MICAELE FEITOSA ARAUJO

COMPORTAMENTO AGRESSOR E SUSCETIBILIDADE A PESTICIDAS EM ABELHAS SEM FERRÃO E *Apis mellifera*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T
A663c
2017

Araujo, Micaele Feitosa, 1990-
Comportamento agressor e suscetibilidade a pesticidas em abelhas sem ferrão e *Apis mellifera* / Micaele Feitosa Araujo. – Viçosa, MG, 2017.
viii, 38f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eugênio Eduardo de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Abelhas sem ferrão. 2. *Apis mellifera. 3.* Competição (Biologia). I. Universidade Federal de Viçosa. Entomologia. Programa de Pós-graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22 ed. 595.799

MICAELE FEITOSA ARAUJO

COMPORTAMENTO AGRESSOR E SUSCETIBILIDADE A PESTICIDAS EM ABELHAS SEM FERRÃO E *Apis mellifera*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 3 de março de 2017.

Paulo Henrique Tschoeke

Weyder Cristiano Santana

Eugênio Eduardo de Oliveira
(Orientador)

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por te me dado o dom da vida e colocado pessoas tão especiais em minha caminhada!

A Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de cursar e me formar em Ciências Biológicas e ingressar no Programa de Pós-graduação em Entomologia e todas as oportunidades que já me foram ofertadas.

Aos meus pais, por toda dedicação e empenho durante toda minha vida. Muito obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

Meus amados irmãos, Elias por ser minha grande inspiração e por todo incentivo. Lidiane por todo apoio e torcida na minha formação e minha amada Anna, por sempre tornar meus dias mais doces e leves.

Meu amado João Vitor, obrigada por todo amor, carinho, respeito e compreensão durante toda essa fase que foi a UFV.

Aos parentes, aos amigos de Viçosa e Lafaiete, por todo incentivo e carinho.

As minhas amigas de republica, minha família em Viçosa, obrigada por toda amizade nos bons e maus momentos.

Aos colegas vizinhos de laboratório, por tornar a entomologia, o porão, os melhores lugares para se trabalhar.

Todos os funcionários do Apiário da UFV, pela ajuda nas coletas das abelhas e pelas ótimas conversas.

Ao professor Weyder, pelo auxílio e por aceitar compor minha banca de defesa.

Ao professor Paulo pela ajuda com o fornecimento de matérias e pelo aceite de participar da minha defesa.

Ao Professor Raul Guedes e aos membros do laboratório de Ecotoxicologia e ecofisiologia, pelo fornecimento do local, material e auxílio na elaboração dos experimentos toxicológicos.

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia e neurobiologia de invertebrados. Muito obrigada por todo conhecimentos e momentos de lazer compartilhados nesses dois anos que tive a oportunidade de conviver com vocês. Em especial a Gabryele, por ser a estagiaria mais dedica e amiga que eu poderia ter. Hígor/Wilson e Edmar, por toda ajuda com Lyx.

Ao meu coorientador Hudson, que desde a época da graduação vem compartilhando conhecimento e me auxiliando no meu crescimento profissional.

Ao meu orientador Eugênio, por te me auxiliado durante todo meu mestrado. Obrigada pelos conselhos e toda ajuda que muito acrescentou no meu crescimento pessoal e profissional. E agradeço, por ser mais que um orientador, ser um verdadeiro amigo!

Ninguém vence sozinho! Muito obrigada à todos!

Resumo

ARAUJO, Micaele Feitosa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2017. **Comportamento agressor e suscetibilidade a pesticidas em abelhas sem ferrão e *Apis mellifera*.** Orientador: Eugênio Eduardo de Oliveira. Coorientador: Hudson Vaner Ventura Tomé.

Existem várias evidências no meio ambiente que demonstram os benefícios e a extraordinária contribuição das abelhas para preservação da vida vegetal e manutenção da variabilidade genética. Apesar de sua importância, o número de perdas de indivíduos por colônia aumentou ao longo dos anos. Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de se avaliar o comportamento defensivo das duas espécies nativas *Scaptotrigona depilis* e *Partamona helle*ri com a espécie africanizada *Apis mellifera* e as susceptibilidade destas espécies a pesticidas (i.e., os inseticidas deltametrina e imidaclopride; os fungicidas clorotalonil, tiofanato metílico e a mistura entre eles – cerconil) usualmente aplicados na cultura do meloeiro. Para se estudar o comportamento de defensividade de *A. mellifera* e de *P. helleri*, dois sets de experimentos foram realizados. No primeiro deles, as abelhas sem ferrão não tinham a chance de escolher se ficariam em um ambiente livre do enfrentamento com *A. mellifera*. No segundo set de experimentação, as abelhas sem ferrão puderam optar pelo enfrentamento ou não. Nos experimentos sem chance de escolha, duas temperaturas (i.e., 28 ºC e 34ºC) de maneira a condicionar o enfrentamento nas temperaturas mais próximas que estes organismos enfrentariam em suas respectivas colônias. A mesma exposição foram feitas com *S.depilis* e *A.mellifera* e no bioensaio com chance de escape, a espécie africanizada foi a de maior proporção. No experimento de competição entre *P.helleri* e *A. melifera* sem chance de escolha, a espécie nativa apresentou uma alta mortalidade em ambas as temperaturas, já a abelha africanizada um grande sucesso em todos os tratamentos. Quando *P.helleri* foi exposta ao tratamento com chance de escape, na temperatura de 28°C, observou-se que ela mesmo tendo a possibilidade de evitar o combate com *A.mellifera,* ela o fez e assim ao final de cinco horas foram observados uma elevada mortalidada. Entre *S.depilis* e *A.mellifera*, as abelhas nativas apresentaram maior sobrevivência em todos os tratamentos analisados e *A.mellifera* uma alta mortalidade. Mesmo quando a espécies africanizadas estavam com maior densidade se manteve o expressivo número de mortos. Já os ensaios toxicológicos mostraram uma elevada mortalidade da abelha nativa *P.helleri* comparada com *A.mellifera* quando ambas foram expostas aos inseticidas deltametrina, imidaclopride e ao fungicida cerconil. Os resultados demonstraram que o cerconil apresenta uma toxicidade tão alta quanto o imidaclopride e cerca de 400 vezes mais tóxico do que a deltametrina para *A. mellifera*. No entanto, quando as abelhas foram expostas aos seus ingredientes ativos tiofanato metílico e clorotalonil , não foram observados níveis elevados de mortalidade em ambas as espécies. Quando o cerconil foi adicionado a caldas inseticidas contendo imidaclopride ou deltametrina, observou-se um aumento da ação inseticidas destes compostos. A mistura de imidaclopride com a formulação fungicida que contém ambos os ingredientes ati-

vos não-EBI (cerconil), a mortalidade de *A. mellifera* foi 1.589,8 vezes mais elevada do que a observada para o imidaclopride sozinho. Em *P. helleri* , misturas de fungicidas com imidaclopride também potencializou os efeitos deste em 197 vezes. Misturas de ambos os ingredientes dos fungicidas não-EBI (Cerconil) em conjunto com deltametrina, provocou um pequeno aumento na mortalidade de *A. mellifera*, mais 177 vezes de aumento em *P. helleri* comparado com deltametrina sozinho. Assim, *P. helleri* foi cerca de 4300,4 vezes mais susceptível do que *A. mellifera* à mistura de deltametrina e a formulação fungicida que contém ambos os ingredientes ativos não-EBI. Portanto, nesta dissertação fica demonstrado que a ação sinérgica de pesticidas oferece maiores riscos as abelhas nativas e sem ferrão do que a *A. mellifera*, o que coloca em cheque todos os estudos toxicológicos que consideram determinados produtos seguros para polinizadores simplesmente pelo fato de os mesmos serem pouco tóxicos a *A. mellifera.*

Abstract

ARAUJO, Micaele Feitosa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2017. **Behavior agressor and susceptibility to pesticides in stingless bees and Apis mellifera.** Adviser: Eugênio Eduardo de Oliveira. Co-Adviser: Hudson Vaner Ventura Tomé.

There are several evidences in environment that demonstrate the benefits and the extraordinary contribution of bees to preserve vegetable life and to maintain its genetic variability. Despite their importance, the numbers of losses of individuals per colony have increased through the years. Therefore, the aim of this work was to analyze the defensive behavior of two native species *Scaptotrigona depilis* and *Partamona helleri* with the Africanized *Apis mellifera* and the susceptibility of these species to pesticides (the insecticides deltamethrin and imidacloprid; the fungicides chlorothalonil, thiophanate-methy and the mixture of them – cerconil) commonly applied in melon culture. In order to study the defensive behavior of *A. mellifera* and *P. helleri* two sets of experiments were performed. In the first one, stingless bees did not have the chance to choose with they would stay in a free environment of confrontation with *A. mellifera*. In the second experiment stingless bees could opt to confront *A.mellifera* or not. In the experiments without chance of choice, two temperatures were used (i.e., 28 ºC e 34ºC) to ensure the confrontation of species in temperatures closer to the ones found in their colonies. The same exposition was applied to *S.depilis* and *A.mellifera* and in the bioassay with chance of scape the africanized specie was found in higher proportion. In the competition assay between *P.helleri* and *A. mellifera* without chance of choice, the native species presented a high mortality in both temperatures whereas the africanized bee has succeeded in all treatments. When *P.helleri* was exposed to the treatment with chance of scape at 28°C, it was observed a confrontation with *A.mellifera* even though this species had the possibility to avoid it and after 5 hours a high mortality was noticed. Between *S.depilis* and *A.mellifera*, the native species presented higher survival in all treatments and *A.mellifera* a high mortality. Interestingly, even when africanized species were in higher density the expressive number of dead remained. The toxicological assay showed an elevated mortality of the native bee *P.helleri* compared to *A.mellifera* when both were administrated with the insecticides deltamethrin, imidacloprid and the fungicide cerconil. The results demonstrated that cerconil presents a toxicity as high as imidacloprid and more than 400 times toxic than deltamethrin to *A. mellifera*. Neverthelles, when bees were exposed to the active ingredients - chlorothalonil, thiophanate-methy- increased levels of mortality were not observed in both species. When cerconil was added to deltamethrin or imidacloprid, an increased action of these insecticides was observed. The mixture of imidacloprid with fungicide formulation that contains both active ingredients no-EBI (cerconil), the mortality of *A. mellifera* was 1.589,8 times higher than that observed to imidacloprid alone. In *P. helleri*, the mixture of fungicides with imidacloprid potentialized its effects by 197 times. The mixture of both ingredients of fungicides no EBI (cerconil) in conjunct with deltamethrin caused a small increase in mortality of *A. melífera*, more than 177 times

in *P. helleri* compared to deltamethrin alone. Therefore, *P. helleri* was 4300,4 times more susceptible than *A. melífera* to the mixture of deltamethrin with the fungicide formulation containing both active ingredients no-EBI. Thus, in this work we demonstrated that the synergic action of pesticides offers more risks to native stingless bees than to *A. mellifera,* which in turn puts in check all toxicological studies that consider certain pollinator-safe products simply because they are poorly toxic to *A. mellifera.*

Sumário

Introdução geral **1**
Referência 2

Comportamento defensivo de abelhas nativas e de *Apis mellifera* **4**

Comportamento defensivo de abelhas nativas e de *Apis mellifera* **5**
Resumo 5
Abstract 5
1.1 Introdução 6
1.2 Material e Métodos 7
1.2.1 *Obtenção dos insetos* 7
1.2.2 *Bioensaio comportamento defensivo sem chance de fuga* 7
1.2.3 *Bioensaio comportamento defensivo com chance de fuga* 8
1.2.4 *Analises estatísticas* 8
1.3 *Resultados* 9
1.3.1 *Bioensaio sem chance de escolha* Apis mellifera *e* P.helleri 9
1.3.2 *Bioensaio sem chance de escolha* Apis mellifera *e* Scaptotriogna . . . 11
1.3.3 *Bioensaio com chance de escolha* 13
1.4 Discussão 14
1.5 Agradecimentos 16
1.6 Referências 16

Ações sinérgicas de pesticidas impõem maiores riscos a abelhas Neotropicais do que a *Apis mellifera* **19**
Resumo 20
Abstract 20
2.1 Introdução 21
2.2 Material e Métodos 23
2.2.1 *Bioensaio concentração mortalidade* 23
2.2.2 *Susceptibilidade apenas a inseticidas e fungicidas* 24
2.2.3 *Fungicidas não inibidores da biossíntese de ergosterol potencializam as ações inseticidas em* Apis mellifera *e* Partamona helleri 28
2.2.4 *Taxa respiratória e massa corporal* 30
2.2.5 *Analises estatísticas* 31
2.3 Discussão 32
2.4 Agradecimentos 34
2.5 Referências 34

Conclusões gerais **38**

Introdução geral

Estima-se que 90% das espécies de plantas que apresentam flores e 75% dos cultivos agrícolas no mundo necessitam da polinização, sendo as abelhas consideradas os polinizadores mais importantes (Brosi e Briggs, 2013; Gianinni et al., 2015). Tanto abelhas nativas, como as africanizadas apresentam muitos benefícios registrados, como a polinização de culturas de importância comercial e ecológica, levando a melhorias na economia agrícola mundial (Potts et al., 2010). Alguns registros já demonstram os benefícios da polinização promovida por estes indivíduos em diversas culturas, por exemplo, na cultura do meloeiro, sendo que na sua ausência não houve produção (Tschoeke et al., 2015; Malerbo-Souza et al., 2003). Apesar dos grandes benefícios trazidos por estes insetos, observa-se uma redução no número de colônias e de indivíduos, tornando a compreensão das causas subjacentes a esse declino vital (Garibaldi et al., 2016; Giannini et al.,2015).

Relatos já demonstram a possibilidade de uma associação direta entre a exposição das abelhas aos agroquímicos, a ocorrência do colapso das colônias (DCC) e o declínio dos polinizadores (Mullin et al., 2010). Uma das hipóteses ao surgimento da DCC é a intoxicação das abelhas por inseticidas, cada vez mais utilizados na agricultura (Souza, 2009). Estudos apontam que alguns desses compostos são prejudiciais para as abelhas, mesmo em níveis subletais (Johnson et al., 2010). Aparentemente as abelhas sem ferrão são mais sensíveis aos inseticidas do que as abelhas africanizadas, porém há pouca pesquisa realizada sobre este tema (Tomé et al., 2012 ; Van der Valk e Koomen, 2013; Arena & Sgolastra., 2014; Del Sarto et al ., 2014; Tomé et al., 2017).

Uma nova perspectiva que vem sendo analisada, quanto a sucesso das colônias e a capacidade de proteger ou defender a colônia de possíveis danos, o que é chamado de comportamento defensivo (Kastbergeret al., 2008). Este comportamento pode ser influenciado, por exemplo, pela temperatura, umidade e pressão atmosférica (Nogueira-

Couto e Couto, 2006). Sendo utilizado em sua maior parte para sua defesa, uma estrutura localizada no final do abdome em operárias e rainhas, o ferrão. Em contrapartida, as abelhas nativas sem ferrão, como próprio nome sugere, são incapazes de ferroar, pois o ferrão é vestigial (Michener, 2000). Porém, essas abelhas apresentam outras formas de se defenderem, assim tornando-se bem agressivas, por exemplo, podem morder, perseguem a ameaça, utilizam produtos químicos e feromônios de alarme (Van Zweden et al., 2011).

Possivelmente, muitos fatores estressantes atuam sozinhos ou em conjunto, enfraquecendo a colônia (Pereira, 2010). Portanto, o presente trabalho objetivou-se em compreender como alguns fatores estressantes podem interferir em perdas de indivíduos nas espécies de abelhas nativas *Partamona helleri* e *Scaptotrigona depilis* e a africanizada *Apis mellifera*. Realizando observações do comportamento defensivo destas abelhas e ensaios toxicológicos.

Referência

Arena M. and F. Sgolastra. 2014. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. Ecotoxicology. 23: 324-334

Brosi B. J. and H. M. Briggs 2013. Single pollinator species losses reduce floral fidelity and plant reproductive function. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110: 13044-13048.

Del Sarto M. C., E. E. Oliveira, R. N. C. Guedes and L. A. O. Campos. 2014. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciat*a and the honey bee *(Apis mellifera*). Apidologie. 45: 626-636.

Garibaldi L.A, Carvalheiro L.G, Leonhardt S.D, Aizen M.A, Blaauw B.R, Rufus I., Kuhlmann M., Kleijn D., Klein A. M., Kremen C., Morandin L., Scheper J., Winfree R. 2014. From research to action: enhancing crop yield through wild pollinators. Frontiers in ecology and the environment.10.1890/130330 **Garibaldi L.A,, Carvalheiro L.G**, **Vaissière B.E., Gemmill-Herren4 B., Hipólito J., Breno M. F. 2016.** Mutually beneficial pollinator diversity and crop yield outcomes in small and large farms. Science 10.1126/science.aac7287

Gianinni T. C., S. Boff, Garibaldi L. A. , Acosta A.L., Silva .J.L, Maia K.P., Saraiva A.M., Guimarães P.R., Kleinert A.M.P. 2015. Native and Non-Native Supergeneralist Bee Species Have Different Effects on Plant-Bee Networks. Plos one

Johnson, E.C., Kazgan, N., Bretz, C.A., Forsberg, L.J., Hector, C.E., Worthen, R.J., Onyenwoke, R., Brenman, J.E 2010. Social waves in giant honeybees repel hornets. Plos One, v.3, n.9

Kastberger, G.; Schmelzer, E.; Krannert. 2007. Deltamethrin-mediated toxicity and cytomorphological changes in the midgut and nervous system of the mayfly *Callibaetis radiatus*. PLoS One, 3: e0152383.

Klein A.M., Vaissière B.E., Cane J.H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen C., Tscharntke T . 2007.Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proceedings of the Royal Society B 274, 303–313.

Malerbo-Souza, D. T.; Nogueira-Couto, R. H.; Couto, L. A. & Souza, J. C. 2003. Atrativo para as abelhas Apis mellifera e polinização em café (Coffea arabica L.). Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science 40:272-278

Michener CD . 2000. The bees of the world. Johns Hopkins University Press, Baltimore

Mullin C.A , Frazier M., Frazier J.L, Ashcraft S., Simonds R., vanEngelsdorp D., Pettis J.S. 2010.High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. Plos one

Nogueira-Couto, R.H.; Couto, L.A. 2006. Apicultura e manejo. Pa3. ed. Jaboticabal: Funep, 2006.

Pereira, A.M. 2010. Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas. 125f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro

Potts, S.G. 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends in Ecology and Evolution, v.25, n.6, p.345-353.

Souza, T.F. Efeitos das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (Apis mellifera L.), por meio de análises morfológicas e comportamentais. 2009. 49f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

Tomé H. V. V., W. V. Barbosa, A. S. Corrêa, L. M. Gontijo, G. F. Martins and R. N. C. Guedes 2012. Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee Melipona quadrifasciata anthidioides. Plos One. 7: e38406.

Tomé H.V.V, Ramos G. S, Araújo M.F, Santana W.C, Santos G.R, Guedes R.N.C, Maciel C.D, L. Newland P.L and Oliveira E.E. 2017. Agrochemical synergism imposes higher risk to neotropical bees than to honeybees. Royal society open science.

Tschoeke, P.H., Oliveira, E.E., Dalcin, M.S., Silveira-Tschoeke, M.C.A.C., Santos, G.R. 2015. Diversity and flower-visiting rates of bee species as potential pollinators of melon (Cucumis melo L.) in the Brazilian Cerrado. Sci. Hortic. 186, 207–216. 594 doi:10.1016/j.scienta.2015.02.027

Comportamento defensivo de abelhas nativas e de *Apis mellifera*

Comportamento defensivo de abelhas nativas e de *Apis mellifera*

Resumo

O comportamento agressivo exercito por muitas espécies de abelhas é essencial para defesa de suas colônias, sendo este fortemente influenciado por diversos fatores ambientais. O presente trabalho, objetivou-se em investigar as diferenças no comportamento defensivo das abelhas nativas e africanizadas, em condições de laboratório, em diferentes temperaturas e densidades. Os resultados demostraram que entre *P.helleri* e *A.mellifera* com e sem chance de escolha em ambas as temperaturas, a espécie sem ferrão apresentou uma elevada mortalidade. Mesmo quando havia a possibilidade de não enfrentar, com chance de escolha, elas passaram para o outro lado e e morreram. Diferentemente do que foi encontrado entre as espécies *S.depilis* e *A.mellifera,* onde a abelha nativa apresentou uma grande sobrevivência em todos os tratamentos analisados e *A.mellifera*, uma elevada mortalidade. Os efeitos da temperatura, densidade e a competição interespecíficas são discutidos como possíveis causadores do resultados apresentados.

Palavras-chave: Agressividade, abelhas melíferas, competição interespecífica

Abstract

The aggressive behavior is commonly found in many species of bees as an essential mechanism to protect their colonies and this is influenced for several factors. The aim of the present work was to investigate whether changes in temperature along with the presence of different species of bees in diverse densities, would influence the defensive behavior of the three species analyzed in laboratorial conditions. The results demonstrated that between *P.helleri* and *A.mellifera* with or without chance of choice in both temperatures, the species without sturgeon presented elevated morta-

lity even for species in high densities. Differently of what was found between *S.depilis* e *A.mellifera*, where the native bee presented great survival in all treatments analyzed and *A.mellifera*, na elevated mortality. Together, the effects of temperature, density and interspecific competition were discussed as possible causes of the presented results.

Key words: Aggressiveness, honey bees, interspecific competition

1.1 Introdução

As abelhas são insetos eussociais que apresentam diversos comportamentos resultantes das interações entre seus membros e o meio ambiente (Collin R, 1991). Entre esses, o comportamento defensivo exercido pelas abelhas do gênero *Apis* representa uma defesa da colônia, contra potenciais saqueadores (Winston, 2003). Essa agressividade tem evoluído conjuntamente com a capacidade de atração das abelhas por recursos alimentares, em particular ao comportamento de forrageamento, e para se defender, defender o alimento estocado e proteger a colônia , a fim de minimizar perdas e despesas (Kastberger et al. 2008).

Muito fatores ambientais podem estar correlacionados com essa alta agressividade, por exemplo, temperatura, umidade e pressão atmosférica (Nogueira-Couto e Couto, 2006). Sendo utilizado em sua maior parte para sua defesa, uma estrutura localizada no final do abdome em operárias e rainhas, o ferrão. Em contrapartida, as abelhas nativas sem ferrão, como próprio nome sugere, são incapazes de ferroar, pois o ferrão é vestigial (Michener, 2000). Porém, essas abelhas apresentam outras formas de se defenderem, assim tornando-se bem agressivas, por exemplo, podem morder, perseguir a ameaça, utilizam produtos químicos e feromônios de alarme (Van Zweden et al 2011).

Outros fatores que vem sendo discutidos como possível causa da alta agressividade em abelhas, são as aminas biogênicas. Em insetos, o envolvimento de aminas biogênicas em comportamentos tão diversos como o aprendizado e a memória (Erber et al., 1993, Hammer e Menzel, 1998 e Schwaerzel et al., 2003), a regulação do estado reprodutivo (Bloch et al., 2000 e Sasaki E Nagao, 2001), locomoção (Schulz e Robinson, 2001), e a agressão (Stevenson et al., 2000 e Baier et al., 2002) é muito debatida. Vários estudos de comportamento defensivo em abelhas vem sendo realizados, estimulados em parte pela introdução da abelhas agressivas africanizadas (Paxton et al., 1994). A

maioria dos trabalhos sobre este tema tem-se centrado na influência dos fatores genéticos e ambientais sobre o comportamento defensivo destas (Cédric A et al., 2009). Porém existe uma escassez de maiores estudos em relação a múltiplos estressores sobre a defensividade em abelhas africanizadas e menos ainda em espécies nativas.

Mediante a isso, o objetivo deste trabalho foi investigar defensividade e a sobrevivência das abelhas africanizadas *Apis mellifera* e as espécies nativas sem ferrão *Partamona helleri* e *Scaptotrigona depilis* em diferentes densidades e temperaturas.

1.2 Material e Métodos

1.2.1 *Obtenção dos insetos*

Foram coletadas operárias adultas de três colônias de *A. mellifera* (abelha africanizada), *P. helleri* (abelha sem ferrão) e *Scaptotrigona depilis* (abelha sem ferrão). Essas abelhas são mantidas em caixas racionais no Apiário e Meliponário da Universidade Federal de Viçosa, 20º45'32,71" S, 42º 52' 04,10" O e altitude 815 m. Para a captura desses indivíduos utilizamos de frasco de vidro do tipo Erlenmeyer (1 L). Inserimos na entrada das colmeias para que as abelhas entrassem no frasco. Logo após a coleta, utilizamos CO_2, em baixa quantidade, para imobilizar esses insetos e assim evitar a fuga e facilitar a transferência das abelhas para os potes plásticos (0,5 L). Após esse processo, esses indivíduos foram expostos a diferentes ensaios, com o intuito de verificar a defensividade e a sobrevivência de cada espécie em diferentes condições.

1.2.2 *Bioensaio comportamento defensivo sem chance de fuga*

Para os ensaios de comportamento defensivo sem chance de fuga, ou seja, onde os indivíduos de duas espécies permaneciam ao longo de todo experimento no mesmo ambiente, utilizamos potes plásticos de 0.5L com tampa como unidade experimental. Uma espécie era mantida com quantidade inicial de 15 indivíduos enquanto que a outra espécie varia em 3, 6, 9, 12 ou 15 indivíduos. Da seguinte maneira : (Controle-15 *Apis* - 0 *Partamona*); (15 *Apis* - 3 *Partamona*); (15 *Apis* - 6 *Partamona*); (15 *Apis* - 9 *Partamona*); (15 *Apis* -12 *Partamona*); (15 *Apis* - 15 *Partamona*). No outro set de

experimentos, estes valores se invertiam. E o mesmo foi feito entre *Apis mellifera* e *Scaptotrigona depilis* .

Após a montagem, esses potes eram alocados em estufas do tipo BOD, com escuro total, umidade e temperaturas controladas. Como em ambiente natural, dentro das colônias as espécies com ferrão e as africanizadas apresentam diferentes temperaturas dentro do ninho, os experimentos foram realizados tanto em temperatura de 28°C e a 34°C. Colocados nessas temperaturas, para verificar se havia mudanças quanto a sobrevivência nestas diferentes temperaturas. As observações das mortalidades nos diferentes tratamentos foram feitas ao final de cinco horas.

1.2.3 *Bioensaio comportamento defensivo com chance de fuga*

Nesse ensaio, utilizamos dois potes de 0.5L , onde unimos as extremidades superiores de ambos e entre eles e na suas extremidades colocamos uma tela separando-os. Nesse bioensaio, diferente do supracitado, as abelhas sem ferrão eram colocados de um lado e a *A.mellifera* do outro. Porém nesse experimento, as espécie sem ferrão poderiam ultrapassar para o outro lado, mas as abelhas africanizadas não. A montagem ocorreu a partir das observações do primeiro experimento. Utilizamos os indivíduos que tiveram uma menor sobrevivência e os colocamos em maior proporção e na temperatura que seria o ideal, ou seja, a encontrada dentro de seu ninho.. Foram montados bioensaios com *A.mellifera* fixa em 15 insetos e variamos as densidades de *S.depilis* (0,3,15) na temperatura de 34°C e o mesmo entre *A.mellifera* (variando) e *P.helleri* (fixa) em 28°C. Após a montagem foram alocadas em BOD, com escuro total, umidade e temperaturas controladas e as observações da mortalidade foram feitas ao longo de cinco horas.

1.2.4 *Analises estatísticas*

Os resultados do bioensaio de competição sem chance de fuga, foram realizadas analises de variância ,uma vez que os pressupostos de normalidade e homogeneidade não foram satisfeitos (Sigmaplot v.12.5; Jose, CA, USA). Já os dados de competição com chance de escolha, foram submetidos a analise de variância com medidas repe-

tidas no tempo para determinar os efeitos do tempo, densidade e da interação entre estes. As diferenças foram avaliadas pelo teste de Wilks' lambda (Proc ANOVA; SAS Institute, 2008). Os gráficos foram elaborados utilizando o programa SigmaPlot 12.5.

1.3 *Resultados*

1.3.1 *Bioensaio sem chance de escolha* Apis mellifera *e* P.helleri

A analise de variância para o bioensaio de competição entre *A.mellifera* e *P.helleri* a 28°C não demonstraram efeito da espécie variante ($F_{(1,1)}$=0.2; P=0,65), porém apresentou efeito na espécie avaliada ($F_{(1,1)}$= 53.5; P<0,001) e na proporção ($F_{(1,1)}$=66.1; P<0.0001). Já as interações espécie variante e espécie avaliada ($F_{(1,1)}$=5.3; P=0.0245), espécie avaliada e proporção ($F_{(1,1)}$=31.2; P<0,0001) apresentaram efeitos. Mas já as interações espécie variante e proporção ($F_{(1,1)}$=0.9; P=0,36), espécie variante, espécia avaliada e proporção ($F_{(1,1)}$=0.01; P=0,95) não tiveram efeitos (Figura 1.1 e Tabela 1.1).

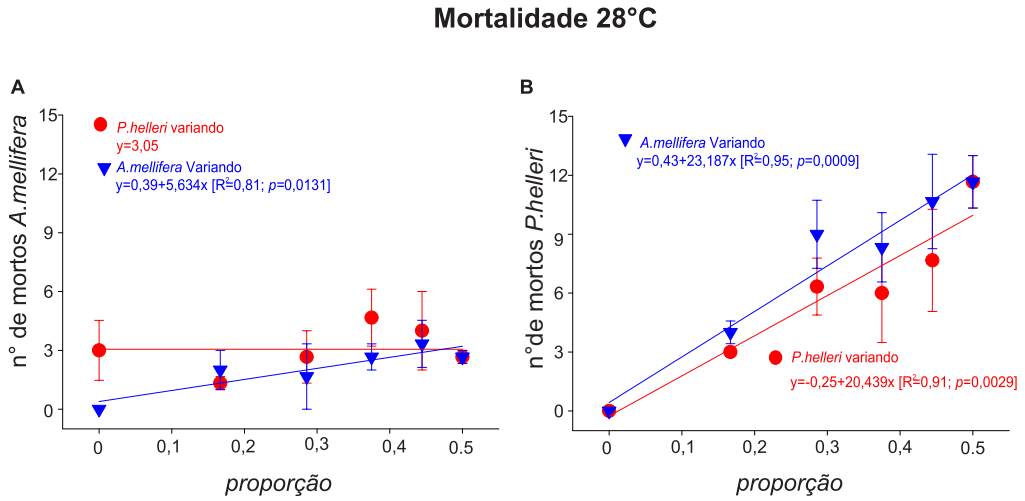

Figura 1.1: Competição *A.mellifera* x *P.helleri* 28°C- Mortalidade de *A.mellifera* (A). Mortalidade de *P.helleri (B)* . Símbolos representam as espécies variantes em cada bioensaio. As proporções de cada espécies variante (eixo x) e mortalidade observada (eixo y). As barras verticais representam o erro padrão da média.

Tabela 1.1: Análise de variância da mortalidade na competição entre *A.mellifera x P.helleri* 28°C e 34°C sem chance de fuga.

Fontes de variação	df	Competição *A. mellifera* vs *P. helleri*			
		28°C		*34°C*	
		F	*P*	F	*P*
Modelo	7	22.46	<0.0001	48.1	<0.0001
Erro	64	-	-	-	-
Esp.Variante (EV)	1	0.2	0.65	5.7	0.0199*
Esp.Avaliada (EA)	1	53.5	<0.0001*	243.3	<0.0001*
Proporção (P)	1	66.1	<0.0001*	41.7	<0.0001*
EV x EA	1	5.3	0.0245*	4.9	0.0311*
EV x P	1	0.9	0.36	0.1	0.72
EA x P	1	31.2	<0.0001*	40.4	<0.0001*
EA x EV x P	1	0.01	0.95	0.1	0.77

No bioensaio entre os mesmos indivíduos, agora em 34°C as analises de variância apresentaram efeito para a espécie variante ($F_{(1,1)}$=5.7; *P*= 0.0199), espécie avaliada ($F_{(1,1)}$=243,3; *P*<0,0001), proporção ($F_{(1,1)}$=41.7; *P*<0.0001) e nas interações espécie variante e espécie avaliada ($F_{(1,1)}$=4.9; *P*= 0.0311) e espécie avaliada e proporção ($F_{(1,1)}$=40.4; *P*<0.0001). Mas não houve efeito entre espécie variante e proporção ($F_{(1,1)}$=0.1; *P*= 0.72), e especie variante, espécie avaliada e proporção ($F_{(1,1)}$=0.1; *P*= 0,77) (Figura 1.2 e Tabela1.1).

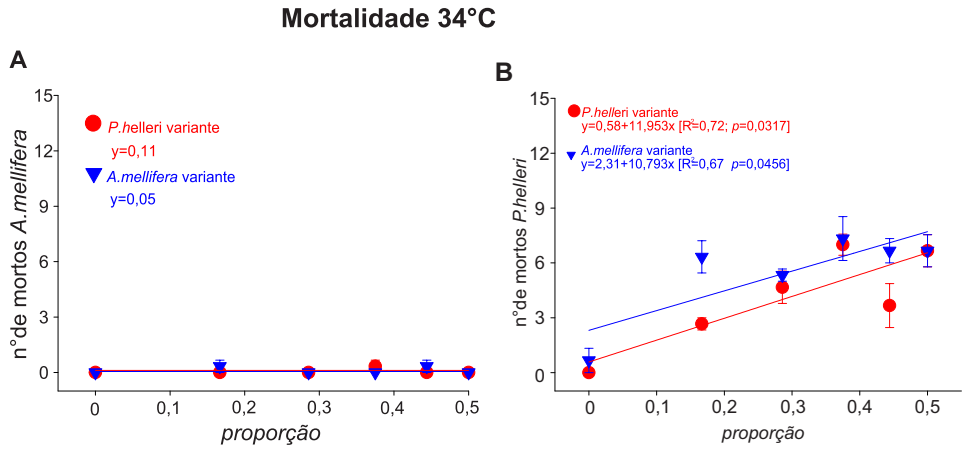

Figura 1.2: Competição *A.mellifera* x *P.helleri* 34°C- Mortalidade de *A.mellifera* (A). Mortalidade de *P.helleri (B)*. Símbolos representam as espécies variantes em cada bioensaio. As proporções das espécies (eixo x) e mortalidade observada (eixo y). As barras verticais representam o erro padrão da média.

1.3.2 *Bioensaio sem chance de escolha* Apis mellifera *e* Scaptotriogna

Os dados do bioensaio entre *A. mellifera* e *Scaptotriogona* a 28°C as analises de variância não apresentaram efeito para a espécie variante ($F_{(1,1)}$=0.01; *P*=0.99), e nem nas interações espécie variante e espécie avaliada ($F_{(1,1)}$=4.9; *P*= 0.0311), espécie variante e proporção ($F_{(1,1)}$=0.01; *P*= 0.98) , espécie avaliada e proporção ($F_{(1,1)}$=2.6; *P*= 0,12) e e especie variante, espécie avaliada e proporção ($F_{(1,1)}$=0.18; *P*=0,67). Apresentando efeito somente espécie avaliada ($F_{(1,1)}$=5.4; *P*= 0.0240), proporção ($F_{(1,1)}$=12.8; *P*=0,0007) espécie avaliada (Figura 1.3 e Tabela 1.2).

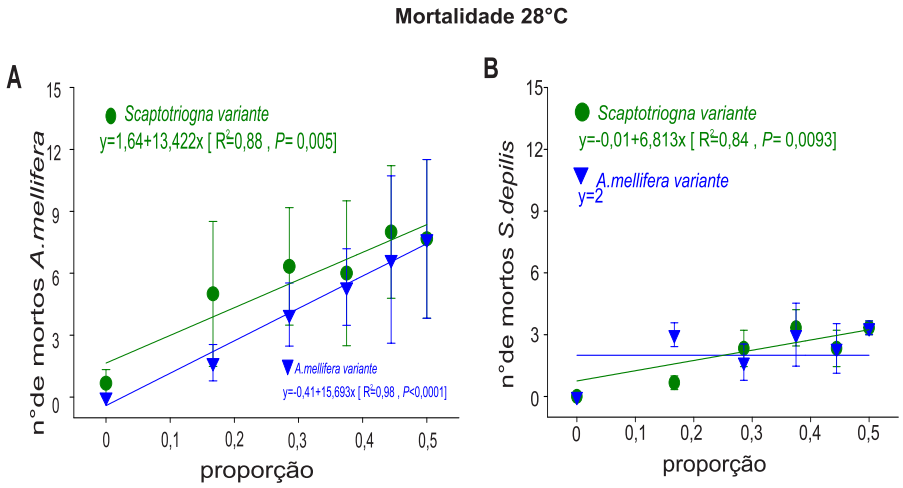

Figura 1.3: Mortalidade observada entre *A.mellifera* x *S.depilis* sem chance de fuga 28°C- (A). Mortalidade de *S.depilis (B)* . Símbolos representam as espécies variantes em cada bioensaio. As proporções das espécies (eixo x) e mortalidade observada (eixo y). As barras verticais representam o erro padrão da média.

Tabela 1.2: Analise de variância na competição entre *A.mellifera* e *Scaptotriogona* em 28°C e 34°C. Os asteriscos (*) representam os resultados com nível de significância P>0.05.

Fontes de variação	df	Competição *A. mellifera* vs *Scaptotriogona*			
		28°C		*34°C*	
		F	*P*	F	*P*
Modelo	7	3.3	0.0048	34	<0.0001
Erro	64	-	-	-	-
Esp.Variante (EV)	1	0.01	0.99	3.3	0.07
Esp.Avaliada (EA)	1	5.4	0.0240*	92.6	<0.0001*
Proporção (P)	1	12.8	0.0007*	101.8	<0.0001*
EV x EA	1	2.1	0.15	2.9	0.10
EV x P	1	0.01	0.98	0.02	0.89
EA x P	1	2.6	0.12	36.1	<0.0001*
EA x EV x P	1	0.18	0.67	1.7	0.23

Já na temperatura de 34°C, as analises mostraram que não há efeito para a espécie variante ($F_{(1,1)}$=3.3; *P*=0.07), e nem nas interações espécie variante e espécie avaliada ($F_{(1,1)}$=2.9; *P*=0.10), espécie variante e proporção ($F_{(1,1)}$=0.02; *P*=0.89) , e especie variante, espécie avaliada e proporção ($F_{(1,1)}$=1.7; *P*=0,67). Somente espécie avaliada ($F_{(1,1)}$=92.6; *P*<0.0001), proporção ($F_{(1,1)}$=101.81; *P*<0,0001) e na interação avaliada espécie avaliada e proporção ($F_{(1,1)}$=36.1; *P*<0.0001) houve efeito (Figura1.4 e Tabela1.2).

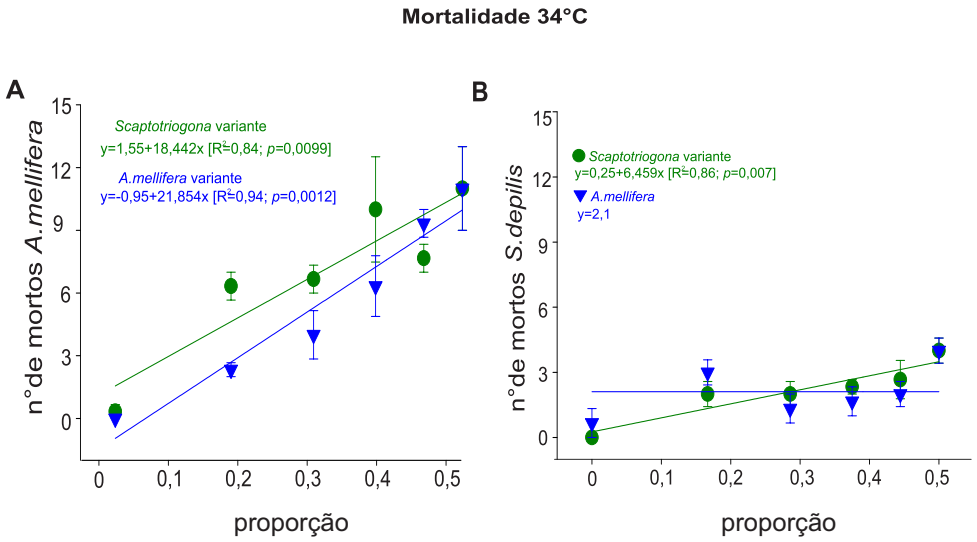

Figura 1.4: Mortalidade observada entre *A.mellifera* x *Scaptotrigona* sem chance de fuga 34°C- Mortalidade de *A.mellifera* (A). Mortalidade de *Scaptotrigona (B)* . Símbolos representam as espécies variantes em cada bioensaio. As proporções das espécies (eixo x) e mortalidade observada (eixo y). As barras verticais representam o erro padrão da média.

1.3.3 *Bioensaio com chance de escolha*

A análise de variância com medidas repetidas no tempo mostrou efeito do tempo para a competição entre *A.mellifera* e *P.helleri* a 28°C ($F_{(3,4)}$=85.6; *P*=0,0020), densidade ($F_{(2,2)}$ = 29.3; *P*=0,0008), e interação entre tempo e densidade ($F_{6,8)}$ = 11.5; *P*= 0,0040) ao longo das 5 horas de avaliação (Figura 1.5 e Tabela1.3).

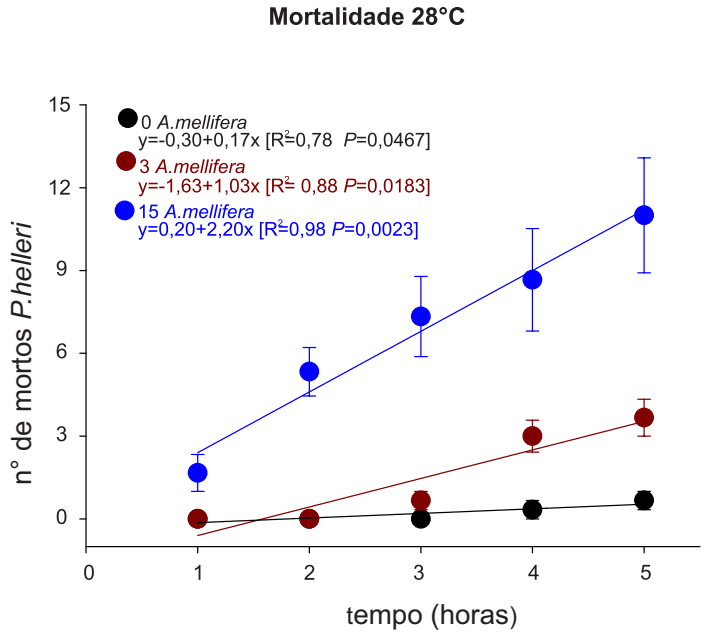

Figura 1.5: Mortalidade observada ao longo de 5 horas de *P.helleri* na competição com chance de fuga com *A.mellifera* 28°C- Mortalidade de *P.helleri* quando estão presentes 3 diferentes densidades *de A.mellifera* . Símbolos representam a espécie variante no bioensaio. O tempo de analise (eixo x) e mortalidade observada (eixo y). As barras verticais representam o erro padrão da média.

Tabela 1.3: Análise de variância com medidas repetidas no tempo para a analise da mortalidade na competição entre *A.mellifera x P.helleri* (28°C) e *A.mellifera* e *Scaptotriogona* 34°C durante 5 horas com chance de escape .

Entre densidades		*A.mellifera* x *P.helleri* 28°C			*A.mellifera* x *Scaptotrigona* 34°C		
	GL	F	*P*		F	*P*	
Densidade (D)	2	29.3	0,0008*		28.2	0,0009*	
Erro	6	-	-		-		
Entre amostras	df_{den}/df_{num}	Wilks' lambda	F_{aprox}	*P*	Wilks' lambda	F_{aprox}	*P*
Tempo (T)	3/4	0.0087	85.6	0.0020*	0.1315	8.8	0.0310*
T x D	6/8	0.0037	11.5	0.0040*	0.1686	1.9	0.19

Já entre *A.mellifera* e *Scaptotriogona* a 34°C, houve efeito da densidade ($F_{(2,2)}$=28.2; *P*=0.0009) e do tempo ($F_{(3,4)}$=8.8; *P*=0.0310), mas não efeito na interação tempo densidade ($F_{(6,8)}$=1.9; *P*=0,19).

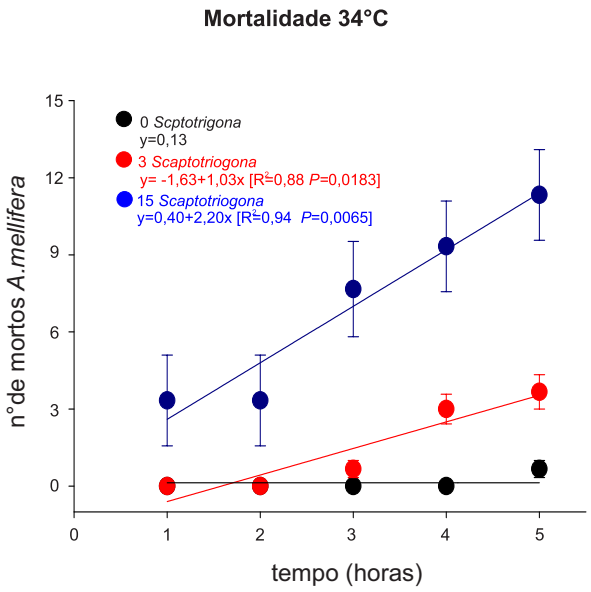

Figura 1.6: Mortalidade observada ao longo de 5 horas de *A.mellifera* na competição com chance de fuga com *Scaptotriogna* 34°C- Mortalidade de *A.mellifera* quando estão presentes 3 diferentes densidades de *Scaptotrigona.* Símbolos representam a espécie variante no bioensaio. O tempo de analise (eixo x) e número de mortos de *A.mellifera* observada (eixo y). As barras verticais representam o erro padrão da média.

1.4 Discussão

Fatores genéticos são fortemente apontados como um dos grandes causadores da elevada agressividade ou defensividade em abelhas, porém, diversos fatores externos podem influenciar significativamente neste comportamento, como movimentação nas proximidades da colmeia; fatores climáticos; idade da operária e estado fisiológico das abelhas (Couto e Couto, 2002). Aqui encontramos fortes indícios que a competição interespecífica, temperatura, proporção, densidades e tempo, são fortes influenciadores na defensividade, logo na sobrevivência dessas espécies. Haja visto que espécies da tribo Meliponini são bastante territorialistas e agressivas (Hubbell e Johnson, 1978).

Os resultados do bioensaio entre *A.mellifera* e *P.helleri* demonstraram efeitos da competição interespecífica, onde com e sem chance de escolha em ambas as temperaturas, a espécie sem ferrão apresentou uma elevada mortalidade. Mesmo quando essas eram as espécies de maior densidade. Diferentemente do que foi encontrado entre as espécies *S.depilis* e *A.mellifera*, onde a abelha nativa apresentou uma grande sobrevivência

em todos os tratamentos analisados**.**

A competição entre *A. mellifera* e abelhas nativas é um assunto geralmente caracterizado como prejudicial para os ecossistemas pelo fato de que esta espécie poderia diminuir a oferta de alimento para os polinizadores locais e isso prejudicaria a estabilidade de suas populações (Roubik, 1988; Wolda, 2001; Paini; Roberts, 2005). Porém, observa-se uma coexistência em ambiente de ambas, possivelmente devido à especialização de cada grupo a um tipo de fonte diferente, ou ainda pela capacidade de mudar seu horário de forrageamento, coletando alimento em horários diferentes do que as espécies dominantes ou se contentar em coletar o resto do recurso que as outras abelhas rejeitaram (Biesmeijer e Slaa, 2004; Hrncir e Maia-Silva, 2013). A literatura aponta que em *A. mellifera*, apresenta a capacidade de forragear em temperaturas mais baixas do que a maioria dos meliponíneos, o que a garante acesso às flores mais cedo do que as abelhas de pequeno e médio porte (Bruijin; Sommeijer, 1997; Ferreira e Absy, 2015).)

Os dados dos bioensaio reafirmaram a influencia da temperatura sobre as abelhas, sendo um fator determinante para que as abelhas exerçam suas funções normalmente (Almeida, 2004). Nos ensaios, a mortalidade de *P.helleri* apresentou acréscimo em 34°C em comparação com 28°C e já *A.mellifera* em incremento com a competição interespecífica, houve uma maior mortalidade em 28°C , com as duas espécies de abelha sem ferrão. Estudos mostram que baixas temperaturas diminuem o metabolismo dos insetos, já em altas as abelhas diminuam as atividades externas e iniciam o comportamento de ventilação da colônia para manutenção e equilíbrio da colonial (Teixeira e Campos, 2005). Porém a especie *S.depilis*, não apresentou sofre grandes impactos com a temperatura. Relatos já apontam que em temperaturas elevadas não apresentam malefícios para está espécie, pelo contrário, os indivíduos apresentaram um desenvolvimento mais acelerado, saudável e com uma taxa de mortalidade relativamente baixa (Vollet et al.; 2010). As resposta a diferentes padrões de respostas térmicas de uma espécie de abelhas não pode ser generalizado para outra , uma vez que há uma grande variedade de comportamentos em respostas a essas mudanças (Loli, 2008).

Outro resultado interessante observado no estudo, foi que *P.helleri* mesmo tento a possibilidade de não confrontar *A.mellifera,* ela o fez. Alguns insetos sociais apresentam como forma de defesa da colônia o autossacrifício dos indivíduos (Shorter e Ru-

eppell, 2012). Tento em vista que em seus ninhos encontram-se não só descendência (ninhada), mas também os indivíduos reprodutores, estoque de alimentos e o material de nidificação, enquanto o próprio ninho é muitas vezes um recurso valioso (Seeley, 1985 , Roubik, 2006).

Muitos são os fatores que causam efeitos no comportamento defensivo das abelhas, seja isolados ou em conjunto. Certamente, o quadro atual com relação ao desaparecimento das abelhas nativas está relacionado com ações antrópicas e com as interações com as abelhas africanizadas, mas muitas analises a longo prazo ainda precisam ser feitas (Goulson, 2003; 6 Paini, 2004). Analises como dos possíveis efeitos subletais de pesticidas em conjunto com fatores ambientais sobre a defensividade de abelhas, se fazem de suma importância, visto o acréscimo no uso em agroecossistemas. O presente estudo, sugere que a competição entre abelhas nativas e africanizadas são fortemente afetado, e que a competição interespecífica tem papel fundamental nesses resultados.

1.5 Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

1.6 Referências

Almeida, Gesline Fernandes de. 2008. Fatores que interferem no comportamento enxameatório de abelhas africanizadas. Tese de Doutorado. FFCLRP-USP. Ribeirão Preto-SP.Brasil. 120p.

Baier, A., Wittek, B., Brembs, B. 2002. Drosophila as a new model organism for the neurobiology of aggression? J. Exp. Biol. 205(9): 1233--1240.

Biesmeijer, J. C; Slaa LAA, E. J. 2004 Information flow and organization of stingless bee foraging. Apidologie. 2004. 35:143–157.

Bloch, M., Schmidt, P. J., Danaceau, M., Murphy, J., Nieman, L., & Rubinow, D. R. 2000. Effects of gonadal steroids in women with a history of postpartum depression. American Journal of Psychiatry, 157, 924-930. **Bruijn, L.L.M. DE & M.J. Sommeijer.**

1997. Colony foraging in different species of stingless bees (Apidae, Meliponinae) and the regulation of individual nectar foraging. Insectes sociaux, Paris, 44: 35-47. **Cédric Alauxa,; Saurabh Sinhac,Sandra Rodriguez-Zasa,j,k and Gene E. Robinson.**

2009. Honey bee aggression supports a link between gene regulation and behavioral evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences PNAS. **Couto, R.H.N.;**

Couto, L.A. Apicultura: manejo e produtos. Jaboticabal: FUNEP, p.191, 2002.

Ferreira, M. G.; Absy, M. L. 2015.Pollen niche and trophic interactions between colonies of Melipona (Michmelia) seminigra merrillae and Melipona (Melikerria) interrupta (Apidae: Meliponini) reared in floodplains in the Central Amazon. Arthropod-Plant Interactions. 9: 263 – 279. **Hammer M., Menzel R.1998.** Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. Learn. Mem. 5, 146–156

Hubbell, S. P.; Johnson, L. K. Comparative foraging behavior of six stingless bee species exploiting a standardized resource. Ecology. 1978. 59: 1123–1136 **Hrncir, M.;**

Maia-Silva, C. 2013. The fast versus the furious – On competition, morphological foraging traits, and foraging strategies in stingless bees

Kastberger, G.; Schmelzer, E.; Kranner, I 2008. Social waves in giant honeybees repel hornets. Journal Pone. Austrália, v.3, p. 1-16.

Michener CD.2000 .The bees of the world. Johns Hopkins University Press, Baltimore

Nogueira -Couto, R.H.; Couto, L.A.2006. Apicultura: manejo e produtos. 3. ed. Jaboticabal: Funep.

Paini, D.R.; Roberts, Dale. 2005.Commercial honey bees (Apis mellifera) reduce the fecundity of an Australian native bee (Hylaeus alcyoneus). In: Biological Conservation, Vol. 123, No. 1, p. 103-112

Paxton, R.J., Sakamoto, C.H. and Rugiga, F.C.N. 1994. Modification of honey bee (Apis mellifera L.) stinging behaviour by within-colony environment and age. Journal of Apicultural Research, 33, 75-82.

Roubik, DW, Sakai S, Gattesco. 2003. Canopy flowers and certainty: loose niches revisited. In Basset Y., et al. editors. Tropical forest arthropods. Cambridge Univ. Press; p. 360-368.Schulz **Robinson GE. 2001**. Octopamine influences division of labor

in honey bee colonies .J Comp Physiol A. 187(1):53-61.

Schwaerzel M., Monastirioti M., Scholz H., Friggi-Grelin F., Birman S., Heisenberg M. 2003. Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in Drosophila. J. Neurosci. 23, 10495–10502 **Stevenson, D.**

S. 2000. Future estimates of tropospheric ozone radiative forcing and methane turnover—The impact of climate change, Geophys. Res. Lett., 27, 2073 – 2076. **Van**

Zweden J. S., d'Ettorre P. 2011. "Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons," in Insect Hydrocarbons, eds Blomquist G. J., Bagneres A. G., editors. (Cambridge: Cambridge University Press;), 222–243

Wolda, H . 2001. Do competing honey bees matter? Dynamics and abundance of native bees before and after honey bee invasion. Population Ecology 43 (1): 53-62.

Winston, M.L. A biologia da abelha. 2003 (Tradução de Carlos. A. Osowski), Porto alegre : Magister, 276 p.

Ações sinérgicas de pesticidas impõem maiores riscos a abelhas Neotropicais do que a *Apis mellifera*

[1]

[1] Artigo publicado: Tomé H.V.V, Ramos G. S, **Araujo M.F**, Santana W.C, Santos G.R, Guedes R.N.C, Maciel C.D, L. Newland P.L and Oliveira E.E**.** (2017) Agrochemical synergism imposes higher risk to neotropical bees than to honeybees. Royal society open science.10.1098/rsos.160866

Ações sinérgicas de pesticidas impõem maiores riscos a abelhas Neotropicais do que a *Apis mellifera*

Resumo

As abelhas são polinizadores chave cujo número de indivíduos tem diminuído, em parte, devido aos efeitos de diferentes estressores tais como inseticidas e fungicidas. Analisamos a susceptibilidade da abelha africanizada, *Apis mellifera*, e a abelha sem ferrão, *Partamona helleri*, a formulações comerciais dos inseticidas deltametrina e imidaclopride. A toxicidade de fungicidas à base de tiofanato-metilico e clorotalonil foram investigados individualmente e em combinação, com os inseticidas. Os resultados mostraram que as abelhas sem ferrão eram mais susceptíveis aos inseticidas do que as abelhas africanizadas. Os fungicidas comerciais tiofanato metilico ou clorotalonil causaram baixa mortalidade, independentemente da concentração. Sua combinação foi tão tóxica quanto o imidaclopride para para ambas espécies, e mais de 400 vezes mais tóxico do que a deltametrina para *A. mellifera.* Houve efeitos altamente sinergéticos na mortalidade causada por interações na mistura de imidaclopride e os fungicidas tiofanato-metilico, clorotalonil e combinada de fungicida em *A. mellifera* e *P. helleri*. Em contraste, misturas de deltametrina e a formulação combinada de fungicida induziu alta sinergia em *P. helleri*, mas teve pouco efeito sobre a mortalidade de *A. mellifera*. As diferenças na fisiologia e nos modos de ação dos agroquímicos são discutidas com fatores subjacentes às diferenças na suscetibilidade aos agroquímicos.

Palavras-chave: Estressores, impactos de pesticidas, abelha do mel, abelha sem ferrão, polinizadores

Abstract

Bees are key pollinators whose population numbers are declining, in part, owing to the effects of different stressors such as insecticides and fungicides. We have analysed the susceptibility of the africanized honeybee, *Apis mellifera,* and the stingless bee, *Partamona helleri*, to commercial formulations of the insecticides deltamethrin and imidacloprid. The toxicity of fungicides based on thiophanate-methyl and chlorothalonil

were investigated individually and in combination, and with the insecticides. Results showed that stingless bees were more susceptible to insecticides than honeybees. The commercial *b*iensaio de respirometria e Massa Corporal fungicides thiophanate-methyl or chlorothalonil caused low mortality, regardless of concentration, however their combination was as toxic as imidacloprid to both species, and over 400-fold more toxic than deltamethrin for *A. mellifera*. There were highly synergistic effects on mortality caused by interactions in the mixture of imidacloprid and the fungicides thiophanate-methyl, chlorothalonil and the combined fungicide formulation in *A. mellifera*, and also to a lesser extent in *P. helleri.* By contrast, mixtures of the deltamethrin and the combined fungicide formulation induced high synergy in *P. helleri,* but had little effect on the mortality of *A. mellifera.* Differences in physiology and modes of action of agrochemicals are discussed as key factors underlying the differences in susceptibility to agrochemicals.

Key words: Stressors, pesticide impacts, honey bee, stingless bee, pollinators.

2.1 Introdução

As abelhas são polinizadores chaves que fornecem serviços ecossistêmicos a plantas selvagens e economicamente cultivadas em regiões temperadas e tropicais ao redor do planeta (Heard, 1999; Klein et al 2007; Vil zlalobos, 2016). No entanto, os números populacionais tem diminuído devido a múltiplos estressores que incluem a fragmentação de habitats, patógenos, parasitas, deficiência nutricional e pesticidas (Potts et al., 2010; Vanbergen et al., 2013; Villalobos, 2016). Estudos recentes demonstraram que os pesticidas isolados ou em combinação com outros estressores, contribuem para as perdas de colônias (Blacquiere et al., 2012, Di Prisco et al., 2013, Goulson et al., 2015) e é o impacto de múltiplos estressores simultâneos que tem sido indicado como um dos maiores efeitos sobre as abelhas. Inseticidas, tais como piretróides e neonicotinóides sistêmicos, têm sido amplamente estudados em abelhas nativas e europeias (Thompson, 2012; Blumenberg, 2012), herbicidas, fungicidas e fertilizantes foliares em outros polinizadores ou outras espécies de abelhas que ocupam regiões neotropicais, como as abelhas africanizadas e as sem ferrão (Barbosa et al., 2016, Lima e outros, 2016) , ainda não foram determinadas.

Agroquímicos pulverizados em muitas culturas controladas são uma ameaça im-

portante para a sobrevivência das abelhas, e uma ampla gama de compostos e seus metabólitos foram identificados dentro de colônias (Van Engelsdorp et al., 2009; Mullin et al., 2010). Embora não haja evidência de que um produto químico seja o único responsável pelas perdas de colônias, a combinação de resíduos de pesticidas podem ser prejudiciaias as abelhas. Inseticidas e fungicidas que são utilizados em ambientes agrícolas, principalmente durante a época de floração, podem afetar diretamente as abelhas forrageiras e contaminar o pólen e o néctar trazidos para as colônias (Chauzat et al., 2006; Van Engelsdorp et al., 2009).

Embora os fungicidas sejam considerados seguros para as abelhas, as interações sinérgicas entre ingredientes ativos ou adjuvantes integrados nas suas formulações podem aumentar os riscos para os polinizadores, especialmente quando os agricultores utilizam rotineiramente misturas de tanques de inseticidas e fungicidas nas culturas para reduzir os custos de pulverização associados ao manejo de pragas (Ma et al., 2016). Nas interações sinérgicas, a atividade biológica de uma mistura é maior do que a soma das respostas individuais esperadas para cada produto químico (Cedergreen, 2014). Apesar da escassez de estudos enfocando a sinergia entre os agroquímicos e os pesticidas em particular, nos polinizadores em geral, as misturas de inseticidas e fungicidas para a inibição da biossíntese de ergosterol (EBI) demonstraram levar a uma maior toxicidade nas abelhas (Pilling e Jepson, 1993; et al., 1995, Vandame e Belzunces, 1998, Iwasa et al., 2004, Thompson, 2012, Sgolatra et al., 2016).

A susceptibilidade das abelhas africanizadas, *Apis mellifera* e das espécies de abelhas sem ferrão *Partamona helleri*, expostas a formulações comerciais de inseticidas (por exemplo, deltametrina e imidaclopride) e fungicidas não-EBI (por exemplo, tiofanato-metilico e clorotalonil), comumente usados em campos de produção de melão em regiões neotropicais. Demonstramos que os efeitos sinérgicos dos agroquímicos representam um risco maior para *P. helleri* comparado com *A. mellifera.* As diferenças nas toxicidades entre estas espécies de abelhas são discutidas de acordo com as suas características fisiológicas.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 *Bioensaio concentração mortalidade*

Os bioensaios de concentração-mortalidade foram realizados por exposição oral de abelhas forrageiras de cada espécie a diferentes concentrações de inseticidas sozinhos ou misturados com fungicidas. Foram utilizadas cinco a sete concentrações de cada pesticida para estimar curvas de concentração mortalidade. Os pesticidas foram diluídos em solução de xarope à base de mel (50%, v / v) e oferecidos às abelhas em tubos Eppendorf de 2 ml inseridos em recipientes de plástico de baixa densidade (250 ml). Cada recipiente de plástico foi utilizado como uma unidade experimental contendo 20 abelhas forrageiras alimentadas com 1 ml de solução de mel contaminada com pesticida (exceto para abelhas não tratadas, ou seja, controle). As abelhas ficaram com restrição alimentar 1 h antes de permitir o acesso à dieta contaminada com pesticida. Após 5 h de exposição oral aos pesticidas, as abelhas receberam uma dieta isenta de inseticidas *ad libitum* e a mortalidade foi registada 24 h após a substituição da dieta. As abelhas foram consideradas mortas se incapaz de se mover quando pinçadas. Cada repetição consistia num recipiente de plástico contendo abelhas forrageiras da mesma colônia e três a seis colônias diferentes foram utilizadas nos bioensaios para explicar a variação entre colônias em resposta.

A massa corporal e as taxas de respiração de forrageiras de *A. mellifera* e *P. helleri* foram medidas para verificar se suas diferenças na suscetibilidade aos pesticidas se refletiam em tais respostas de estresse potencialmente associadas (em geral). As abelhas foram mantidas durante 1 hora de jejum antes da pesagem para evitar variações de peso devido à alimentação anterior. Foram pesadas vinte abelhas não expostas de cada espécie (isto é, quatro por colônia) em uma balança analítica eletrônica (modelo XS3DU, Mettler Toledo, Columbus, OH, EUA) e outras 20 abelhas foram utilizadas para bioensaios de respirometria. A produção de CO_2 foi registrada utilizando um respirômetro TR3C equipado com um analisador de CO_2 (Sable Systems International, Las Vegas, NV, EUA). Cada abelha forrageira foi mantida individualmente em câmaras de vidro de 25 ml em um sistema completamente fechado. A produção de CO_2 (μl CO_2 / h / abelha) foi determinada após um período de 2h por injeção de ar livre de CO_2 na câmara durante 2 min a um caudal de 600 ml / min. Uma corrente de

ar dirigia o CO_2 produzido pelas abelhas para um leitor de infravermelhos ligado ao sistema. A produção de CO_2também foi determinada numa câmara de controle sem um inseto. Foram analisadas 20 abelhas de cada espécie (isto é, quatro por colônia) não expostas a inseticida ou fungicida.

2.2.2 *Susceptibilidade apenas a inseticidas e fungicidas*

Foram determinados os efeitos da concentração de inseticida na mortalidade para ambas *P. helleri* e *A. mellifera* para imidaclopride e deltametrina (Tabela 1 e figura 2.1). Embora baseando nossas estimativas na concentração, em vez de na dosagem, também foram avaliadas as respectivas doses (em ng de ingrediente ativo por abelha $^{-1}$) e proporcionar-lhes na tabela 2 como uma referência geral para a extrapolação. Essas estimativas foram baseadas no consumo de alimentos por cada espécie de abelha, obtida pela pesagem dos alimentadores antes e após 5 h de exposição à dieta. A média do consumo foi de 0,026 l para *A. mellifera* e 0,016 l para *P. helleri* .

Com o aumento das concentrações de imidaclopride (de 0,4 para 8,0 x 10^5 μg ia ml^{-1}) a mortalidade aumentou em ambas *P. helleri* e *A. mellifera* , de menos do que 10% para 100%. A CL_{50} para *P. helleri* foi 573,3μg i.a ml^{-1}, enquanto para *A. mellifera* foi 240,1μg i.a ml $^{-1}$. Com base nas medidas obtidas a partir das CL_{50} desses bioensaios

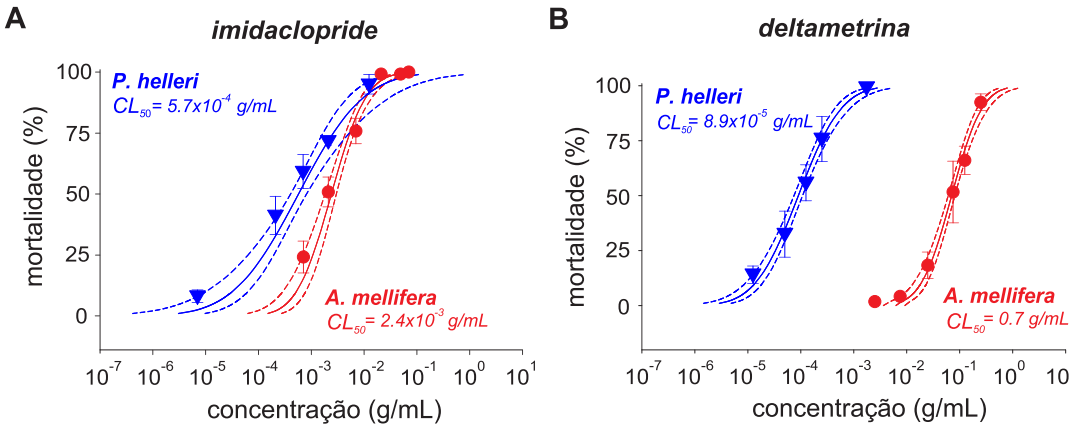

Figura 2.1: Impacto dos inseticidas na mortalidade das abelhas. As curvas de concentração-mortalidade das abelhas forrageiras de *Apis mellifera* e *Partamona helleri* expostos ao imidaclopride (A) e deltametrina (B). São demonstrados os valores de CL_{50} e as linhas pontilhadas representam o intervalo de confiança de 95% de cada curva. Símbolos representam as concentrações testadas (no eixo x) e mortalidade observada (no eixo y). As barras verticais representam o erro padrão da média.

Tabela 1. Toxicidade oral a pesticidas em *Apis mellifera* e *Partamona helleri*

Inseticidas	**Espécies**	***n***	**Slope ± S.E**	**CL_{50} (95% FL) g i.a/mL**	***χ2***	***P*[a]**	***RS*[b] CL_{50} (95% FL)**
Deltametrina	*A. mellifera*	652	0.3 ± 0.1	0.7 (0.6–0.8)	2.7	0.60	–
	P. helleri	588	4.7 ± 0.4	$8.9x10^{-4}$ ($7.4x10^{-4}$–$1.0x10^{-3}$)	3.9	0.26	$8.0x10^{2}$ ($2.9x10^{2}$–$2.2x10^{3}$)*
Imidaclopride	*A. mellifera*	1080	5.0 ± 0.4	$2.4x10^{-3}$ ($1.8x10^{-3}$–$2.9x10^{-3}$)	6.6	0.18	–
	P. helleri	522	3.3 ± 0.5	$5.7x10^{-4}$ ($4.0x10^{-4}$–$8.1x10^{-4}$)	2.8	0.41	4.2 (2.1–8.4)*
Cerconil (ttiofanato metilico + clorotalonil)	*A. mellifera*	601	3.6 ± 0.3	$1.5x10^{-3}$ ($1.2x10^{-3}$–$1.9x10^{-3}$)	2.6	0.45	–
	P. helleri	740	6.2 ± 0.3	$9.9x10^{-4}$ ($8.1x10^{-4}$–$1.2x10^{-3}$)	5.9	0.20	1.6 (1.0–5.5)
Cerconil + Imidaclopride	*A. mellifera*	840	3.3 ± 0.3	$1.5x10^{-6}$ ($6.5x10^{-7}$–$2.8x10^{-6}$)	1.5	0.67	–
	P. helleri	588	1.6 ± 0.3	$2.9x10^{-6}$ ($9.3x10^{-7}$–$1.0x10^{-5}$)	3.6	0.16	0.5 (0.3–7.3)
Thiofanate metil + Imidaclopride	*A. mellifera*	500	3.0 ± 0.6	$1.9x10^{-5}$ ($9.4x10^{-6}$–$3.6x10^{-5}$)	2.7	0.43	–
	P. helleri	480	1.9 ± 0.4	$2.9x10^{-5}$ ($1.2x10^{-5}$–$9.2x10^{-5}$)	4.9	0.18	0.6 (0.1–3.5)
Clorotalonil + Imidaclopride	*A. mellifera*	600	5.4 ± 0.7	$1.0x10^{-4}$ ($6.5x10^{-5}$–$1.4x10^{-4}$)	4.4	0.22	–
	P. helleri	480	2.9 ± 0.4	$6.8x10^{-6}$ ($3.3x10^{-6}$–$1.3x10^{-5}$)	1.5	0.46	14.6 (4.1–55.1)*
Cerconil + Deltametrina	*A. mellifera*	840	1.2 ± 0.1	0.21 (0.18–0.24)	7.4	0.19	–
	P. helleri	478	4.6 ± 0.4	$4.9x10^{-6}$ ($3.4x10^{-6}$–$6.9x10^{-6}$)	5.8	0.21	$4.3x10^{4}$ ($2.4x10^{4}$–$7.8x10^{4}$)*
Thiofanate methyl + Deltametrina	*A. mellifera*	480	1.7 ± 0.2	0.23 (0.18–0.27)	2.9	0.23	
	P. helleri	480	6.9 ± 0.8	$1.6x10^{-3}$ ($1.2x10^{-3}$–$2.0x10^{-3}$)	1.3	0.72	$1.4x10^{2}$ ($8.6x10^{1}$–$2.4x10^{2}$)*
Clorotalonil + Deltametrina	*A. mellifera*	596	1.7 ± 0.1	0.3 (0.3–0.34)	0.9	0.81	
	P. helleri	480	5.8 ± 0.7	$1.6x10^{-3}$ ($1.2x10^{-3}$–$2.2x10^{-3}$)	4.6	0.20	$2.0x10^{2}$ ($1.3x10^{2}$–$3.1x10^{2}$)*

[a] Valores de probabilidade.[b] Razão de sucetibilidade (CL_{50} to *A. mellifera*/CL_{50} to *P. helleri*).* indicam quando RS são significativamente diferentes (i.e., a CL 95% CL RS não inclui 1.

Tabela 2. Toxicidade oral realtiva das misturas de inseticidas com fungicidas em *Apis mellifera* e *Partamona helleri*

Espécies	Inseticidas	CL_{50} (95% FL) g i.a/mL	*RS*[a] CL_{50} (95% FL)
A. mellifera	Deltametrina	0.70 (0.61–0.81)	–
	Cerconil + Deltametrina	0.21 (0.18–0.24)	3.2 (2.2–4.2)*
	Tiofanato metil + Deltametrina	0.23 (0.18–0.27)	3.0 (3.0–3.7)*
	Clorotalonil + Deltametrina	0.34 (0.30–0.38)	2.0 (1.9–2.2)
	Imidacloprid	$2.4x10^{-3}$ ($1.8x10^{-3}$–$2.9x10^{-3}$)	–
	Cerconil + Imidacloprid	$1.5x10^{-6}$ ($6.5x10^{-7}$–$2.8x10^{-6}$)	1589.8 (1035.7–2769.2)*
	Tiofanato metil + Imidaclopride	$1.9x10^{-5}$ ($9.4x10^{-6}$–$3.6x10^{-5}$)	126.0 (80.6–191.0)*
	Clorotalonil + Imidaclopride	$1.0x10^{-4}$ ($6.5x10^{-5}$–$1.4x10^{-4}$)	23.9 (13.7–41.8)*
P. helleri	Deltametrina	$8.9x10^{-4}$ ($7.4x10^{-4}$–$1.0x10^{-3}$)	–
	Cerconil + Deltametrina	$4.9x10^{-6}$ ($3.4x10^{-6}$–$6.9x10^{-6}$)	177.0 (58.4–536.7)*
	Tifanato metil + Deltametrina	$1.6x10^{-3}$ ($1.2x10^{-3}$–$2.0x10^{-3}$)	0.53 (0.2–1.4)
	Clorotalonil + Deltametrina	$1.6x10^{-3}$ ($1.1x10^{-3}$–$2.2x10^{-3}$)	0.54 (0.5–1.6)
	Imidaclopride	$5.7x10^{-4}$ ($4.0x10^{-4}$–$8.1x10^{-4}$)	–
	Cerconil + Imidaclopride	$2.9x10^{-6}$ ($9.3x10^{-7}$–$1.0x10^{-5}$)	197.0 (100.6–430.1)*
	Tiofanto metil + Imidaclopride	$2.9x10^{-5}$ ($1.2x10^{-5}$–$9.2x10^{-5}$)	19.3 (3.3–88.9)*
	Clorotalonil + Imidaclopride	$6.8x10^{-6}$ ($3.3x10^{-6}$–$1.3x10^{-5}$)	83.4 (42.7–181.4)*

[a] Razão de sucetibilidade (CL_{50} para *A. mellifera*/CL_{50} para *P. helleri*). * indicam quando Rs são significativamente diferentes. (i.e., a CL 95 % da RS não inclui 1.0)

de concentração mortalidade, *P. helleri* foi mais suscetível ao imidaclopride do que *A. mellifera* (RS_{50} = 4,2 [2,1-8,4]). Aumentando as concentrações de deltametrina (de 25 μg i.a ml^{-1} para 2,5 x $10^6\mu$g de i.a ml $^{-1}$) novamente um aumento da mortalidade para ambas as espécies. A CL_{50}para *P. helleri* foi 891,1μg i.a ml^{-1} , enquanto para *A. mellifera* foi de 7,1 × $10^5\mu$g i.a ml^{-1}. Com base nestas medidas de CL_{50}5, *P. helleri* foi mais suscetível à deltametrina que *A. mellifera* (RS_{50} = 800 [290-2200]; Tabela 1 e Figura2.1).

Os efeitos da formulação de fungicida cerconil e seus dois ingredientes ativos clorotalonil e tiofanato metílico também foram analisados. Não houve efeito dose dependente sobre a mortalidade para os dois componentes ativos aplicados por si só, quer para as espécies de abelhas com uma mortalidade inferior a 25% para tiofanato-metílico em ambos *A. mellifera* (Figura 2.2 A) e *P. helleri* (Figura 2.2 B). A mortalidade foi também independente da concentração para clorotalonil para ambas as espécies e novamente menos do que 25% (Figura 2.2A , B).

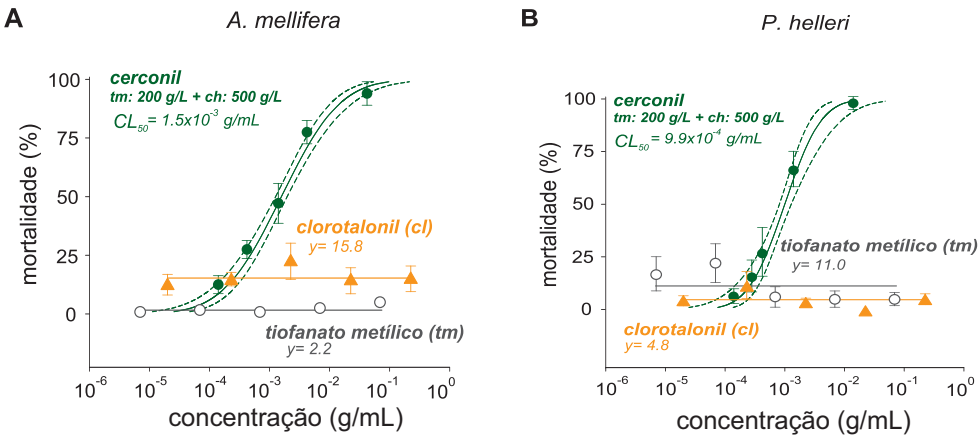

Figura 2.2: Impacto dos fungicidas na mortalidade das abelhas. As curvas de concentração mortalidade das abelhas forrageiras de *Apis mellifera* (A) e *Partamona helleri* (B) expostas ao fungicidas clorotalonil (CL), tiofanato-metilo (TM) e cerconil (mistura de clorotalonil e tiofanato metílilo). Os valores de CL_{50} são indicados, e as linhas tracejadas representam os intervalos de confiança de 95% limites de cada curva. Símbolos representam concentrações testadas (eixo x) e mortalidade observada (eixo y). As barras verticais representam o erro padrão da média.

Em contraste, quando as abelhas foram alimentados com dieta contaminada com uma mistura de ambos os ingredientes ativos dos fungicidas (isto é, formulação Cerconil), a mortalidade em ambas *A. mellifera* (Figura 2.2 A) e *P. helleri* (Figura 2.2 B) aumentou acentuadamente com o aumento da concentração fungicida (Tabela 1), permitindo que a estimativa das curvas de concentração mortalidade para ambas as

espécies de abelhas (Tabela 1 e Figura2.2). Para *A. mellifera* , o CL_{50} foi 1.498,1μg de cerconil ml $^{-1}$, enquanto que para *P. helleri* a CL_{50} foi 990,2 μg de Cerconil ml $^{-1}$.

As ações sinérgicas destes fungicidas não EBI levou a maiores níveis de mortalidade de ambas as espécies de abelhas em comparação com a mortalidade causada por imidaclopride ou deltametrina (comparando as Figuras2.1 e 2.2). Com base em índices de suscetibilidade tanto *A. mellifera* (RS_{50} = 1,5 [0,9-1,9]) e *P. helleri* (RS_{50} = 0,6 [0,3-1,1]) eram tão suscetíveis aos fungicidas combinados (cerconil) como a imidaclopride. Níveis de suscetibilidade semelhantes foram observados quando se comparam deltametrina e cerconil para *P. helleri* (RS_{50} = 0,9 [0,8-1,2]), mas *A. mellifera* foi mais que 400 vezes mais suscetíveis a cerconil do que a deltametrina.

2.2.3 *Fungicidas não inibidores da biossíntese de ergosterol potencializam as ações inseticidas em* **Apis mellifera** *e* **Partamona helleri**

Misturas de fungicidas, Cerconil, e cada um dos ingredientes ativos (isto é, tiofanato metílico e clorotalonil) com o inseticida imidaclopride aumentou significativamente a mortalidade da *A. mellifera* (Figura2.3 A) em comparação com somente o imidaclopride . Uma mistura de clorotalonil (0,01 g i.a ml^{-1}) com uma concentrações de imidaclopride foi de 23,9 (13,7-41,8) vezes mais tóxico para *A. mellifera* do que imidaclopride sozinho (Figura 2.3A). Da mesma forma, uma mistura de tiofanato-metilíco (0,01 g ia ml^{-1}) com imidaclopride potencializou o efeito do imidaclopride por si só em *A. mellifera* em aproximadamente 126,0 (80,6-191,0) (Figura2.3 A). Quando o imidaclopride foi misturado com a formulação fungicida que contém ambos os ingredientes ativos não-EBI (cerconil), a mortalidade de *A. mellifera* foi 1.589,8 (1035,7-2769,2) vezes mais elevada do que a observada para o imidaclopride sozinho (Figura 2.3A). Em *P. helleri* , misturas de fungicidas com imidaclopride também potencializou os efeitos deste (RS_{50} para imidaclopride + clorotalonil = 83,4 [42,7-181,4]; RS_{50} para imidaclopride + tiofanato-metilo = 19,3 [13,3-88,9] e RS_{50}para imidaclopride + clorotalonil + tiofanato-metilo = 197,0 [100,6-430,1]; Figura 2.3B).

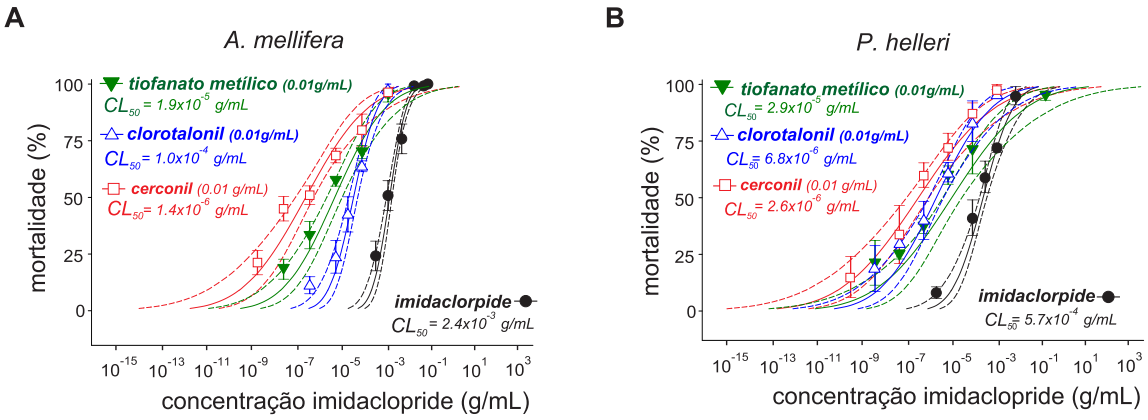

Figura 2.3: Efeitos da exposição combinada do neonicotinoide imidaclopride e aos fungicidas na mortalidade das abelhas. As curvas de concentração mortalidade de *Apis mellifera* (a) e *Partamona helleri* (b) expostos a misturas de imidaclopride e dos fungicidas clorotalonil (Cl), tiofanato-metilíco (TM) e Cerconil (mistura de clorotalonil e tiofanato-metilíco). Os valores de CL_{50} são indicados e as linhas pontilhadas representam os intervalos de confiança de 95% de cada curva. Símbolos representam concentrações testadas (eixo x) e mortalidade observada (eixo y). As barras verticais representam o erro padrão da média.

Misturas dos fungicidas tiofanato metilíco e clorotalonil, individualmente, com o inseticida deltametrina levou a um pequeno aumento na mortalidade em comparação ao deltametrina sozinho em ambas as espécies (Figura2.5). Por exemplo, misturas de cada um dos fungicidas tiofanato-metilo ou clorotalonil com deltametrina resultou em níveis de toxicidade menores do que quatro vezes para ambas as espécies (Figura 2.4). Misturas de ambos os ingredientes dos fungicidas não-EBI (Cerconil) em conjunto com deltametrina, provocou um pequeno aumento na mortalidade de *A. mellifera* (Figura 2.4A), mas 177,0 (58,4-536,7) vezes de aumento em *P. helleri* comparado com deltametrina sozinho (Figura 2.4B). Assim, *P. helleri* foi de cerca de 4300,4 [2200,1-7800,3] mais suscetível do que *A. mellifera* à mistura de deltametrina e a formulação fungicida que contém ambos os ingredientes ativos não-EBI (Tabela 1 e a Figura 2.4B).

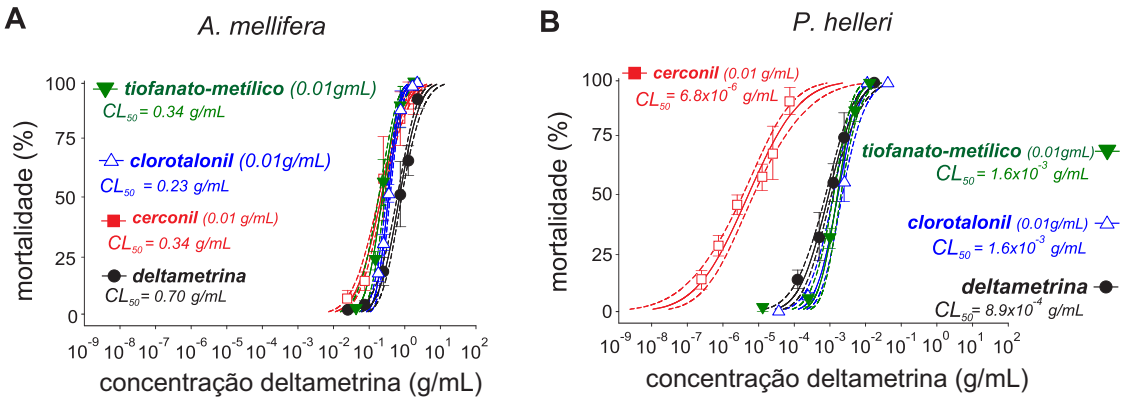

Figura 2.4: Efeitos da exposição combinada ao piretróide deltametrina e aos fungicidas na mortalidade das abelhas. As curvas de concentração mortalidade de *Apis mellifera* (a) e *Partamona helleri* (b) expostos a misturas de deltametrina e aos fungicidas clorotalonil (CL), tiofanato-metilíco (TM) e Cerconil (mistura de clorotalonil e tiofanato-metilico). Os valores de CL_{50}são indicados e as linhas pontilhadas representam os intervalos de 95% de confiança de cada curva. Símbolos representam concentrações testadas (eixo x) e mortalidade observada (eixo y). As barras verticais representam o erro padrão da média.

2.2.4 *Taxa respiratória e massa corporal*

A massa corporal de *A. mellifera* foi de 86,4 ± 0,6 mg (média ± SE), enquanto que a *P. helleri* foi de 16,2 ± 0,02 mg (média ± SE; Figura 2.5A). Um teste de Kruskal-Wallis mostrou que *A. mellifera* foi estatisticamente mais pesado do que *P. helleri* ($H_{1,20}$= 8,3, p = 0,002). As taxas de respiração foram significativamente maiores em *A. mellifera* (0,26 ± 0,01 μL de CO_2 h^{-1} abelha $^{-1}$), em comparação com *P. helleri* (0,002 ± 0,0003 μl CO_2 h^{-1} abelha^{-1}; Figura 2.5 B). Um teste de Kruskal-Wallis mostrou que as taxas de respiração para as duas espécies de abelhas foram significativamente diferentes ($H_{1,20}$ = 26,2, P <0,001). Embora a diferença de peso entre *A. mellifera* e P. *helleri* era aproximadamente 5,3 vezes, a taxa de respiração de *A. mellifera* foi de aproximadamente 460 vezes mais elevada do que a de *P. helleri*.

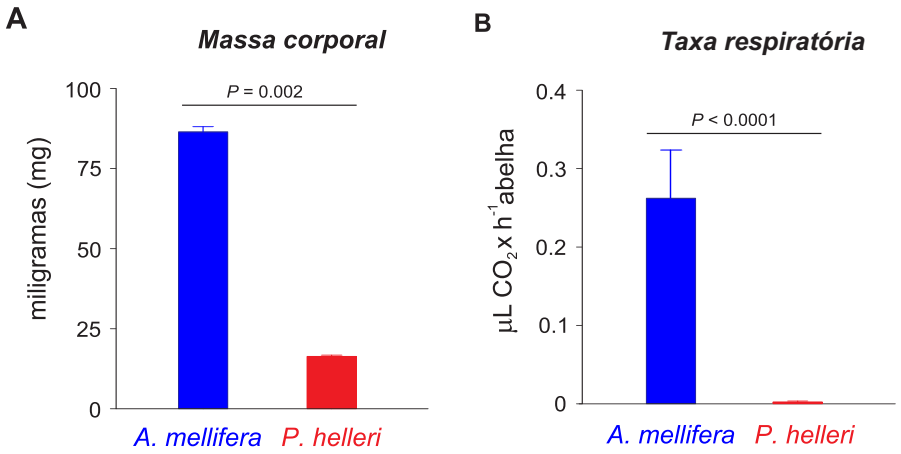

Figura 2.5: Massa corporal (a) e taxa de respiração (b) de um indivíduo não exposto (± SE) forrageiras adultas da abelha sem ferrão *Partamona helleri* e das *Apis mellifera* . Com base em testes de Kruskal-Wallis, não houve diferenças significativas entre a massa corporal ($H_{1,20}$ = 8,3, P = 0,002) e taxas de respiração ($H_{1,16}$ = 26,2, P <0,001).

2.2.5 *Analises estatísticas*

As curvas de concentração mortalidade foram estimadas por análises Probit usando o procedimento PROC PROBIT (SAS Institute 2008). A suscetibilidade diferencial de inseticida entre *A. mellifera* e *P. helleri* foi calculada para cada pesticida com base na CL_{50}estimada (isto é, a concentração letal capaz de matar 50% das abelhas testadas) para cada inseticida e espécie de abelha e as razões de suscetibilidade (RS_{50}). Foram estimadas dividindo o valor de CL_{50} obtido para *A. mellifera* pelo valor de CL_{50} obtido para *P. helleri* (Robertson et al., 2007). Os limites de confiança de 95% destas estimativas de toxicidade foram considerados

significativamente diferentes (P <0,05) se não incluírem o valor 1 (Robertson et al., 2007). A adequação do modelo probit para estimar a toxicidade dos pesticidas foi baseada nos baixos valores de $\chi 2$ (<6.6) e nos altos valores de (P> 0.05). Os resultados obtidos para as taxas de massa corporal e de respiração foram analisados utilizando-se análises de variância não-paramétricas (ANOVA) nas classificações (teste de Kuskal-Wallis), uma vez que os pressupostos de normalidade e homogeneidade da análise de variância não foram satisfeitos (Sigmaplot v.12.5; Jose, CA, USA).

2.3 Discussão

Durante o forrageamento, os polinizadores de abelhas podem ser expostos a diferentes agroquímicos, incluindo inseticidas, fungicidas e herbicidas em paisagens de culturas ao redor do mundo. Aqui demonstramos que tanto as abelhas africanizadas como as sem ferrão neotropicais foram suscetíveis a misturas de fungicidas (isto é, clorotalonil e tiofanato metilíco) que normalmente são considerados seguros em avaliações de risco de abelhas (Ladurner et al. 2005; Huntzinger et al. 2008; Everich et al. 2009). Além disso, mostramos que as abelhas sem ferrão neotropicais eram mais suscetíveis a inseticidas (por exemplo, deltametrina e imidaclopride) em comparação com as abelhas africanizadas. Esses resultados reforçam a noção de que *A. mellifera* não é um modelo fiel para avaliar a segurança dos agroquímicos quando comparado com outras espécies de abelhas (Hardstone and Scott, 2010; Arena and Sgolastra, 2004; Del Sarto et al. 2014) e enfatizar o limitado valor de extrapolação de resultados de bioensaios de toxicidade de abelhas africanizadas para espécies polinizadoras nativas.

Relatórios anteriores mostraram que a combinação de diferentes produtos químicos no ambiente pode resultar em coquetéis perigosos para polinizadores (Pilling et al. 1993; Schmuck et al. 2003; Thompson, 2012; Bro et al. 2015). No entanto, a maioria dos estudos que relatam interações sinérgicas entre os pesticidas tem negligenciando as abelhas sem ferrão que são rotineiramente expostas a agroquímicos e suas misturas em paisagens agrícolas neotropicais (Thompson 2012; Johnson et al. 2013; Cedergreen, 2014; Zhu et al. 2014; Lima et al. 2016).

Os fungicidas são frequentemente pulverizados em culturas controladas quando as abelhas estão forrageando e, por esta razão, os seus resíduos bem como os de outros produtos agroquímicos, têm sido introduzidos em colheitas de néctar e pólen (Chauzat et al. 2006; van Engelsdorp et al. 2009; Mullin et al. 2010). . Embora os fungicidas sejam considerados mais seguros para as abelhas do que outros agroquímicos devido aos seus altos valores de DL_{50} (Ladurner et al. 2005; Huntzinger et al. 2008; Everich et al. 2009), algumas formulações comerciais de fungicidas podem aumentar a toxicidade dos inseticidas (Zhu et al. 2014; Mullin et al. 2015, 2016).. A maioria dos estudos, entretanto, tem se concentrado em misturas de inseticidas, como os piretróides e os fungicidas EBI (ou seja, fungicidas que inibem a síntese de ergosterol), que são co-

nhecidos por alterarem os níveis de desintoxicação mediada pelo citocromo P_{450}em abelhas, tornando-as mais suscetíveis a inseticidas (Pilling et al. 1995; Vandame and Belzunces, 1998; Iwasa et al. 2004; Thompson, 2012; Sgolatra et al. 2016)]. Os efeitos de fungicidas não-EBI como o tiofanato-metílico (um inibidor de enzimas chave da cadeia de transporte de elétrons (Johnson et al. 2013; Sanchez-Bayo and Goka, 2014) e clorotalonil (um cloronitrilo de amplo espectro com um modo de ação pouco claro Caux et al. 1996) receberam pouca atenção.

Na formulação comercial de fungicida, cerconil, contendo tanto clorotalonil como tiofanato-metílico, observou-se que era tóxica para ambas as espécies de abelhas como imidaclopride em pelo menos 400 vezes mais tóxica do que a piretroide deltametrina para *A. mellifera.* Além disso, as misturas de deltametrina ou imidaclopride e os fungicidas clorotalonil, tiofanato-metilo ou ambos os ingredientes fungicidas (i.e. Cerconil) aumentaram os níveis de mortalidade de polinizadores com a magnitude das interações sinérgicas dependendo do tipo de inseticida na mistura e das espécies de abelhas. Esses resultados podem refletir diferenças agroquímicas ou relacionadas aos insetos. Por exemplo, há evidências crescentes de que as formulações comerciais de agroquímicos modernos compreendem componentes diferentes dos ingredientes ativos que provocam efeitos fisiológicos muito diferentes nos organismos alvo e não-alvo, geralmente aumentando atividade de ingredientes ativos (Zhu et al. 2014; Mullin et al. 2015, 2016). As diferenças relacionadas às espécies podem resultar de diferenças na história (socialidade, tamanho corporal, sensibilidade e aumento da capacidade de desintoxicação pelo metabolismo) de ambas as espécies de abelhas.

Embora saibamos pouco sobre os processos de desintoxicação em abelhas sem ferrão, estudos prévios indicam que essas abelhas são mais suscetíveis aos agroquímicos do que outras abelhas (Hardstone e Scott, 2010; Arena e Sgolastra, 2004; Del Sarto et al. 2014; Lima et al. 2016). Como a taxa de respiração é afetada pela massa corporal e pela taxa metabólica (Chown et al 1999), esperavam-se diferenças na massa corporal e na taxa de respiração entre as duas espécies (Tomé et al., 2015; Rodrigues et al., 2016). Assim, a taxa de respiração mais baixa de *P. helleri* é sugestiva de uma menor taxa metabólica nessa espécie em comparação com *A. mellifera*, o que pode ser devido a uma menor capacidade de destoxificação xenobiótica da primeira. No entanto, outros estudos são necessários para investigar completamente a relação entre o processo de

desintoxicação e o metabolismo em abelhas sem ferrão. Assim, embora estudos em condições de campo sejam necessários para avaliar o risco real que as abelhas estão sujeitas quando expostos a agroquímicos, nossos achados sugerem que as misturas de alguns fungicidas não EBI e de inseticidas rotineiramente aplicados a cultivos apresentam riscos maiores para os polinizadores nativos do que para abelhas africanizadas, comprometendo a reconhecida importância ecológica e agrícola das antigas espécies de abelhas em regiões neotropicais. Além disso, nossos achados reforçam a noção de que as abelhas nativas podem ser modelos mais adequados para avaliações de risco agroquímico na região neotropical, pois são prevalentes nessas áreas e são mais suscetíveis à exposição a agroquímicos do que as *A.mellifera.*

2.4 Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

2.5 Referências

Arena M, Sgolastra F. 2014. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. Ecotoxicology 23, 324–334.

Barbosa WF, Smagghe G, Guedes RNC. 2015a. Pesticides and reduced-risk insecticides, native bees and pantropical stingless bees: pitfalls and perspectives. Pest Management Science 71(8):1049-53

Barbosa WF, Tomé HVV, Bernardes RC, Siqueira MAL, Smagghe G, Guedes RNC. 2015b. Biopesticide-induced behavioral and morphological alterations in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. Environmental Toxicology Chemistry.34:2149–2158

Blacquière T, Smagghe G, van Gestel CAM, Mommaerts V. 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. Ecotoxicology 21, 973–992

Bro E, Millot F, Decors A, Devillers J.2015. Quantification of potential exposure of gray partridge (*Perdix perdix*) to pesticide active substances in farmlands. Sci Total Environ 521-522: 315-25

Caux PY, Kent RA, Fan GT, Stephenson GL. 1996. Environmental fate and effects of chlorothalonil: A Canadian perspective. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 26(1): 45–93

Cedergreen N. 2014. Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. PLoS ONE 9(5): e96580.

Chauzat MP, Faucon JP, Martel AC, Lachaize J, Cougoule N, et al. 2006. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. Journal of Economic Entomology 99: 253–262

Chown SL, Gaston KJ. 1999. Exploring links between physiology and ecology at macro-scales: the role of respiratory metabolism in insects. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 74: 87-120

Di Prisco G, Annoscia VD, Varricchio P, Caprio E, Nazzi F, et al. 2013. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. Proceedings of the National Academy of Sciences110: 18466–18471

Everich R, Schiller C, Whitehead J, Beavers M, Barrett K. 2009. Effects of Captan on *Apis mellifera* brood development under field conditions in California almond orchards. Journal of Economic Entomology, 102, 20–29

Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL. 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science 347(6229)

Hardstone MC, Scott JG.2010. Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects? Pest Management Science, 66(11): 1171-1180

Heard TA. 1999. The role of stingless bees in crop pollination. Annual Review of Entomology 44: 183–206

Huntzinger CI, James RR, Bosch J, Kemp W P. 2008. Fungicide tests on adult alfalfa leafcutting bees (Hymenoptera: Megachilidae). Journal of Economic Entomology 103, 1088–1094

Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM. 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera.* Crop Protection 23 (2004) 371–378

Johnson RM, Dahlgren L, Siegfried BD, Ellis MD. 2013. Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). PLoS ONE 8(1): e54092.

Kataria HR, Grover RK. . 1976. Effect of benomyl and thiophanate-methyl on metabolic activities of *Rhizoctonia solani* Kühn. Annals of Microbiology (Paris). 127(2): 297-306

Klein A-M, Vaissile BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 274: 303–313

Ladurner E, Bosch J, Kemp WP, Maini S. 2005. Assessing delayed and acute toxicity of five formulated fungicides to Osmia lignaria Say and *Apis mellifera*. Apidologie, 36, 449–460

Lima MAP, Martins GF, Oliveira EE, Guedes RNC. 2016. Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. Journal of Comparative Physiology A 202: 733-747

Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R. 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. PloS One 5: e9754

Mullin CA, Chen J, Fine JD, Frazier MT, Frazier JL. 2015. The formulation makes the honey bee poison. Pesticide Biochemistry and Physiology 120: 27–35

Mullin CA, Fine JD, Reynolds RD, Frazier MT. 2016. Toxicological risks of agrochemical spray adjuvants: organosilicone surfactants may not be safe. Front Public Health 4: 92.Osborne JL. 2012. Ecology: Bumblebees and pesticides. Nature 491: 43–45

Pilling ED, Jepson PC.1993. Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (Apis mellifera). Pesticide Science 39, 293-297

Pilling ED, Bromley-Challoner KAC, Walker CH, Jepson PC,. 1995. Mechanism of synergism between the pyrethroid insecticide λ-cyhalothrin and the imidazole fungicide prochloraz in the honeybee (Apis mellifera L). Pesticide Biochemistry and Physiology 51, 1-11

Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O. 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends in Ecology & Evolution 25: 345–353

Robertson JL, Preisler HL. 1992. Pesticide Bioassays with Arthropods. CRC, Boca Raton, FL, USA.

Sanchez-Bayo F, Goka K,.2014. Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. PLoS ONE 9(4): e94482. doi:10.1371/journal.pone.0094482

Schmuck R, Stadler T, Schmidt HW..2003. Field relevance of a synergistic effect observed in the laboratory between an EBI fungicide and a chloronicotinyl insecticide in the honeybee (Apis mellifera L, Hymenoptera). Pest Management Science 59, 279–286

Sgolastra F, Medrzycki P, Bortolotti L, Renzi MT, Tosi S, Bogo G, Teper D, Porrini C, Molowny-Horas R, Bosch J.2016. Synergistic mortality between a neonicotinoid insecticide and an ergosterol-biosynthesis-inhibiting fungicide in three bee species. Pest Management Science. Accepted Author Manuscript. doi:10.1002/ps.4449

Thompson HM, and Wilkins S, Goka .2003. Assessment of the synergy and repellency of pyrethroid/fungicide mixtures. Bulletin of Insectology 56, 131-134

Thompson, HM. 2012. Interaction between Pesticides and Other Factors in Effects on Bees. Supporting Publications 2012: EN-340, European Food Safety Authority. Available at www.efsa.europa.eu/publications. (accessed August 08, 2016)

Tomé HVV, Martins GF, Lima MAP, Campos LAO, Guedes RNC. 2012. Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee Melipona quadrifasciata anthidioides. PLoS One 7:e38406

Tomé HVV, Barbosa WF, Corrêa AS, Gontijo LM, Martins GF, Guedes RNC. 2015a. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. Annals of Applied Biology 167:186–196

Tomé HVV, Barbosa WF, Martins GF, Guedes RNC.2015b. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata:* regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. Chemosphere 124:103–109

Vanbergen A. J. & the Insect Pollinators Initiative.2013. Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. Front. Journal of Ecology and Environment. 11, 251–259

Vandame R, Belzunces LP. 1998. Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation. Neuroscience Letters 251, 57-60

vanEngelsdorp D, Evans JD, Donovall L, Mullin C, Frazier M .2009. "Entombed Pollen", A new condition in honey bee colonies associated with increased risk of colony mortality. Journal of Invertebrate Pathology 101, 147-149

vanEngelsdorp D., Meixner MD. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. J. Journal of Invertebrate Pathology. 103, S80–S95

Conclusões gerais

O trabalho mostrou a interferência da temperatura e da competição interespecífica sobre o comportamento defensivo de *A.mellifera* e das espécies nativas *S.depilis e P.helleri.* Onde foi perceptível que a soma de temperatura, densidade e competição interespecífica são fortes influenciadores sobre o comportamento, logo interferindo diretamente no sucesso das abelhas.

As abelhas *A.mellifera*, são consideradas por muitos pesquisadores como um bom modelo para estudo na segurança de agroquímicos em agroecossistemas. Porém, o presente trabalho em condições laboratoriais, demostrou a importância de maiores estudos com as espécies nativas, como *P.helleri*. Pois tanto a compostos isolados, como para misturas agroquímicas à uma grande diferença de susceptibilidade em relação a espécie africanizada . O que reforça a necessidade de maior foco de estudos com abelhas nativas, tornado a elucidação dos mecanismos destoxificativos desses organismos importantes e urgentes, na busca de diminuir as perdas por colônias.

Além dos fatores toxicológicos que afetam a sobrevivência diretamente desses indivíduos, fatores comportamentais também estão intimamente ligado a sobrevivência das colônias, como a defensividade. Sendo muito influenciada por diversos fatores ambientais. A junção destes dados se fazem de extrema importância, para que se estabeleça medidas preventivas para o uso seguro de agroquímicos e assim se conheça melhor os efeitos destes sobre as abelhas nativas e africanizadas que são fundamentais para manutenção de diversas culturas de importância econômica e ecológica mundial.