walker (Lepidoptera, Saturniidae, Hemileucinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 3, p. 493–494, 2009.

TIAGO, P. V.; OLIVEIRA, N. .; LIMA, E. A. L. A. Biological insect control using *Metarhizium anisopliae*: morphological, molecular, and ecological aspects. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 645–651, 2014.

VAUGHAN, J. A.; TURNER, E. C.; RUSZLER, P. L. Infestation and Damage of Poultry House Insulation by the Lesser Mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). **Poultry Science**, v. 63, n. 6, p. 1094–1100, 1984.

VENTURA, L. Cedisa: evoluindo com a avicultura nacional. **A revista do Avisite**, p. 42, jul. 2017.

VIEIRA, G. Em busca de melhor qualidade. **Sindiavipar**, p. 32, 2017.

VITAL, T.; DROUVOT, H.; SAMPAIO, Y. Avicultura integrada e estratégias de mercado de grandes empresas em Pernambuco. **Revista Contemporânea de Economia e Gestão**, v. 7, n. 2, p. 29–40, 2009.

VITTORI, J. et al. *Alphitobius diaperinus* como veiculador de *Clostridium perfringens* em granjas avícolas do interior paulista – Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 894–896, 2007.

WOLF, J. et al. Métodos físicos e cal hidratada para manejo do cascudinho dos aviários. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 161–166, 2014.

WOLF, J. et al. Combined physical and chemical methods to control lesser mealworm

beetles under laboratory conditions. **Poultry Science**, v. 94, n. 6, p. 1145–1149, 2015.

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological contro. **Biocontrol Science and Technology**, v. 18, n. 9, p. 865–901, 2008.