

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JAQUELINE APARECIDA DA SILVA

**CRIAÇÃO *IN VITRO* DA ABELHA SEM FERRÃO *Frieseomelitta varia* Lepeletier 1836
(Apidae, Meliponini) E EFEITOS DE DOSES SUBLETAIS DE GLIFOSATO NA
MORFOLOGIA**

Alfenas/MG

2021

JAQUELINE APARECIDA DA SILVA

**CRIAÇÃO *IN VITRO* DA ABELHA SEM FERRÃO *Frieseomelitta varia* Lepeletier 1836
(Apidae, Meliponini) E EFEITOS DE DOSES SUBLETAIS DE GLIFOSATO NA
MORFOLOGIA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Diversidade Biológica e Conservação e Tecnologias Ambientais Aplicadas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marina Wolowski

Coorientador: Prof^a. Dr. Angel Roberto Barchuk

Alfenas/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Silva, Jaqueline Aparecida da
S586c Criação in vitro da abelha sem ferrão *frieseomelitta varia* lepeletier 1836
(Apidae, Meliponini) e efeitos de doses subletais de glifosato na morfologia /
Jaqueline Aparecida da Silva. – Alfenas, MG, 2021.
73 f.: il. –

Orientadora: Marina Wolowski Torres.
Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal de
Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Abelhas – Criação. 2. Protocolo. 3. Produção de operárias. 4. Herbicida.
5. Parasitismo. 6. Conservação. I. Torres, Marina Wolowski. II. Título.

CDD- 577

JAQUELINE APARECIDA DA SILVA

**CRIAÇÃO *IN VITRO* DA ABELHA SEM FERRÃO *Frieseomelitta varia* Lepeletier 1836
(Apidae, Meliponini) E EFEITOS DE DOSES SUBLETAIS DE GLIFOSATO NA
MORFOLOGIA**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Ambientais.

Aprovada em: 22 de janeiro de 2021

Profa. Dra. Marina Wolowski Torres

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Isabel Ribeiro do Valle Teixeira

Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas

Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Instituição: Universidade Federal de São Carlos



Documento assinado eletronicamente por **Marina Wolowski Torres, Professor do Magistério Superior**, em 22/01/2021, às 14:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, Usuário Externo**, em 22/01/2021, às 14:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isabel Ribeiro do Valle Teixeira, Usuário Externo**, em 25/01/2021, às 10:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0450956** e o código CRC **C54A0AC3**.

JAQUELINE APARECIDA DA SILVA

**CRIAÇÃO *IN VITRO* DA ABELHA SEM FERRÃO *Frieseomelitta varia* Lepeletier 1836
(Apidae, Meliponini) E EFEITOS DE DOSES SUBLETAIS DE GLIFOSATO NA
MORFOLOGIA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Diversidade Biológica e Conservação e Tecnologias Ambientais Aplicadas.

Aprovada em: 22 de janeiro de 2021

Profa. Dra. Marina Wolowski Torres

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Isabel Ribeiro do Valle Teixeira

Instituição: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas

Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Instituição: Universidade Federal de São Carlos

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer por todos os obstáculos durante toda a trajetória do mestrado, todas as dificuldades impostas me tornaram mais forte e confiante.

Aos meus pais, Gilda e Benedito, pelo amor incondicional, apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Por acreditarem em mim, e não medirem esforços para a concretização dos meus sonhos. Sem vocês, nada disso seria possível.

Um obrigado especial a Iara, pelo companheirismo e por ser minha melhor amiga desde sempre. A minha orientadora Professora Marina Wolowski Torres, pela oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada pela confiança, aprendizado e pela paciência. Agradeço por me guiar nos primeiros passos da Pós-Graduação.

Ao meu coorientador, Professor Angel Roberto Barchuk, pela sua disponibilidade e apoio durante todo o desenvolvimento do projeto. Sua contribuição foi essencial no desenvolvimento deste projeto. Muito obrigada!

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Roberta Nocelli por ter cedido o ingrediente ativo do herbicida usado nesta pesquisa (Auxílio: CNPq Processo: 400540/ 2018 – 5).

Agradeço ao Prof. Dr. Weyder Cristiano Santana e ao Dr. Dirk Louis Schorkopf por suas sugestões sobre a identificação do ácaro.

Agradeço ao Prof. Dr. José Eustáquio dos Santos Júnior por suas sugestões nas análises morfológicas das asas de abelhas com malformações.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado nos primeiros meses (Código 001).

À instituição UNIFAL-MG e aos membros do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, pela oportunidade e apoio ao longo da Pós-Graduação.

Agradeço o Auxílio CNPq Processo: 406734/2018-6 e FINEP/PROINFRA 01/2008 pelos recursos financeiros e ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento (ICB) pela disponibilidade dos Laboratórios e Meliponário, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Biologia Animal Integrativa - LABAINT pelo apoio durante todo o desenvolvimento da dissertação.

E um agradecimento especial ao Marcos Vieira pela paciência, pela amizade, companheirismo e palavras de conforto em períodos difíceis.

RESUMO

A polinização é um dos serviços ecológicos essenciais para a manutenção de ambientes naturais e agrícolas. Entre os polinizadores, as abelhas Meliponini representam um grupo diverso que desempenha um papel ecológico fundamental e estão expostas a vários agrotóxicos tanto em ambientes naturais e agrícolas, incluindo o glifosato. Este composto foi concebido e é utilizado extensamente como herbicida de amplo espectro. Contudo, publicações recentes têm mostrado que o glifosato induz alterações na capacidade cognitiva de abelhas *Apis mellifera*. Aqui hipotetizamos que o glifosato pode promover alterações morfofisiológicas em insetos em desenvolvimento e, assim, ser responsável pela diminuição das populações de abelhas, incluindo as da espécie nativa *Frieseomelitta varia*. Como abordagem inicial para testar nossa hipótese, definimos dois objetivos fundamentais: (i) Estabelecer um protocolo de criação *in vitro* de operárias de *F. varia*, o que possibilitaria a realização de ensaios de avaliação dos efeitos de agrotóxicos durante o desenvolvimento pós- embrionário; (ii) Determinar alterações morfológicas externas em abelhas recém-emergidas sobreviventes a exposição larval. As larvas foram criadas em placas de acrílico tipo ELISA (96 poços) em condições controladas de humidade e temperatura e alimentadas com alimento larval natural estocado. Nossos resultados mostram que as larvas de (L1) alimentadas com 27 µL de alimento foram as que tiveram mais sucesso ao considerar as taxas de emergência larval (87%), possibilitando a emergência de um número significativo de operárias (93%) ao longo de 33.3 ± 0.57 dias de desenvolvimento. As análises morfológicas de abelhas emergidas indicaram que não há diferenças estatísticas entre abelhas criadas *in vitro* e produzidas naturalmente na colônia. Assim, estes resultados mostram a viabilidade do uso dessa espécie de abelhas sem ferrão em estudos ecotoxicológicos e como modelo para outras espécies que tenham ecologia semelhantes a *F. varia* (Capítulo 1). Para alcançar nosso segundo objetivo, larvas L1 receberam alimento contendo glifosato para determinar alterações morfológicas após a ingestão de herbicida. Nossos resultados mostraram que, nas concentrações testadas, o glifosato não é letal para as larvas de *F. varia*. Embora não tenha sido letal, registramos abelhas recém-emergidas tratadas 1000 ng / 27 µL de alimento larval com malformações nas asas. Estes resultados indicam que o herbicida glifosato é um estressor e afeta o desenvolvimento pós-embrionário de abelhas *F. varia* (Capítulo 2). Finalmente, durante o manuseio das colônias de *F. varia* registramos pela primeira vez populações do ácaro *Tyrophagus putrescentiae* com comportamento parasítico, causando enfraquecimento e conseqüentemente a mortalidade de todas as colônias em que o ácaro foi registrado (Capítulo 3). Nossos resultados mostram que *F. varia* é sensível ao glifosato e à infestação por ácaros e sugerem a necessidade da realização de experimentos que permitam determinar detalhes das interações ecológicas entre as abelhas e o ácaro e dos efeitos da exposição ao glifosato durante todo o período de desenvolvimento da abelha. Em conjunto, o

corpo de conhecimentos obtido contribuirá para o planejamento de ações de conservação das populações de abelhas e, conseqüentemente, a manutenção dos serviços de polinização.

Palavras-chave: Abelhas sem ferrão; Protocolo; Produção de operárias; Herbicida; Parasitismo; Conservação.

RESUMO

Pollination is one of the essential ecological services for maintaining natural and agricultural environments. Among pollinators, such as Meliponini bees represent a diverse group that plays a fundamental ecological role and are exposed to various pesticides in both natural and agricultural environments, including glyphosate. This compound has been designed and is used extensively as a broad spectrum herbicide. However, recent publications show that glyphosate has changed in the cognitive capacity of *Apis mellifera* bees. Here we hypothesize that glyphosate can promote morphophysiological changes in developing insects and thus be responsible for reducing bee populations, including how the native species *Frieseomelitta varia*. As an initial approach to test our hypothesis, we defined two fundamental objectives: (i) Establish an in vitro breeding protocol for *F. varia* workers, which would make it possible to carry out tests to evaluate the pesticide effects during post-embryonic development; (ii) Determine external morphological changes in newly emerged bees surviving larval exposure. The larvae were formed in acrylic ELISA plates (96 wells) under controlled conditions of humidity and temperature and fed with natural stored larval food. Our results show that (L1) larvae fed with 27 μ L of food were the most successful when considering larval emergence rates (87%), enabling the emergence of a significant number of workers (93%) over the course of 33.3 ± 0.57 days of development. The morphological analyzes of emerged bees indicated that there are no statistical differences between bees *in vitro* and *in vivo*. Thus, these results show the feasibility of using this species of stingless bees in ecotoxicological studies and as a model for other species that have an ecology similar to *F. varia* (Chapter 1). To achieve our second objective, L1 larvae received food containing glyphosate to determine morphological changes after ingesting the herbicide. Our results hindered that, in the tested options, glyphosate is not lethal to *F. varia* larvae. Although it was not lethal, we recorded newly emerged bees treated 1,000 ng / 27 μ L of food with malformations in the wings. These results indicate that the herbicide glyphosate is a stressor and affects the post-embryonic development of *F. varia* bees (Chapter 2). Finally, during the handling of *F. varia* colonies, we first registered the predators of the mite *Tyrophagus putrescentiae* with parasitic behavior, causing weakening and consequently the mortality of all colonies in which the mite was registered (Chapter 3). Our results show that *F. varia* is sensitive to glyphosate and mite infestation and obtains the need to carry out experiments that show details of the ecological interactions between bees and the mite and the effects of exposure to glyphosate throughout the development period of the Bee. Together, the body of knowledge found will contribute to the planning of conservation actions for bee populations and, consequently, the maintenance of pollination services.

Keywords: Stingless bees; Protocol; Production of workers; Herbicide; Parasitism; Conservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Procedimentos realizados para transferência de larvas para placas de acrílico limpas e esterilizadas.....	25
Figura 2 - Criação de um método de captura de larvas	25
Figura 3 - Fotos representativas de abelhas <i>Frieseomelitta varia</i> criadas <i>in vitro</i> em diferentes fases do desenvolvimento pós-embrionário	29
Figura 4 - Exemplos das células de cria do ninho da espécie <i>Frieseomelitta varia</i> em formato de cacho	32
Figura 1. A emergência de adultos da espécie <i>Frieseomelitta varia</i> sobreviventes ao longo do período de exposição larval ao glifosato ng / 27 µL e controle de 27 µL de alimento larval....	45
Figura 2 - Deformações nas asas anteriores de operárias <i>F. varia</i> expostas oralmente ao glifosato / 27 µL de alimento larval e oferecido às larvas no primeiro ínstar larval em placas de cultura a 30°C e 99% umidade	46
Figura 1- Representative photos of adult <i>Tyrophagus putrescentiae</i> individuals	55
Figura 2 - Presence of <i>T. putrescentiae</i> mites on pupae and larvae of <i>F. varia</i> bees on ELISA acrylic plates in na incubator at 28°C and 80% humidity.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Taxas de mortalidade e sobrevivência de larvas de <i>Frieseomelitta varia</i> transferidas para a produção <i>in vitro</i> de operárias com diferentes quantidades de alimento larval (μL)	28
Tabela 2 – <i>Timing</i> de eventos ocorridos durante o desenvolvimento de operárias com base na intensidade da pigmentação do olho, protocolo proposto para operárias de <i>Frieseomelitta varia</i>	29
Tabela 1 - Mortalidade média de larvas de <i>Frieseomelitta varia</i> no grupo controle e entre concentrações de glifosato ng / 27 μL de alimento larval ao longo do período de exposição (sete dias)	44
Tabela 2 - Emergência de operárias de <i>Frieseomelitta varia</i> alimentadas com alimento larval com diferentes concentrações de glifosato ng / 27 μL de alimento larval e grupo controle	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2.1	Criação <i>in vitro</i> de abelha sem ferrão <i>Frieseomelitta varia</i> (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) como protocolo para possíveis testes toxicológicos.....	19
2.2	Efeitos de doses subletais de glifosato em abelha sem ferrão <i>Frieseomelitta varia</i> (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).....	39
2.3	Scientific note: First report of <i>Tyrophagus putrescentiae</i> (Schrank) (Acari: Acaridae) in colonies of the stingless bee <i>Frieseomelitta varia</i> Lepeletier 1836 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).....	55
3	CONSIDERAÇÃO FINAIS	60
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO GERAL

Estima-se que existam mais de quatro mil gêneros e aproximadamente 20 mil espécies de abelhas distribuídas em diferentes regiões do mundo (Michener 2013). O Brasil, por suas proporções continentais e ricos ecossistemas, possui aproximadamente 5.000 dessas espécies distribuídas em cinco famílias (Silva *et al.* 2015). Dentre as espécies de abelhas no país, a família Apidae se destaca por sua notável riqueza de espécies. Essa família é subdividida em cinco subfamílias, como Apinae Latreille, que inclui a tribo Meliponini (Moure 2015), na qual já foram registradas aproximadamente 244 espécies. As abelhas sem ferrão merecem atenção especial como um recurso socioeconômico valioso (Pedro 2014), pois são polinizadores eficientes e, portanto, essenciais para a conservação de várias espécies de plantas e sua fauna associada (Kerr *et al.* 2001). No Brasil, as abelhas sem ferrão estão associadas a 101 espécies de cultivos relacionados à produção de alimentos, das quais 41 espécies de abelhas são reconhecidas como polinizadoras e 12 espécies já tiveram seu manejo testado em áreas agrícolas para suplementar o serviço ecossistêmico de polinização (BPBES/REBIPP 2019).

Contudo, o serviço ecossistêmico de polinização está comprometido com o declínio crescente dos polinizadores, o que conseqüentemente gera impactos negativos. As causas do declínio parecem envolver vários fatores, incluindo patógenos, como o ácaro *Varroa*, redução e perda de habitat, competição por recursos com espécies invasoras, práticas agrícolas agressivas (incluindo o uso inadequado de agrotóxicos) entre outros. De modo geral, as ameaças mais significativas aos polinizadores e à polinização estão relacionadas à fragmentação e perda de habitat (Viana *et al.* 2012) e ao uso de agrotóxicos (Nocelli *et al.* 2011). No Brasil, os impactos potenciais do declínio dos polinizadores incluem: impactos diretos e indiretos na produção agrícola, impactos na biodiversidade e impactos na diversidade biocultural (BPBES/REBIPP 2019).

O uso de agrotóxicos tem sido citado como uma das causas mais plausíveis para explicar o declínio de populações de abelhas. Alguns dos efeitos tóxicos dos agrotóxicos nas abelhas são alterações no sistema nervoso, que podem causar a morte por paralisia ou hiperexcitação (Jacob *et al.* 2015). Além disso, a intoxicação por agrotóxicos tem sido frequentemente associada a desorientação, mudanças comportamentais de curto e longo prazo (Meixner *et al.* 2010), redução da expectativa de vida, desenvolvimento larval alterado, mudanças no metabolismo celular e inibições enzimáticas (Desneux *et al.* 2007), alterações cognitivas que causam danos na colônia, como motilidade reduzida, perda de capacidade de comunicação e aprendizagem e forrageamento limitado (Bortolliet *et al.* 2003) e deformações em adultos (Barbosa *et al.* 2015). Outras evidências científicas mostraram que o herbicida glifosato, herbicida mais utilizado no mundo (Benbrook 2016; Duke e Powles 2008), pode afetar abelhas

sociais *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão (e.g., *A. mellifera* Vázquez *et al.* 2020; *M. quadrifasciata* Seide *et al.* 2018). A alta taxa de uso de glifosato em cultivos agrícolas cria o potencial de contaminação generalizada do meio ambiente (Bai e Ogbourne 2016). O glifosato é usado nas lavouras em grandes quantidades durante todo o período de forrageamento das abelhas e é encontrado no ar, na água e em partes das plantas visitadas pelas abelhas, como flores e botões florais, potencialmente contaminando o néctar coletado pelas abelhas de plantas contaminadas (CFE 2014). Assim, as abelhas podem voltar para a colônia com recursos contaminados que serão processados pelas abelhas nutrízes e oferecidos às ninhadas (Rortais *et al.* 2005; Hartfelder *et al.* 2006), causando danos em estágios pós- embrionários (Barbosa *et al.* 2015; Rosa *et al.* 2016; Tavares *et al.* 2017). Desta forma, é importante destacar outras fases da vida das abelhas, além das forrageadoras, para serem consideradas nas avaliações de risco, incluindo a exposição durante a fase larval, pela ingestão alimentar (Rosa-Fontana *et al.* 2020; Rosa *et al.* 2016; Dorigo *et al.* 2019).

Atualmente, os estudos sobre os efeitos subletais e letais das diversas classes de agrotóxicos sobre as abelhas nativas e *A. mellifera*, são desenvolvidos principalmente a partir de ensaios *in vitro*, em comparação com o grupo controle livre de agrotóxicos. Vários estudos já demonstraram efeitos subletais e letais de agrotóxicos em abelhas sem ferrão em estágios imaturos e adultos, como *Scaptotrigona postica* Latreille 1807 (Rosa-Fontana *et al.* 2020; Jacob *et al.* 2013; Jacob *et al.* 2019, Soares *et al.* 2015), *Scaptotrigona xanthotricha* Moure 1950 (Ferreira *et al.* 2020); *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier 1836 (Moreira *et al.* 2018; Dorneles *et al.* 2017); *Scaptotrigona mexicana* Guérin-Méneville 1845 (Toledo- Hernández *et al.* 2016), *Melipona scutellaris* Latreille 1811 (Prado *et al.* 2020; Domingues *et al.* 2020; Dorigo *et al.* 2019; Nocelli *et al.* 2019; Lourenço *et al.* 2012a, b; Costa *et al.* 2015; Mc Cabe *et al.* 2017; *Melipona quadrifasciata* Lepeletier 1863 (Costa *et al.* 2020; Brito *et al.* 2020; Piovesan *et al.* 2020; Viana *et al.* 2020; Seide *et al.* 2018; Boff *et al.* 2018; Prado *et al.* 2018; Ravaiano *et al.* 2018, Barbosa *et al.* 2015, Tomé *et al.* 2015; Sarto *et al.* 2014; Tomé *et al.* 2012), *Melipona colimana* Ayala 1999 (Macías-Macías *et al.* 2020); *Melipona mexicana* Guérin-Méneville 1845 (Gomez-Escobar *et al.* 2018), *Melipona beecheii* Bennett 1831 (Toledo-Hernández *et al.* 2016; Valdovinos-Nunez *et al.* 2009), *Partamona helleri* Friese 1900 (Botina *et al.* 2019; Araújo *et al.* 2019a, b; Bernardes *et al.* 2018), *Trigona nigra* Schwarz 1940 (Valdovinos-Nunez *et al.* 2009), *Tetragonisca angustula* Latreille 1811 (Rosa- Fontana *et al.* 2020; Toledo-Hernández *et al.* 2016), *Tetragonisca fiebrigi* Schwarz 1938 (Piovesan *et al.* 2020; Padilha *et al.* 2020; Dorneles *et al.* 2017), *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier 1836 (Moreira *et al.* 2018), *Plebeia droryana* Friese 1900 (Otesbelgue *et al.* 2018), *Hypotrigona ruspilii* Magretti 1898 (Abraham *et al.* 2018), *Scaptotrigona Depilis* Moure 1942 (Rosa *et al.* 2016); *Friesella schrottyi* Friese 1900 (Rodrigues *et al.* 2016); *Plebeia lucii* Moure 2004 (Marquez *et al.* 2020); *Plebeia emerina* Friese 1900 (Padilha *et al.* 2020); *Plebeia droryana* Friese 1900 (Santos *et al.* 2016).

Para as avaliações dos efeitos em abelhas sem ferrão adultas, é possível realizar os

experimentos adaptando os protocolos já disponíveis para *A. mellifera* (OECD 1998 a, b). No entanto, para as larvas, os sistemas de alimentação são completamente diferentes, os protocolos de criação devem ser também ajustados (Dorigo *et al.* 2019). Por exemplo, na abelha sem ferrão *Frieseomelitta varia*, comumente conhecida como marmelada, nosso modelo de estudo, o mecanismo de determinação de castas depende exclusivamente da quantidade de alimento larval fornecido às larvas em desenvolvimento (Baptistella 2009, 2012). As larvas que têm acesso somente ao alimento da sua célula se desenvolvem em operárias, por outro lado, aquelas que se alimentam de uma dose extra de alimento larval aprovocado em uma célula adjacente tornam-se rainhas (Terada 1974; Faustino *et al.* 2002). Por esses motivos, é necessário desenvolver protocolos para a criação *in vitro* de castas específicas (machos, fêmeas e rainhas), adaptando o método para estudos de avaliações de efeitos subletais e letais para a espécie.

Desta forma, diante da importância dos meliponíneos no contexto ecológico e econômico, da escassez de estudos referentes aos efeitos do glifosato em abelhas sem ferrão e visando preencher essa lacuna de conhecimento e contribuir para a conservação de abelhas nativas, o presente trabalho está organizado em três capítulos. O capítulo I é um protocolo de criação *in vitro* com objetivo de adaptar o método de produção de rainhas para a produção de operárias, oferecendo volumes de 25 e 27 μL de alimento larval e avaliando parâmetros como viabilidade de ovos e larvas de primeiro ínstar transferidas para placas de acrílico, taxa de emergência e mortalidade, tempo de desenvolvimento e parâmetros morfológicos como peso e tamanho da cabeça das operárias que emergiram em até 24 horas. Para comparação e validação do método, foram utilizadas abelhas operárias emergidas de células de cria naturais (*in vivo*).

Após a padronização deste protocolo (Capítulo I), o capítulo II é um estudo com o objetivo de demonstrar os efeitos subletais do glifosato em operárias produzidas *in vitro* após a ingestão oral de alimento larval contaminado com glifosato.

Apesar de *F. varia* ser uma abelha nativa sem ferrão, estudos de polinização em ambientes agrícolas e avaliações de riscos de agrotóxicos sobre a espécie ainda são escassos. Estudos prévios têm demonstrado que a espécie é generalista, coletando recursos de várias espécies de plantas e contribuindo na reprodução de plantas em áreas urbanas (Marques- Souza 2010; Aleixo *et al.* 2013), o que pode indicar que a espécie em áreas naturais possivelmente possa apresentar o mesmo comportamento, forrageando em áreas agrícolas ou em torno em busca de recursos, podendo ser expostas a agrotóxicos, como o glifosato. Os resultados deste estudo corroboram com a literatura demonstrando que *F. varia* apresenta biologia diferente de *A. mellifera* e contribuirão no entendimento sobre o impacto do glifosato na morfologia desta abelha nativa.

No capítulo III, apresentamos, pela primeira vez, o registro da ocorrência de populações do ácaro *Tyrophagus putrescentiae* e seu impacto negativo nas colônias de *F. varia*. Esperamos que estudos futuros visem determinar o detalhamento das interações ecológicas entre as espécies de abelhas e este ácaro, o que poderá contribuir para o planejamento de ações de

conservação das populações de abelhas e, conseqüentemente, a manutenção dos serviços de polinização.

2.1 Estabelecimento de um protocolo de criação *in vitro* de abelhas sem ferrão *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) para estudos ecotoxicológicos

Jaqueline Aparecida da Silva^{a*}, Angel Roberto Barchuk^b, Marina Wolowski^c

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas - Minas Gerais – Brasil

^bInstituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas – Minas Gerais - Brasil

^cInstituto de Ciências da Natureza, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas – Minas Gerais - Brasil

Autor para Correspondência. E-mail: jaqueline.a.silva28@gmail.com*

RESUMO

Atualmente, protocolos já estabelecidos para *Apis mellifera* estão sendo adaptados para avaliação de riscos de agrotóxicos em abelhas sem ferrão. Para preencher essa lacuna de conhecimento e contribuir para o planejamento de ações de conservação de abelhas nativas sem ferrão, utilizamos *Frieseomelitta varia* como modelo de estudo, com o objetivo de adaptar o método já descrito para a produção *in vitro* de rainhas para a produção de operárias, oferecendo volumes de 25 e 27 μL de alimento larval. Avaliamos os parâmetros viabilidade de ovos e larvas transferidas para placas de acrílico, emergência e mortalidade, tempo de desenvolvimento e parâmetros morfológicos como peso corporal e tamanho das operárias emergentes. Para comparação e validação do método, foram utilizadas abelhas operárias emergidas na colônia. Os resultados indicaram que o volume de 27 μL de alimento larval foi mais bem sucedido, promovendo o desenvolvimento de 93% das larvas transferidas ao longo de 33 dias. As análises morfológicas indicaram que não há diferenças significativas entre as operárias emergentes produzidas *in vitro* e as produzidas na colônia. O protocolo descrito resultou em taxas de emergência bem acima das estabelecidos pela OECD e das obtidas por outros estudos, sugerindo que pode ser usado para a criação de operárias de *F. varia* e uso em estudos ecotoxicológicos, servindo como modelo para outras espécies que tenham biologia semelhantes.

Palavras-chaves: Marmelada; Alimento larval; Fases de desenvolvimento; Diferenciação de castas; Produção de operárias; Padronização de Método; Conservação de abelhas.

ABSTRACT

Currently, protocols already established for *Apis mellifera* are being adapted to assess the risks of pesticides in stingless bees. To fill this knowledge gap and contribute to the planning of conservation actions for native stingless bees, we used *Frieseomelitta varia* as a study model, with the aim of adapting the method already described for the *in vitro* production of queens for the production of workers, offering volumes of 25 and 27 μL of larval food. We evaluated parameters such as viability of eggs and larvae transferred to acrylic plates, emergence and mortality, development time and morphological parameters such as body weight and size of the workers that emerged. For comparison and validation of the method, worker bees emerged *in vivo* were used. After analyzing the parameters, the results indicated that the volume of 27 μL of larval food was more successful, supporting the development of several workers over 33 days. After the morphological analyzes of the parameters of weight and head width of workers fed with 27 μL of larval food, the results indicated that there are no significant differences between the emerging workers produced *in vitro* and *in vivo*. The described protocol resulted in emergency rates well above those established by the OECD and those obtained by other studies, suggesting that it can be used for the breeding of *F. varia* workers and used in ecotoxicological studies, serving as a model for other species that have similar biology.

Key words: Marmalade; Larval food; Phases of development; Differentiation of caste; Production of workers; Standardization of Method; Conservation of bees.

Introdução

A polinização é um serviço ambiental crucial para a manutenção de ecossistemas naturais e agrícolas (Costanza *et al.* 1997; Ricketts *et al.* 2008) e a vasta biodiversidade global, incluindo espécies cultivadas, só pode ser preservada garantindo a diversidade de polinizadores (Kevan, 1999; Goulson *et al.* 2015). No Brasil, o valor do serviço ecossistêmico de polinização prestados por morcegos, mariposas, vespas, borboletas, moscas, besouros e abelhas para a produção de alimentos gira em torno de R\$ 43 bilhões por ano (BPBES/REBIPP 2019), e dentre esses animais, as abelhas são particularmente importantes na produção de alimentos (Klein *et al.* 2007).

No Brasil, são encontradas aproximadamente 244 espécies de abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) (Pedro 2014). Estas abelhas são responsáveis por 30% da

polinização da Caatinga brasileira e Ecossistemas do Pantanal, e até 90% da polinização de algumas espécies de plantas da Mata Atlântica e Amazônia (Kerr *et al.* 1999, 2001). Em áreas agrícolas, essas abelhas são importantes para a polinização de berinjela (*Solanum melongena*) (Nunes-Silva *et al.* 2013), café (*Coffea arabica*) (Nogueira-Neto *et al.* 1959), goiaba (*Psidium guajava*) (Alves e Freitas 2006), maçã (*Malus domestica*) (Viana *et al.* 2014), pimentão (*Capsicum annuum*) (Cruz *et al.* 2005; Faria Júnior *et al.* 2008; Roselino *et al.* 2010) e tomate (*Solanum lycopersicum*) (Del Sarto *et al.* 2005; Bartelli e Nogueira-Ferreira 2014).

Brasil é considerado um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (Fernandes *et al.* 2020) e investigar os possíveis impactos negativos desses produtos químicos na diversidade de abelhas nativas sem ferrão é de extrema importância para o planejamento de ações de conservação. No Brasil, os protocolos de avaliação de risco de agrotóxicos são baseados nos padrões da OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) para *Apis mellifera* (larvas e adultos) (OECD 2013; OECD 1998a, b), mesmo com a riqueza de espécies de abelhas sem ferrão do país. Portanto, há uma discussão entre os pesquisadores e órgãos governamentais se *A. mellifera* é uma abelha que pode substituir as espécies de abelhas sem ferrão brasileiras em avaliação de riscos de agrotóxicos, já que estudos têm mostrado que abelhas nativas diferem de *A. mellifera* em sua sazonalidade de emergência, expectativa de vida, grau de socialidade, comportamento de forrageamento, nidificação (Boyle *et al.* 2019) e diferenças nas vias de exposição à agrotóxicos (Cham *et al.* 2019). Outros estudos mostraram que também existem diferenças nos sistemas de alimentação (*e.g.*, abelhas sem ferrão Hartfelder *et al.* 2006; Roubik 1982) e (*e.g.*, *A. mellifera* Haydak 1970), e diferenças na sensibilidade a serem consideradas em resposta à toxicidade a agrotóxicos entre *A. mellifera* e algumas espécies de abelhas sem ferrão (*e.g.*, Jacob *et al.* 2013; Lourenço *et al.* 2012a, b; Costa *et al.* 2015; Soares *et al.* 2015; Lima *et al.* 2016; Bernardes *et al.* 2018; Boff *et al.* 2018; Moraes *et al.* 2018; Moreira *et al.* 2018; Ravaiano *et al.* 2018; Seide *et al.* 2018; Otesbelgue *et al.* 2018; Jacob *et al.* 2019).

Diante da preocupação dos pesquisadores e órgãos governamentais em encontrar uma espécie de abelha sem ferrão que possa ser representativa para outras espécies de abelhas nativas, vários protocolos estão sendo adaptados para avaliar os riscos de agrotóxicos em espécies de abelhas sem ferrão. Alguns estudos modificaram protocolos já disponíveis para *A. Mellifera* OECD (1998a, b), usando alimentadores de xarope (exposição oral) e/ou por uma gota no tórax (aplicação tópica), para a avaliação de risco de diferentes classes de agrotóxicos em várias espécies de abelhas nativas sem ferrão (*e.g.*, Padilha *et al.* 2020; Piovesan *et al.* 2020; Brito *et al.* 2020; Nocelli *et al.* 2019; Jacob *et al.* 2013).

Recentemente, também foi proposto um possível protocolo para a criação *in vitro* de larvas de abelha sem ferrão *Melipona scutellaris*, *Scaptotrigona postica* e *Tetragonisca angustula* para estudos toxicológicos (Dorigo *et al.* 2019; Rosa-Fontana *et al.* 2020), baseado no método de criação larval de *A. mellifera* (OECD 2013), com base no trabalho de Aupinel

et al. (2005, 2007). As abelhas *M. scutellaris* e *Scaptotrigona postica*, citadas anteriormente, utilizadas para possível padronização de métodos de criação *in vitro* de larvas, estão entre as cinco espécies brasileiras com grande potencial para serem utilizadas como organismos modelos na avaliação de risco de agrotóxicos (Viana-Silva 2017).

Para *Frieseomelitta varia* (Lepeletier 1836), nosso modelo de estudo, há evidências de que a quantidade de alimento larval ingerido pelas larvas é um fator importante na determinação de castas e, graças a isso, foi possível desenvolver métodos de criação *in vitro* de rainhas dessa espécie desenvolvidas por Baptistella e colaboradores (2009; 2012). Embora esse estudo tenha sido muito importante para a compreensão da determinação de castas e da quantidade de alimento larval presente em cada célula de cria, o foco foi exclusivamente a produção *in vitro* de rainhas e a multiplicação de colônias. Apesar de no estudo de Baptistella e colaboradores (2009; 2012) operárias tenham surgido ao acaso, vários aspectos do método ainda precisam ser ajustados para a produção de operárias em condições de laboratório. Além disso, as variáveis biológicas das abelhas *in vitro* emergidas ao acaso não foram medidas e comparadas com as operárias emergidas naturalmente na colônia.

Mais além, ainda são escassos os dados na literatura sobre a espécie em relação às culturas associadas e estudos relacionados à avaliação de risco de agrotóxicos. À medida que avançam os estudos sobre a biologia de *F. varia*, lacunas de conhecimentos são preenchidas sobre a espécie. Estudos futuros deverão investigar a associação da espécie com ambientes agrícolas, o que permitirá compreender quais são as rotas de exposição da espécie aos agrotóxicos e quais são as classes de agrotóxicos que têm mais contato durante o forrageamento e, conseqüentemente, avaliar os efeitos desses agrotóxicos sobre a espécie. Com bases nessas informações, essa e outras espécies de abelhas nativas sem ferrão, até o momento excluídas da matriz de seleção (Viana-Silva *et al.* 2017), poderão ser consideradas em um futuro próximo, contribuindo para uma melhor e mais robusto processo de análise de avaliação de riscos aos agrotóxicos e na elaboração de ações de conservação das populações de espécies de abelhas sem ferrão. Por esses motivos, é imprescindível preencher as lacunas de conhecimento e, uma possível padronização ou aprimoramento de uma técnica para criação *in vitro* de abelhas sem ferrão pode simular os efeitos reais dos agrotóxicos sobre *F. varia* na natureza, permitindo o planejamento de ações de conservação da espécie e, conseqüentemente, manutenção dos serviços de polinização.

Aqui testamos modificações do protocolo de Baptistella e colaboradores (2009; 2012) para o estabelecimento de um protocolo de criação *in vitro* de operárias de *F. varia*. Os experimentos focaram no volume de alimento larval ideal para a produção de operárias (aquele que permitiu o maior número de operárias emergidas), o teste de viabilidade de ovos e larvas no primeiro ínstar larval transferidos para placas de acrílico, o tempo de desenvolvimento e a influência da produção *in vitro* no peso corporal e largura da cabeça de abelhas em comparação com as abelhas emergidas naturalmente na colônia. Esta abordagem permite que o protocolo

resultante possa ser utilizado em estudos ecotoxicológicos com *F. varia* e com espécies de abelhas sem ferrão que apresentem semelhança biológica.

Material e Métodos

Sistema de estudo

Os experimentos foram realizados na Universidade Federal de Alfenas, Campus Sede (MG, Brasil), localizada no centro urbano da cidade (21°25'14,6"S, 45°56'52,8"W). A espécie de estudo foi *Frieseomelitta varia* (Lepeletier, 1836). Esta espécie é uma abelha de médio porte (aprox. 0,4 mm), vive em colônias perenes e apresenta aproximadamente 300 indivíduos no ninho. Os ovos e as larvas utilizados nas transferências foram obtidos de colônias de *Frieseomelitta varia* (Lepeletier, 1836) estabelecidas no Meliponário Experimental há aproximadamente três anos. Os indivíduos desta espécie de abelha são de médio porte (aprox. 0,4 mm), vivem em colônias perenes de aproximadamente 300 indivíduos. Para a escolha das três colônias da espécie em que o material biológico foi retirado, foram considerados requisitos como: colônias com ausência de doenças ou parasitas, colônias geneticamente não relacionadas, com base no número de células recém construídas, rainhas fortes e que apresentaram maior número de operárias.

Coleta e armazenamento do alimento larval

Para a alimentação de operárias criadas *in vitro*, foi utilizado o alimento presente nas células de cria recém construídas na colônia, identificadas pela coloração marrom-escuro de suas paredes. Módulos de madeira contendo células de cria recém operculadas foram retirados das colônias e levados ao laboratório. As células contendo ovos foram desoperculadas com pinça e os ovos foram seguidamente removidos. Em seguida, o alimento foi coletado com uma micropipeta automática (100 µL) e transferido para um microtubo de 1 mL. Após a coleta do alimento, o microtubo foi armazenado no freezer a - 20°C, onde foi mantido até o uso. A coleta de alimentos nas três colônias, estabelecidas como réplicas, foi realizada a cada 15 dias. Durante as coletas, nem todas as células de cria das colônias contendo ovos foram desoperculadas, deixando-as intactas para que novos indivíduos pudessem se desenvolver e emergir, desta forma, as colônias não enfraqueceram durante os experimentos.

Volume de alimento larval e transferência de amostras biológicas

Nesta etapa foi utilizada a técnica modificada de produção *in vitro* de rainhas *F. varia*. Sabendo que cada célula de cria contém aproximadamente 26,7 µL de alimento larval (para maiores detalhes ver Baptistella *et al.* 2009; 2012), volumes de alimento larval de 25 e 27 µL foram testados para a produção de operárias e, o volume de alimento larval com maior taxa de

emergência de abelhas na fase larval e abelhas emergentes, de acordo com Dorigo e colaboradores (2019) e OECD (2013), foi padronizado para a avaliação dos parâmetros biológicos e para validação do método.

Para os experimentos, foram utilizadas placas de acrílico do tipo ELISA, com 96 poços, medindo 0,7 mm de diâmetro e 1 cm de profundidade e volume total de 400 μ L. Durante a transferência de ovos ou larvas não é possível distinguir as células de cria nas quais as operárias, rainhas ou machos irão emergir. Para avaliar a viabilidade da transferência de ovos *in vitro* para a produção de operárias, volumes de 25 e 27 μ L de alimento larval foram transferidos para os poços da placa de acrílico com auxílio de uma micropipeta (100 μ L), e, em seguida, células de cria recém construídas de coloração marrom escuro foram desoperculadas e os ovos foram transferidos com a ajuda de uma agulha de transferência e depositados cuidadosamente sobre o alimento larval. Para cada volume larval, foram utilizadas três placas de acrílico, com três repetições em cada uma (triplicatas), contendo 10 ovos transferidos de três colônias diferentes, totalizando 90 ovos para cada volume de alimento larval.

Além da transferência de ovos para avaliação da viabilidade, larvas de primeiro ínstar larval (recém-eclodidas, L1) também foram transferidas para placas de acrílico utilizando o mesmo método da transferência de ovos. Nesse experimento, para cada volume de alimento larval, foram utilizadas três placas de acrílico, com três repetições e cada uma contendo 10 larvas, totalizando 180 larvas para cada volume de alimento larval. O número de ovos e larvas utilizados foi o disponível de acordo com o número de indivíduos das colônias desta espécie (aproximadamente 300). Os experimentos de coleta de ovos e larvas não foram realizados simultaneamente e, as colônias das quais o alimento larval foi retirado, foram utilizadas para a obtenção de ovos e larvas.

Após a transferência, as placas com ovos ou larvas foram colocadas dentro de um recipiente de plástico, seladas com filme de PVC e os recipientes foram tampados. Durante os experimentos *in vitro*, observamos que a maioria das larvas transferidas em ambos os volumes de alimento larval não consumiram completamente o alimento presente nas cavidades das placas, durante o período de $5,3 \pm 0,75$ dias (média \pm desvio padrão), deixando restos de alimento larval nas células artificiais. Após o período de alimentação, 4 dias depois (9 ± 1), as larvas iniciaram o período de defecação e após isso, observou-se a proliferação de fungos, causando a mortalidade de algumas abelhas nesta fase de desenvolvimento.

Com a presença de microrganismos nas placas devido aos restos de alimento larval e excreta das larvas, estas foram transferidas com o auxílio de um palito com barbante adaptado para captura de larvas (Figura 1, E), e foram colocadas em outras placas de acrílico limpas e esterilizadas (Figura 1, F) e, conseqüentemente, o sucesso nas taxas de emergência deveu-se à transferência das larvas para outros recipientes e também pela criação do método de captura de larvas para posterior transferência. A adaptação do palito com barbante para captura das larvas, ao contrário da pinça não lesionou seus corpos no momento da transferência e,

consequentemente, não houve mortalidade das larvas após a definição deste método (Figura 2).

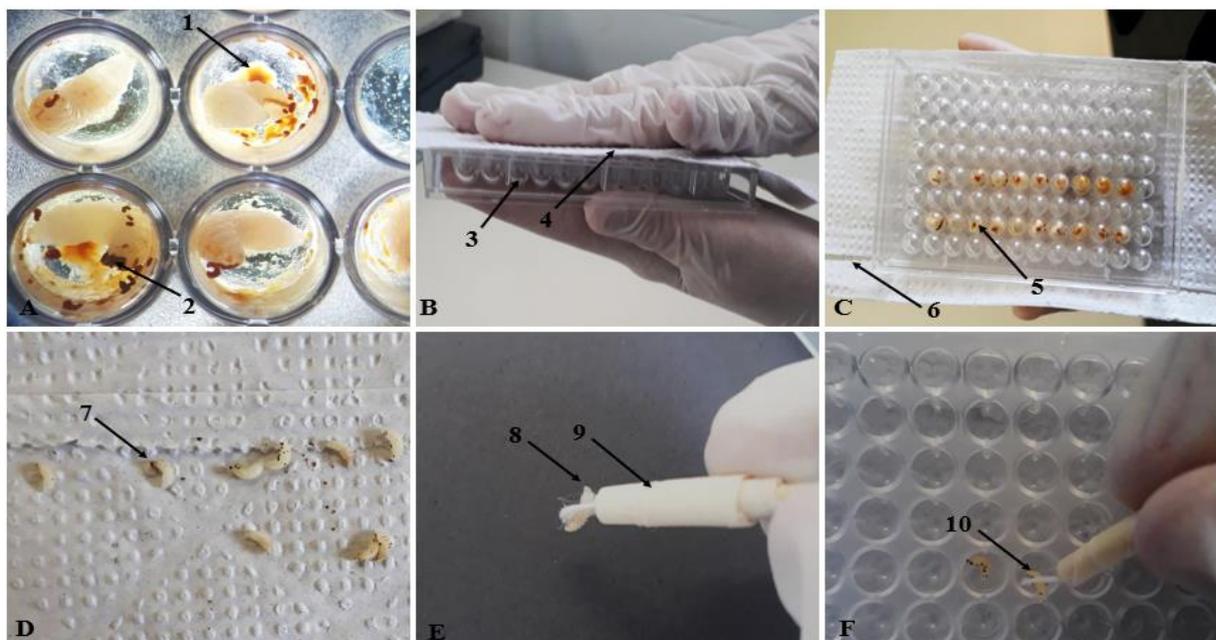


Figura 1. Procedimentos realizados para transferência de larvas para placas de acrílico limpas e esterilizadas. **A)** A seta (1) indica restos de alimento deixados durante o final do período de alimentação e (2) indica o início de defecação larval. **B)** Preparo das larvas para transferência, seta (3) indica larvas dentro das cavidades da placa com presença de restos de alimento larval e no período de defecação e (4) indica papel toalha. **C)** A seta (5) indica a placa de acrílico com as cavidades voltadas para baixo e (6) papel toalha **D)** Larvas transferidas para papel toalha. **E)** A seta (8) indica a coleta de larvas e (9) Palito com barbante antisséptico adaptado para capturar as larvas. **F)** Larvas transferidas para placas de acrílico limpas e esterilizadas. Fonte própria.

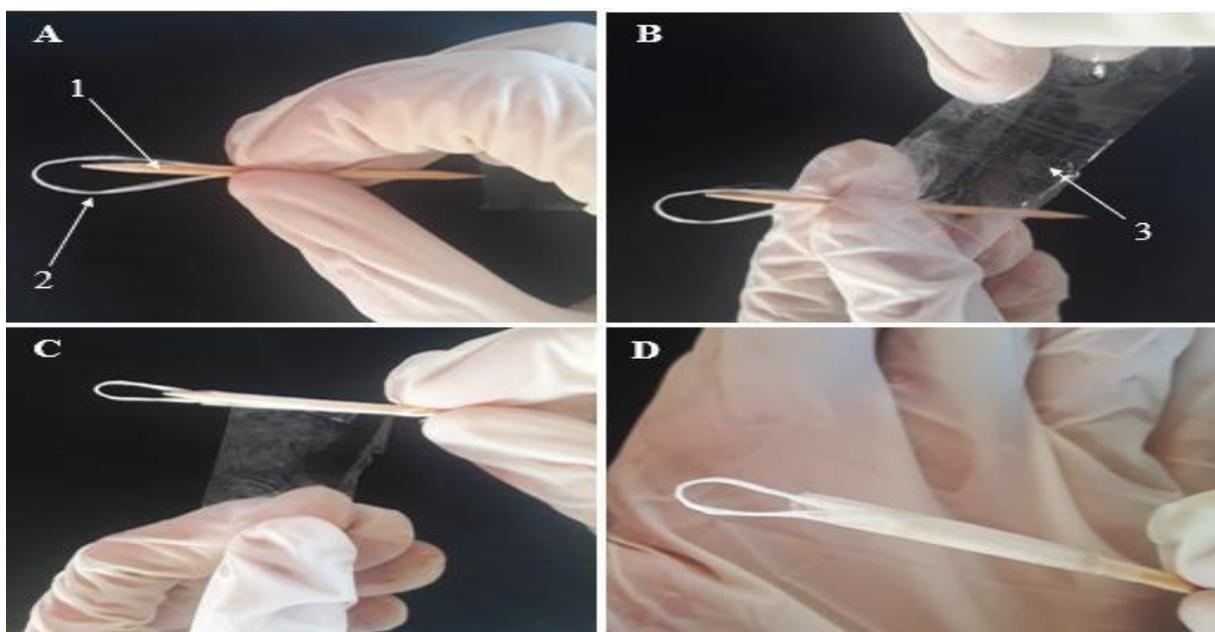


Figura 2. Criação de um método de captura de larvas. **A)** A seta (1) indica o palito e (2) indica a linha anti-séptica ajustada ao palito. **B)** A seta (3) indica uma fita adesiva (qualquer fita pode ser usada). **C)** A fita foi enrolada em volta do palito, prendendo a linha ao palito. **D)** Método de captura de larvas (as larvas têm formato de “C” e se encaixam perfeitamente com o método de captura com linha).

A umidade foi controlada de acordo com Menezes e colaboradores (2013). Todas as amostras foram acondicionadas em estufa de incubação tipo BOD (demanda bioquímica de

oxigênio) a 30°C e com 99% de umidade relativa durante o período de alimentação das larvas. A umidade foi reduzida para 75% durante os dias adicionais de desenvolvimento. Foi adicionada uma solução de cloreto de sódio (NaCl) em um pote plástico com água destilada presente dentro da estufa para que a umidade fosse controlada. A solução saturada de NaCl presente na estufa foi substituída a cada sete dias para evitar qualquer tipo de proliferação de microrganismos, de modo que a saúde das larvas e ovos nos experimentos não fossem afetadas. Os parâmetros físicos foram registrados com um termo-higrômetro. Diariamente, enquanto as abelhas transferidas eram monitoradas em estereomicroscópio (Carl-Zeiss-Promenade 10), os indivíduos mortos com coloração escura eram removidos das placas com o auxílio de cotonetes.

Parâmetros para validação do método

Após a padronização do volume de alimento larval (μL) e a fase de desenvolvimento de transferência viável para a produção de operárias *in vitro*, considerando a taxa de emergência de larvas e emergência de operárias, foi necessário determinar alguns parâmetros temporais para a validação do método de criação *in vitro*, tais como: tempo do período de defecação, tempo de desenvolvimento e a emergência de adultos. Essas variáveis foram observadas e registradas diariamente após a transferência das larvas. Assim, foi possível comparar nossos resultados com as taxas de mortalidade de larvas e emergência de operárias já obtidas para a abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* (Dorigo *et al.* 2019) e para *A. mellifera* (OECD 2013) criadas *in vitro* a partir do primeiro ínstar larval.

Para comparar as abelhas emergidas *in vitro* com as obtidas na colônia e verificar possíveis alterações morfológicas decorrentes da criação *in vitro*, foram registrados o peso individual das abelhas e a largura da cabeça das mesmas. Para comparação de abelhas *in vitro* com abelhas obtidas na colônia, 10 células de cria com coloração amarelo claro, com abelhas no estágio (Pbd) visíveis - olho marrom escuro, corpo com apêndices bem pigmentados, tórax e abdômen claros (Hartfelder *etal.* 2006) foram removidas cuidadosamente de três colônias (totalizando 30 abelhas) e levadas para o laboratório e colocadas nas mesmas condições de temperatura e umidade dos demais experimentos até a emergência de adultos para posterior análises. Para o número amostral *in vitro*, também foram usadas 30 abelhas.

O peso individual das operárias *in vitro* e obtidas na colônia foi avaliado 24 h após a emergência em balança analítica modelo ALC – 210.4. As mesmas abelhas que foram pesadas foram utilizadas para análise da largura da cabeça. Para isso, os corpos das operárias foram ajustados e colocados em placas de Petri com fundo preto e fotografados com câmera digital acoplada em estereomicroscópio (Carl-Zeiss-Promenade 10). As fotografias foram utilizadas para realizar a medição da largura da cabeça com auxílio do software ImageJ versão 1.8. O tempo de desenvolvimento *in vitro* também foi monitorado diariamente para 30 abelhas (10 / experimento) apenas para o volume larval em que foi obtida a maior taxa de sobrevivência larval / emergência de operárias.

Análises estatísticas

Os dados relativos ao número amostral de larvas transferidas para placas de acrílico nos dois volumes de alimento larval (μL), a sobrevivência, a mortalidade e a emergência de ovos / larvas no 5º dia de experimento (após o consumo total do alimento larval fornecido) e as variáveis biológicas como peso e largura da cabeça foram analisados em ambiente R (R Core Team 2016). As premissas de normalidade dos dados foram testadas por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para dados normais usamos análise de variância (ANOVA) e o teste de Kruskal-Wallis para dados que não apresentaram distribuição normal. Os valores de probabilidade foram considerados significativos quando menores que 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Viabilidade de ovos transferidos

Testamos a viabilidade de ovos para a produção de operárias *in vitro* de *F. varia* e os resultados indicaram que os dados de mortalidade de ovos e dos poucos sobreviventes que se tornaram operárias, transferidos nos volumes de 25 e 27 μL de alimento larval, não seguiram uma distribuição normal ($W = 0,828$, $p = 0,003$). Quando foi usado o protocolo com 25 μL de alimento larval, foi obtida uma taxa de 12% de emergência e registrada a mortalidade imediata de 88% de ovos após a transferência ($n = 90$). Com o volume de 27 μL de alimento larval foi obtida uma taxa de 10% na emergência e 90% de mortalidade de indivíduos ($n = 90$). O teste de Kruskal-Wallis indicou que não há diferenças estatísticas entre os experimentos e que os volumes 25 e 27 μL não influenciaram na sobrevivência de ovos ou no número abelhas emergentes ($X^2 = 4,857$, $df = 4$, $p = 0,302$).

Viabilidade da transferência de larvas

Um total de 200 operárias de *F. varia* foram criadas utilizando o método desenvolvido para produção *in vitro* de abelhas sem ferrão (Tabela 1). O teste de Shapiro-Wilk indicou que a sobrevivência e mortalidade de larvas analisadas, seguiram distribuição normal, respectivamente ($W = 0,862$, $p = 0,053$). A análise de variância (ANOVA) indicou a existência de diferença significativa na sobrevivência e mortalidade entre o grupo de larvas alimentadas com 25 e as alimentadas com 27 μL de alimento, respectivamente ($F = 13,45$, $p < 0,004$) (Tabela 1). As larvas alimentadas com 27 μL de alimento ($n = 180$) mostraram maiores taxas de sobrevivência (87%; $n = 158$) com apenas 12% de mortalidade ($n = 22$) ($\leq 15\%$). As larvas alimentadas com 25 μL de alimento mostraram menores taxas de sobrevivência, 61% ($n = 111$), e 38% de mortalidade ($n = 69$) ($\geq 15\%$).

Em relação à emergência de operárias alimentadas com volumes de 25 e 27 μL de alimento larval, o teste de Shapiro-Wilk indicou que as amostras analisadas não seguiram

distribuição normal ($W = 0,842$, $p = 0,029$). O teste de Kruskal-Wallis indicou que não há diferenças estatísticas entre os volumes de alimento larval testados experimentalmente e a emergência de operárias ($X^2 = 11$, $df = 8$, $p = 0,201$).

Tabela 1. Taxas de mortalidade e sobrevivência de larvas de *Frieseomelitta varia* transferidas para a produção *in vitro* de operárias com diferentes quantidades de alimento larval (μL).

Teste	Volume de alimento larval(μL)	Transferência de larvas	Taxa sobrevivência de larvas		Taxa emergência de operárias		Taxa mortalidade de larvas	
			Número	%	Número	%	Número	%
1	25	90	60	66	22	36	30	33
2	25	90	51	56	31	60	39	43
Total		180	111	61	53	47	69	38
3	27	90	81	90	72	89	9	10
4	27	90	77	85	75	97	13	14
Total		180	158	87	147	93	22	12

Transferência de larvas = 90 (30°C e umidade 99%).

Taxa de sobrevivência de larvas: número de larvas sobreviventes após o consumo total de alimento larval (μL) e defecação (30°C e umidade 75%).

Taxa de emergência de operárias: número de larvas que atingiram a idade adulta e emergiram (30°C e umidade 75%).

Taxa de mortalidade de larvas: número de larvas que morreram durante o período de alimentação e defecação (30°C e umidade 75%).

Para fins de comparação, *Melipona scutellaris*, a sobrevivência de larvas foi 80,2%; emergência de operárias 92,61% e mortalidade larval de 9,82% (Dorigo *et al.* 2019).

≤ 15 Taxa de mortalidade indicada pela (OECD 2013).

Morfologia de operárias in vitro e in vivo

Peso

As abelhas emergidas de larvas alimentadas com 27 μL de alimento larval, a quantidade de alimento que demonstrou maior taxa de abelhas emergidas ($n = 147$), foram comparadas com as das colônias considerando tamanho da cabeça e peso corporal. Os resultados mostraram que não há diferenças significativas no peso de operárias produzidas *in vitro* e abelhas produzidas naturalmente ($X^2 = 49,49$, $df = 42$, $p = 0,198$). O peso médio para o método *in vitro* foi de $0,098 \text{ mg} \pm 0,015$ e para as abelhas *in vivo* foi de $0,0146 \text{ mg} \pm 0,028$. O teste de Shapiro-Wilk indicou que as amostras analisadas não seguiram uma distribuição normal ($W = 0,928$, $p = 0,001$).

Largura da cabeça

As análises individuais da largura da cabeça das operárias produzidas *in vitro* ($n = 30$) e da colônia ($n = 30$) indicaram que não há diferenças significativas ($X^2 = 10,64$, $df = 10$, $p = 0,385$). As operárias *in vitro* apresentaram uma média da largura da cabeça de $0,22 \text{ mm} \pm 0,2$ e indivíduos naturalmente emergidos nas colônias com uma média da largura da cabeça de $0,23 \text{ mm} \pm 0,1$. O teste de Shapiro-Wilk indicou que as amostras analisadas não seguiram uma

distribuição normal ($W = 0,944$, $p = 0,008$).

Desenvolvimento in vitro

Verificamos que o ciclo de desenvolvimento de operárias de *F. varia* desde o primeiro ínstar larval (fase que mostrou viabilidade para a produção de operárias *in vitro*) até a fase adulta tem duração média de $33,3 \pm 0,57$ dias (média e desvio padrão). A Tabela 2 mostra o *timing* de eventos que ocorreram durante as fases de desenvolvimento pós-embrionário das operárias *F. varia* produzidas com 27 μL de alimento larval ($n = 30$). A figura 3 mostra as características do desenvolvimento dos indivíduos em cada fase de acordo com a coloração do corpo, olho e antena.

Tabela 2. *Timing* de eventos ocorridos durante o desenvolvimento de operárias com base na intensidade da pigmentação do olho, protocolo proposto para operárias de *F. varia*, como sugerido por Hartfelder e colaboradores (2006).

Teste	Período de alimentação	Defecação	Pré-pupa	Pupa olho branco	Pupa olho rosa	Pupa olho castanho claro	Pupa olho castanho escuro	Emergência
1	5	9	12	16	18	19	24	33
2	6	8	12	16	18	21	25	34
3	5	10	12	18	20	23	25	33
Média	$5,3 \pm 0,75$	9 ± 1	12 ± 0	$16,6 \pm 1,15$	$18,6 \pm 1,15$	21 ± 2	$24,6 \pm 0,57$	$33,3 \pm 0,57$

*Os números ordinais indicam os dias exatos a partir do dia da transferência em que os eventos ocorreram ($n = 10$ / teste).

\pm indica os valores dos desvios padrão das médias.

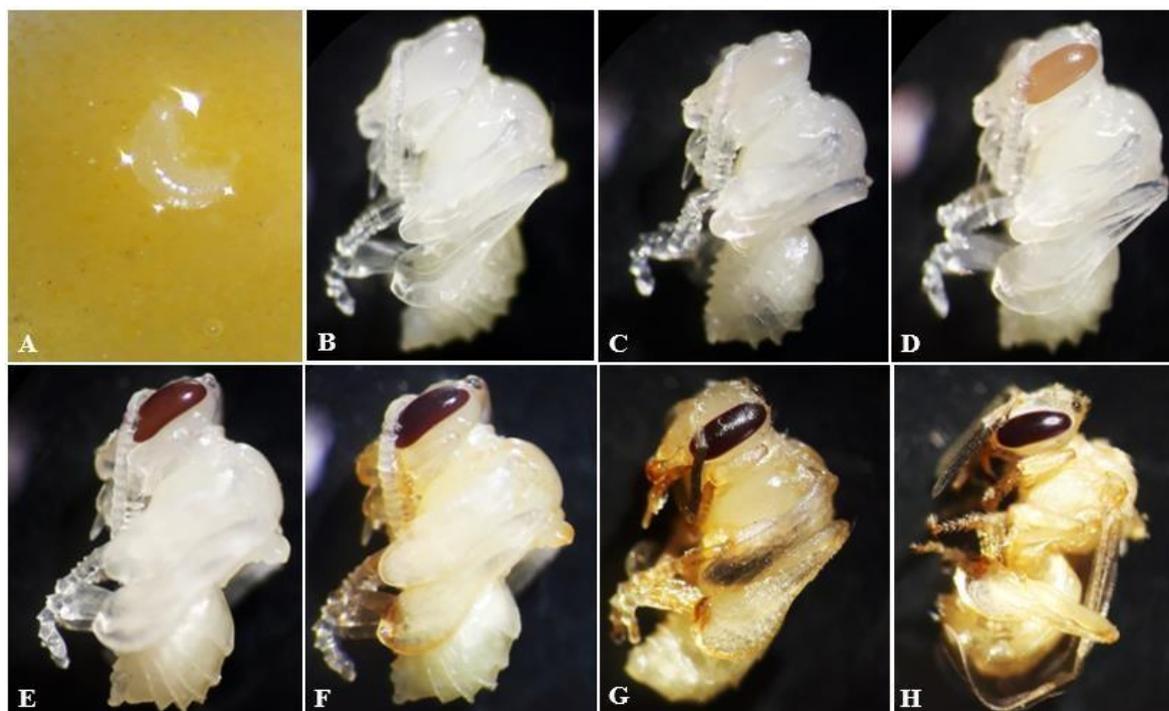


Figura 3. Fotos representativas de operárias de *Frieseomelitta varia* criadas *in vitro* em diferentes fases do desenvolvimento pós-embrionário. **A)** Larva transferida para placa de acrílico com 27 μL de alimento larval (30°C e 99% umidade). **B)** Pw - Pupa com olho branco; corpo sem pigmentação; antenas brancas (30°C e 75% umidade). **C)** Pp - Olho rosa; corpo sem pigmentação; antenas brancas (30°C e 75% umidade). **D)** Pb - Olho castanho claro; sem pigmentação; antenas brancas (30°C e 75% umidade). **E)** Pbl – Olho marrom escuro; corpo sem pigmentação;

antenas brancas (30°C e 75% umidade). **F)** Pbm – Olho marrom escuro, corpo com apêndices mediantemente alaranjados; antenas brancas (30°C e 75% umidade). **G)** Pbd – Olho marrom escuro, corpo com apêndices bem pigmentados; antenas pretas (Tórax + abdômen claros) (30°C e 75% umidade). **H)** Recém-emergida (Tórax e abdômen claros); antenas pretas (30°C e 75% umidade). Fases de desenvolvimento modificadas de Hartfelder e colaboradores (2006). Imagens feitas em lupa (Carl-Zeiss-Promenade 10). Fonte própria.

DISCUSSÃO

Nossos resultados indicaram que ovos transferidos tiveram baixa viabilidade para a produção de operárias adultas, independentemente da quantidade de alimento fornecido. De acordo com Velthuis e Velthuis (1998) dentro das células de cria, larvas e ovos precisam manter contato com o ar para respirar, sendo que os ovos na posição vertical entram em contato com o líquido por apenas um sétimo de seu comprimento e por aproximadamente 5% de seu volume. Em nosso estudo, possivelmente, os ovos transferidos com a agulha de transferência ficaram submersos no líquido presente nas cavidades das células artificiais. Este fator pode ter contribuído para a alta taxa de mortalidade dos ovos durante os experimentos (25 μ L = 88%; 27 μ L = 90%), inviabilizando o uso de ovos para a criação *in vitro* de operárias.

Os experimentos em que foram transferidas larvas de primeiro ínstar resultaram em altas taxas de sobrevivência larval e emergência de operárias. Nos quatro experimentos realizados com os volumes de 25 e 27 μ L de alimento larval, registramos diferenças significativas nas taxas de sobrevivência e mortalidade larval. Se considerarmos o protocolo proposto pela OECD (2013) em testes ecotoxicológicos para larvas de *A. mellifera*, os tratamentos controle (sem agrotóxicos) não devem ultrapassar 15% de mortalidade a cada repetição. Em nosso estudo, embora a exposição larval a agrotóxicos não tenha ocorrido experimentalmente, as duas repetições em que larvas foram alimentadas com 27 μ L de alimento larval foram mais bem sucedidas, não excedendo 15% de mortalidade larval por experimento, fornecendo inúmeras operárias ao longo de $33,3 \pm 0,57$ dias (média \pm desvio padrão) com uma taxa de emergência de 93% (n = 180).

Quando foram fornecidos 25 μ L de alimento larval, apenas 47% dos indivíduos se tornaram operárias, com mortalidade larval superior a 15%. A diferença registrada em nossos experimentos na sobrevivência de larvas em função da quantidade de alimento fornecido pode estar relacionada à quantidade total de alimento ingerido. Isto porque nem as larvas que receberam 25 μ L nem as que receberam 27 μ L conseguiam consumir todo o volume de alimento fornecido (quantidades equivalentes de restos de alimento sempre eram observados ao final do período de alimentação). Porém, desde que um dos grupos recebia maior quantidade de alimento (27 μ L), seus indivíduos terminavam alimentando-se mais que os indivíduos do outro grupo (25 μ L), tornando suas condições mais semelhantes às registradas normalmente na colônia. Estes resultados sugerem que o fornecimento de 27 μ L de alimento larval pode ser adotado em futuros estudos ecotoxicológicos de exposição larval *in vitro* de *F. varia* a

agrotóxicos ou para outros estudos que requeram a disponibilidade de operárias em desenvolvimento pós-embrionário em condições controladas.

Conforme estabelecido anteriormente neste estudo, o volume de alimentolarval que proporcionaria o maior número de operárias seria utilizado como protocolo para avaliação dos parâmetros biológicos. As abelhas criadas *in vitro* com 27 μ L de alimento larval não mostraram diferenças significativas no peso corporal e largura da cabeça em comparação com operárias emergidas naturalmente na colônia, ou seja, as abelhas não apresentaram alterações morfológicas devido aos parâmetros físicos, manipulação e pela quantidade de alimento larval oferecido. Embora tenha resultados satisfatórios, recomenda-se que estudos futuros estudos devem replicar essa técnica aqui proposta e investiguem a influência do volume 27 μ L de alimento larval proposto, com resultados também satisfatórios, para que o protocolo aqui proposto seja aceito e padronizado.

As abelhas alimentadas com 27 μ L de alimento larval apresentaram diferenças mínimas na duração de cada fase de desenvolvimento, desde a transferência de primeiro ínstar larval até a fase adulta. As células de cria de *F. varia* apresentam a estrutura em forma de cacho (favos de cria), e durante o processo de desoperculação das células para a transferência de larvas para as placas, observou-se que os ovos nas posições superiores do ninho eclodiram primeiro do que os ovos no centro do favo. Ao transferir algumas larvas para placas de acrílico que emergiram em aproximadamente 24 horas em suas células de cria, período antes da transferência para as placas, possivelmente expliquem as diferenças mínimas entre cada fase de desenvolvimento (Figura 4).

Baptistella (2009), estudando a criação *in vitro* de rainhas da mesma espécie de abelha sem ferrão, aqui estudada, não relataram diferenças de tempo durante o desenvolvimento das poucas abelhas que se tornaram operárias ao acaso, com duração em média de $22,56 \pm 2,38$ dias. Resultados similares por Dorigo e colaboradores (2019) também mostraram diferenças mínimas na emergência de operárias *M. scutellaris* produzidas *in vitro*, que completaram seu desenvolvimento em média de $41,4 \pm 2,7$ dias, possivelmente devido ao formato do favo e ao tempo de emergência das larvas dentro da colônia antes da transferência para placas de cultivo. Assim, em nosso estudo, a ocorrência de diferenças mínimas nos indivíduos criados *in vitro* não inviabiliza o método, uma vez que o desenvolvimento de abelhas alimentadas com volume de 27 μ L de alimento larval foi semelhante ao descrito por Hartfelder e colaboradores (2006) e a taxa de sobrevivência e mortalidade de larvas e emergência de adultos foi positiva de acordo com o estabelecido na literatura (OECD 2013; Dorigo *et al.* 2019). Deste modo, sugerimos que estudos futuros com abelhas sem ferrão *in vitro* levem em consideração a estrutura das células de cria e em que posição do favo se encontram os ovos mais velhos e recentemente colocados pela rainha dentro da colônia.



Figura 4. Exemplos das células de cria do ninho da espécie *Frieseomelitta varia* em formato de cacho. **A)** Potes de pólen. **B)** Células de cria na parte superior do ninho com coloração marrom claro com larvas recém-emergidas. **C)** Células de cria no centro do ninho com coloração marrom e com ovos recentemente colocados pela rainha. **D)** Células de cria com coloração clara com pupas em desenvolvimento. Fonte própria.

O estabelecimento de um protocolo é a primeira etapa para a obtenção de um método padronizado e, a partir daí, para a validação de um método (Dorigo *et al.* 2019). Para isso, critérios como comportamento pós-emergência podem ser avaliados dentro da colônia, bem como avaliação do forrageamento, para que de fato, o protocolo tenha ampla confiança. Outro ponto importante, em bioensaios de abelhas expostas a agrotóxicos e abelhas controles (sem contaminação) podem ser comparadas com abelhas emergidas em condições naturais, onde a espécie em estudo é afetada pelo agrotóxico em exposição e não por alterações morfológicas por estressores do método *in vitro*, como demonstrado por alguns estudos de criação *in vitro* de abelhas sem ferrão não expostas a agrotóxicos (*e.g.*, operárias Dorigo *et al.* 2019) (*e.g.*, rainhas Hartfelder e Engels 1992; Baptistella *et al.* 2009; Baptistella *et al.* 2012; Menezes *et al.* 2013).

Embora estudos de padronização de métodos para abelhas sem ferrão, estejam sendo desenvolvidos e adaptados com resultados satisfatórios, padronização do método de criação *in vitro* da abelha sem ferrão *F. varia* apresenta diversas vantagens, a espécie possui registros de ocorrência na Bahia, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo e Tocantins (Pedro 2014), distribuição mais ampla em comparação às espécies *M. scutellaris* e *S. postica*, estudadas para possível padronização de métodos como organismo-modelo para representarem a fauna nativa brasileira (Dorigo *et al.* 2019; Rosa-Fontana *et al.* 2020), visto que segundo Viana-Silva e colaboradores (2017), quanto mais ampla a distribuição geográfica de uma espécie, maior a chance de ser um bom substituto para *A. mellifera* em estudos de avaliação de riscos de

agrotóxicos em abelhas sem ferrão. Outro ponto importante a ser considerado é que de acordo com o Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, lançado em 2018 pelo ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade), *F. varia* foi categorizada como Menos Preocupante (LC), enquanto *M. scutellaris*, enfrenta risco de extinção na natureza (EN). Sabendo disso, estudos futuros devem avaliar outras espécies de abelhas sem ferrão classificadas como menos preocupantes e levar em consideração a distribuição geográfica e disponibilidade de espécies na natureza que possam substituir *M. scutellaris* na padronização de métodos de criação *in vitro* e em estudos ecotoxicológicos com o objetivo da conservação da espécie.

A compreensão das diferenças na biologia de espécies de abelhas sem ferrão quanto nos sistemas de castas e sexo, genética, desenvolvimento e comportamento na colônia, são fatores fundamentais para entender os efeitos dos agrotóxicos nas espécies de abelhas sem ferrão em estudo. Estudos de castas isoladas, oferecem possíveis novas possibilidades para a elaboração de protocolos voltados à produção específica de machos, rainhas e operárias em condições de laboratório, permitindo compreender os impactos dos agrotóxicos em castas isoladas, visto que embora as abelhas forrageiras estejam mais expostas aos agrotóxicos na busca de recursos, machos e rainhas também podem ser afetados dentro da colônia e podem haver diferenças na sensibilidade entre castas (Valdovinos-Nunez *et al.* 2009), no caso de diferenciação de castas pela quantidade de alimento larval consumido durante o desenvolvimento.

Declaração de interesse

Os autores declaram não haver potenciais conflitos de interesse.

Financiamento

Este trabalho foi apoiado pelo CNPq (Processo: 406734/2018-6), a FINEP/PROINFRA (01/2008) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código 001.

ORCID

Jaqueline Aparecida da Silva  <https://orcid.org/0000-0002-4786-6114>

Angel Roberto Barchuk  <https://orcid.org/0000-0001-8417-2763>

Marina Wolowski  <https://orcid.org/0000-0001-5481-1472>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, J. E., & Freitas, B. M. (2006). Comportamento de pastejo e eficiência de polinização de cinco espécies de abelhas em flores de goiabeira (*Psidium guajava* L.). *Revista Ciência Agronômica*, 37 (2), 216-220.
- Aupinel, P., Fortini, D., Dufour, H., Tasei, J., Michaud, B., Odoux, J., & Pham-Delegue, M. (2005). Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of insectology*, 58 (2), 107.
- Aupinel, P., Fortini, D., Michaud, B., Marolleau, F., Tasei, J. N., & Odoux, J. F. (2007). Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new in vitro standardized feeding method. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 63 (11), 1090-1094.
- Baptistella, A. R. (2009). *Produção “in vitro” de rainhas e ocorrência natural de machos de Frieseomelitta varia (Apidae: Meliponina)* (Doctoral dissertation, Master Thesis. University of São Paulo, Brazil).
- Baptistella, A. R., Souza, C. C., Santana, W. C., & Soares, A. E. E. (2014). Techniques for the in vitro production of queens in stingless bees (Apidae, Meliponini). *Sociobiology*, 59 (1), 297-310.
- Bartelli, B. F., & Nogueira-Ferreira, F. H. (2014). Pollination services provided by *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Meliponini) in greenhouses with *Solanum lycopersicum* L.(Solanaceae). *Sociobiology*, 61 (4), 510-516.
- Bernardes, R. C., Barbosa, W. F., Martins, G. F., & Lima, M. A. P. (2018). The reduced-risk insecticide azadirachtin poses a toxicological hazard to stingless bee *Partamona helleri* (Friese, 1900) queens. *Chemosphere*, 201, 550-556.
- Boff, S., Friedel, A., Mussury, R. M., Lenis, P. R., & Raizer, J. (2018). Changes in social behavior are induced by pesticide ingestion in a Neotropical stingless bee. *Ecotoxicology and environmental safety*, 164, 548-553.
- Boyle, N. K., Pitts-Singer, T. L., Abbott, J., Alix, A., Cox-Foster, D. L., Hinarejos, S., ... & Steeger, T. (2019). Workshop on pesticide exposure assessment paradigm for non-*Apis* bees: foundation and summaries. *Environmental entomology*, 48 (1), 4-11.
- BPBES/REBIPP (2019): Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil. Marina Wolowski; Kayna Agostini; André Rodrigo Rech; Isabela Galarda Varassin; Márcia Maués; Leandro Freitas; Liedson Tavares Carneiro; Raquel de Oliveira Bueno; Hélder Consolaro; Luisa Carvalheiro; Antônio Mauro Saraiva; Cláudia Inês da Silva; Padgurschi M. C. G. (Org.). 1ª edição, Campinas, SP. 184 páginas. ISBN: 978-85- 60064-83-0.
- Brito, P., Elias, M., Silva-Neto, C., Sujii, E., Silva, D., Gonçalves, B., & Franceschinelli, E. (2020). The effects of field-realistic doses of imidacloprid on *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) workers. *Environmental Science and Pollution Research*, 27 (31), 38654-38661.

- Cham, K. O., Nocelli, R. C., Borges, L. O., Viana-Silva, F. E. C., Tonelli, C. A. M., Malaspina, O., ... & Rocha, M. C. L. (2019). Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. *Environmental entomology*, 48 (1), 36-48.
- Costa, L. M. D. (2015). Avaliação dos efeitos associados dos inseticidas fipronil e imidacloprido sobre a mortalidade da abelha nativa *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811).
- Costanza, R., d'Arge, R., De Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., ... & Van Den Belt, M. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *nature*, 387 (6630), 253-260.
- Cruz, D. D. O., Freitas, B. M., Silva, L. A. D., Silva, E. M. S. D., & Bomfim, I. G. A. (2005). Pollination efficiency of the stingless bee *Melipona subnitida* on greenhouse sweet pepper. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40 (12), 1197-1201.
- de Moraes, C. R., Travençolo, B. A. N., Carvalho, S. M., Beletti, M. E., Santos, V. S. V., Campos, C. F., ... & Bonetti, A. M. (2018). Ecotoxicological effects of the insecticide fipronil in Brazilian native stingless bees *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini). *Chemosphere*, 206, 632-642.
- Del Sarto, M. C. L., Peruquetti, R. C., & Campos, L. A. O. (2005). Evaluation of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) as pollinator of greenhouse tomatoes. *Journal of Economic Entomology*, 98 (2), 260-266.
- Dorigo, A. S., Rosa-Fontana, A. D. S., Soares-Lima, H. M., Galaschi-Teixeira, J. S., Nocelli, R. C. F., & Malaspina, O. (2019). In vitro larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. *PloS one*, 14 (3), e0213109.
- Dos Santos, C. F., Acosta, A. L., Dorneles, A. L., Dos Santos, P. D., & Blochtein, B. (2016). Queens become workers: pesticides alter caste differentiation in bees. *Scientific reports*, 6 (1), 1-9.
- Faria Júnior, L. R. R., Bendini, J. D. N., & Barreto, L. M. R. C. (2008). Eficiência polinizadora de *Apis mellifera* L. e polinização entomófila em pimentão 'Cascadura Ikeda'. *Bragantia*, 67 (2), 261-266.
- Fernandes, C. L. F., Volcão, L. M., Ramires, P. F., De Moura, R. R., & Júnior, F. M. R. D. S. (2020). Distribution of pesticides in agricultural and urban soils of Brazil: a critical review. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 22 (2), 256-270.
- Fürst, M. A., McMahon, D. P., Osborne, J. L., Paxton, R. J., & Brown, M. J. F. (2014). Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature*, 506 (7488), 364-366.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347 (6229).
- Hartfelder, K., & Engels, W. (1992). Allometric and multivariate analysis of sex and caste polymorphism in the neotropical stingless bee, *Scaptotrigona postica*. *Insectes Sociaux*, 39 (3), 251-266.

- Hartfelder, K., Makert, G. R., Judice, C. C., Pereira, G. A., Santana, W. C., Dallacqua, R., & Bitondi, M. M. (2006). Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie*, 37 (2), 144-163.
- Haydak, M. H. (1970). Honey bee nutrition. *Annual review of entomology*, 15(1), 143-156.
- ICMBio. (2018). Livro Vermelho de Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Vol. 1. Brasília.
- Jacob, C. R. O., Soares, H. M., Carvalho, S. M., Nocelli, R. C. F., & Malaspina, O. (2013). Acute toxicity of fipronil to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 90 (1), 69-72.
- Jacob, C. R., Malaquias, J. B., Zanardi, O. Z., Silva, C. A., Jacob, J. F., & Yamamoto, P. T. (2019). Oral acute toxicity and impact of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. and *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology*, 28 (7), 744-753.
- Kearns, C. A., Inouye, D. W., & Waser, N. M. (1998). Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual review of ecology and systematics*, 29 (1), 83-112.
- Kerr, W. E., Carvalho, G. A., Silva, A. C. D., & Assis, M. D. G. P. D. (2010). Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias estratégicas*, 6 (12), 20-41.
- Kerr, W. E., Nascimento, V. A., & Carvalho, G. A. (1999). Preservation of native Brazilian bees: a question of historical and ecological conscience. *Ciênc. cult.(São Paulo)*, 390-3.
- Kevan, P. G. (1999). Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Invertebrate Biodiversity as Bioindicators of Sustainable Landscapes*, 373-393.
- Klein, A. M., Vaissiere, 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: biological sciences*, 274 (1608), 303-313.
- Lima, M. A. P., Martins, G. F., Oliveira, E. E., & Guedes, R. N. C. (2016). Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. *Journal of Comparative Physiology A*, 202 (9), 733-747.
- Lourenço, C. T., Carvalho, S. M., Malaspina, O., & Nocelli, R. C. (2012a). Determination of fipronil LD50 for the Brazilian bee *Melipona scutellaris*. *Julius-Kühn-Archiv*, (437), 174.
- Lourenço, C. T., Carvalho, S. M., Malaspina, O., & Nocelli, R. C. F. (2012b). Oral toxicity of fipronil insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 89 (4), 921-924.
- Menezes, C., Vollet-Neto, A., & Fonseca, V. L. I. (2013). An advance in the in vitro rearing of stingless bee queens. *Apidologie*, 44 (5), 491-500.
- Moreira, D. R., Sinópolis Gigliolli, A. A., Falco, J. R. P., Julio, A. H. F., Volnistem, E. A., Chagas, F. D., ... & Ruvolo-Takasusuki, M. C. C. (2018). Toxicity and effects of the neonicotinoid thiamethoxam on *Scaptotrigona bipunctata* lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae). *Environmental toxicology*, 33 (4), 463-475.

- Nocelli, R., Soares, S., & Monquero, P. (2019). Efeito de Herbicidas na Sobrevivência de Abelhas Nativas Brasileiras *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). *Planta Daninha*, 37.
- Nogueira-Neto, P., Carvalho, A., & Antunes Filho, H. (1959). Efeito da exclusão dos insetos polinizadores na produção do café Bourbon. *Bragantia*, 18 (UNICO), 441-468.
- Nunes-Silva, P., Hrnair, M., da SILVA, C. I., Roldão, Y. S., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2013). Stingless bees, *Melipona fasciculata*, as efficient pollinators of eggplant (*Solanum melongena*) in greenhouses. *Apidologie*, 44 (5), 537-546.
- OECD. (1998 a). Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test [Internet]. OECD [citado 2020 Dez 11]. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2). Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-213-%20honeybees-acute-oral-toxicity%20test9789264070165-en>.
- OECD. (1998 b). Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test [Internet]. OECD [cited 2019 Sep 10]. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2). Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-214-%20honeybees-acute-contact-toxicitytest_9789264070189-en.
- OECD. (2013). No Test. 237: Honey Bee (*Apis Mellifera*) Larval Toxicity Test, Single Exposure [Internet]. [citado 2020 Dez 11]. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2). Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-237-honey-bee-apis-mellifera-larvaltoxicity-test%20singleexposure9789264203723-en>.
- Otesbelgue, A., Dos Santos, C. F., & Blochtein, B. (2018). Queen bee acceptance under threat: Neurotoxic insecticides provoke deep damage in queen-worker relationships. *Ecotoxicology and environmental safety*, 166, 42-47.
- Padilha, A. C., Piovesan, B., Morais, M. C., Pazini, J. D. B., Zotti, M. J., Botton, M., & Grützmacher, A. D. (2020). Toxicity of insecticides on Neotropical stingless bees *Plebeia emerina* (Fries) and *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz)(Hymenoptera: Apidae:Meliponini). *Ecotoxicology*, 29 (1), 119-128.
- Pedro, S. R. (2014). The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera:Apidae). *Sociobiology*, 61 (4), 348-354.
- Piovesan, B., Padilha, A. C., Morais, M. C., Botton, M., Grützmacher, A. D., & Zotti, M. J. (2020). Effects of insecticides used in strawberries on stingless bees *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera: Apidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 27 (34), 42472-42480.
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.Rproject.org/>.
- Rafael Valdovinos-Nunez, G., Quezada-Euán, J. J. G., Ancona-Xiu, P., Moo-Valle, H., Carmona, A., & Ruiz Sánchez, E. (2009). Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Journal of economic entomology*, 102 (5), 1737-1742.

- Ravaiano, S. V., Barbosa, W. F., Tomé, H. V. V., de Oliveira Campos, L. A., & Martins, G. F. (2018). Acute and oral exposure to imidacloprid does not affect the number of circulating hemocytes in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* post immune challenge. *Pesticide biochemistry and physiology*, 152, 24-28.
- Ricketts, T. H., Regetz, J., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., Bogdanski, A., ... & Viana, B. F. (2008). Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns?. *Ecology letters*, 11 (5), 499-515.
- Rosa-Fontana, A., Dorigo, A. S., Galaschi-Teixeira, J. S., Nocelli, R. C., & Malaspina, O. (2020). What is the most suitable native bee species from the Neotropical region to be proposed as model-organism for toxicity tests during the larval phase?. *Environmental Pollution*, 265, 114849.
- Roselino, A. C., dos Santos, S. A. B., & Bego, L. R. (2010). Qualidade dos frutos de pimentão (*Capsicum annuum* L.) a partir de flores polinizadas por abelhas sem ferrão (*Melipona quadrifasciata* anthidioides Lepeletier, 1836 e *Melipona scutellaris* Latreille, 1811) sob cultivo protegido. *Revista brasileira de Biociências*, 8 (2).
- Seide, V. E., Bernardes, R. C., Pereira, E. J. G., & Lima, M. A. P. (2018). Glyphosate is lethal and Cry toxins alter the development of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Environmental Pollution*, 243, 1854-1860.
- Soares, H. M., Jacob, C. R. O., Carvalho, S. M., Nocelli, R. C. F., & Malaspina, O. (2015). Toxicity of imidacloprid to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 94 (6), 675-680.
- Velthuis, B. J., & Velthuis, H. H. W. (1998). Columbus surpassed: Biophysical aspects of how stingless bees place an egg upright on their liquid food. *Naturwissenschaften*, 85(7), 330-333.
- Viana, B. F., da Encarnação Coutinho, J. G., Garibaldi, L. A., Bragança Gastagnino, G. L., Peres Gramacho, K., & Oliveira da Silva, F. (2014). Stingless bees further improve apple pollination and production. *Journal of Pollination Ecology*, 14.
- Viana-Silva, F., Pires, C., Torezani, K., Borges, L., Cham, K., Dias, C., ... & Ferraz, A. (2017). Selection matrix for Brazilian bee species to risk assessment of pesticides. Whitehorn, P. R., O'connor, S., Wackers, F. L., & Goulson, D. (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336 (6079), 351- 352.

2.2 Efeitos de doses subletais de glifosato na morfologia da abelha sem ferrão *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Jaqueline Aparecida da Silva^a, Angel Roberto Barchuk^b, Marina Wolowski^c

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas - Minas Gerais – Brasil

^bInstituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais – Brasil

^cInstituto de Ciências da Natureza, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais – Brasil

Autor para Correspondência. E-mail: jaqueline.a.silva28@gmail.com*

Resumo

O herbicida glifosato é o agrotóxico mais utilizado no mundo. Embora seu alvo sejam plantas daninhas, os insetos benéficos para o ecossistema, como as abelhas, têm mostrado repostas negativas quando expostas ao glifosato em condições de laboratório. A maioria dos estudos de avaliações de risco do herbicida focaram em *Apis mellifera* e poucas espécies de abelhas sem ferrão foram estudadas. Para compreender os potenciais impactos negativos deste herbicida em abelhas sem ferrão, este estudo teve como objetivo avaliar alterações na morfologia externa após a emergência de abelhas de *Frieseomelitta varia* que sobreviveram à exposição larval. Nossos resultados mostraram que o glifosato diluído no alimento larval não gerou mortalidade para as abelhas na fase larval. Contudo, nas abelhas sobreviventes que atingiram a fase adulta foram observadas malformações nas asas daquelas expostas à maior concentração de 1000 (ng / 27 µL de alimento larval). A maioria das anomalias foi observada nas asas anteriores. As larvas expostas à maior concentração de glifosato tiveram repostas negativas ao herbicida durante o período de pré-pupa e operárias emergentes. Isto pode ter ocorrido pois, possivelmente, as proteínas responsáveis pelo desenvolvimento, como as hexamerinas, foram afetadas pelo herbicida. Consequentemente, em condições de laboratório, a resposta das abelhas *F. varia* ao glifosato indica que este agrotóxico é um estressor que afeta o desenvolvimento dos indivíduos. Além de mostrar que o glifosato pode alterar a homeostasia de colônias naturais da espécie, os resultados também sugerem que seu uso em altas concentrações pode promover alterações morfológicas das operárias, o que pode impactar a sobrevivência das populações naturais e gerar efeitos cascatas em processos ecológicos, os quais as abelhas realizam como a polinização de plantas cultivadas e nativas.

Palavras – chave: Abelha marmelada; Agrotóxicos; Fases de desenvolvimento; Produção *in vitro*; Malformações nas asas; Conservação.

Abstract

Glyphosate herbicide is the most used pesticide worldwide. Although they target weeds, ecosystem-beneficial insects such as bees have negative responses when exposed to glyphosate under laboratory conditions. Most herbicide risk studies focused on *Apis mellifera* and stingless bee species were studied. To understand the potential negative impacts of the herbicide on stingless bees, this study aimed to evaluate changes in external morphology after emergence of bees that survived larval exposure. Our limited results show that glyphosate diluted in larval feed did not generate mortality for bees in the larval stage. Furthermore, in surviving bees that reached an adult stage malformations were observed in the wings of those exposed to the highest concentration of 1000 (ng / 27 μ L of food larval). Most anomalies were observed in the forewings. Larvae exposed to the highest concentration of glyphosate had negative responses to the herbicide during the prepupae period and emerging workers. This may have occurred because, possibly, those responsible for development, such as hexamerins, were affected by the herbicide. Consequently, under laboratory conditions, the response of *Frieseomelitta varia* bees to glyphosate indicating that it is a stressor that affects the individual's development. In addition to showing that glyphosate can change the homeostasis of natural colonies of the species, the results also improved that its use in high can promote morphological changes in workers, which can impact these natural populations and generate cascading effects on ecological processes which cause bees perform as the pollination of cultivated and native plants.

Keywords: Bee marmalade; Pesticides; Development phases; In vitro production; Wing malformations; Conservation.

Introdução

Nas últimas décadas, o declínio de populações de abelhas silvestres e o distúrbio do colapso das colônias de *Apis mellifera* têm preocupado pesquisadores e apicultores (Pires *et al.* 2016). Embora exista uma discussão em andamento sobre se realmente estamos enfrentando uma “crise global de polinizadores”, não há dúvida de que populações de muitas abelhas sociais e solitárias estão em declínio (Allsopp *et al.* 2008; Ghazoul 2005a, b; Steffan-Dewenter *et al.* 2005). Associados ao declínio nas populações de abelhas, vários fatores foram propostos como possíveis causas de perdas maciças. Algumas hipóteses sugerem mudanças no uso da terra, perda de habitat e fragmentação (Winfree *et al.* 2009), patógenos, mudanças climáticas, espécies invasoras (Brown *et al.* 2009; Potts *et al.* 2016; Goulson *et al.* 2015), manejo inadequado das colônias (Van Engelsdorp *et al.* 2009), uso de agrotóxicos (Rundlöf *et al.*

2015; Woodcock *et al.* 2016; Woodcock *et al.* 2017) ou, mais provavelmente a interação entre todos estes fatores (Potts *et al.* 2016; Di Pasquale *et al.* 2013; Brunner *et al.* 2014; Bryden *et al.* 2013; Di Prisco *et al.* 2013; Doublet *et al.* 2015; Manley *et al.* 2017).

Entre os agrotóxicos mais utilizados em áreas agrícolas para o controle de plantas daninhas e relatados como nocivos aos insetos polinizadores está o herbicida glifosato (GLY). O GLY (C₃H₈NO₅P) pertence ao grupo dos inibidores da síntese de aminoácidos e contém o N-(N- (fosfonometil) glicina como ingrediente ativo (Bridges 2003). O glifosato é classificado como herbicida não seletivo, sistêmico e pós emergência (Duke e Powles 2008) e é usado para controle de plantas daninhas (Goldsborough e Brown 1988). Anualmente, 600 a 750 mil toneladas de GLY são usadas globalmente e, estima-se que até 2025, 740 a 920 mil toneladas serão usadas (Maggi *et al.* 2019). Em 2019, o glifosato foi o agrotóxico mais comercializado no Brasil, com 217.592,24 Kg de ingrediente ativo (IBAMA 2019). O GLY previne o crescimento de plantas daninhas ao inibir determinadas vias da síntese de aminoácidos aromáticos que presumivelmente só existem em plantas, microorganismos e fungos (Franz *et al.* 1997). No entanto, muitos estudos mostraram efeitos prejudiciais desse herbicida em vários organismos, incluindo rãs (Howe *et al.* 2004; Meza-Joya *et al.* 2013), peixes (Do Carmo Langiano e Martinez, 2008; Marques *et al.* 2014, 2015; Moreno *et al.* 2014) e insetos (Kale *et al.* 1995; Kaya *et al.* 2000). Entre os insetos, o GLY pode ter efeitos subletais em insetos benéficos não-alvo e benéficos ao meio ambiente como, por exemplo, em abelhas *Apis mellifera* (Herbert *et al.* 2014; Balbuena *et al.* 2015).

Embora estudos de toxicidade tenham mostrado os efeitos negativos subletais e letais do GLY em abelhas, estes foram quase exclusivamente focados em *A. mellifera* em estágios imaturos e adultos (Vázquez *et al.* 2020; Blot *et al.* 2019; Zhu *et al.* 2017; Abraham *et al.* 2018; Dai *et al.* 2018; Goñalons e Farina *et al.* 2018; Vázquez *et al.* 2018; Motta *et al.* 2018; Faita *et al.* 2018; Balbuena *et al.* 2015; Helmer *et al.* 2015; Herbert *et al.* 2014; Boily *et al.* 2013; Gregorc e Ellis, 2011; Gregorc *et al.* 2012). Poucos estudos foram realizados em abelhas nativas (em estágios imaturos e adultos) (Nocelli *et al.* 2019; Seide *et al.* 2018; Abraham *et al.* 2018). Nestas abelhas, como em *A. mellifera*, é provável que as colônias de abelhas possam ser afetadas por seu contato direto com agrotóxicos quando forrageiras visitam as lavouras tratadas (Valdovinos-Nunez *et al.* 2009). Além disso, os herbicidas são usados fora dos arredores rurais das plantações comerciais. Atualmente, seu uso se estende à áreas urbanas como em jardins de residências e áreas verdes em cidades (Matthews 2006), onde as abelhas podem potencialmente coletar recursos alimentares (Balbuena *et al.* 2015) e, ao retornar à colônia, podem carregar recursos florais potencialmente contaminados com resíduos que, posteriormente, serão processados pelas nutridoras e oferecidos à prole (Rortais *et al.* 2005; Hartfelder *et al.* 2006) por provisionamento massal (Michener 1974; Nogueira-Neto 1997).

Para determinar os efeitos de agrotóxicos, como o herbicida glifosato, nos polinizadores, é pertinente investigar não apenas os impactos nas abelhas em ambientes agrícolas, mas

também testar as respostas das abelhas em condições controladas de laboratório. Colônias de abelhas sociais presentes em ambientes agrícolas experimentam condições do mundo real, mas investigações em laboratório permitem detectar impactos sutis e inferir riscos potenciais que poderiam ser mascarados em contextos mais complexos (Farina *et al.* 2019). Os riscos que o uso do glifosato representam para a saúde das abelhas em nível individual e social na colônia têm sido avaliados por meio de estudos de efeitos de DL₅₀ (dose letal média, 50%) e subletais CL₅₀ (concentração letal média, 50%) em condições de laboratório. Embora os resultados de DL₅₀ pareçam indicar que o GLY não é prejudicial para as abelhas, estudos apresentam evidência de efeitos subletais prejudiciais do GLY em diferentes aspectos do comportamento, fisiologia e desenvolvimento de *A. mellifera* (Herbert *et al.* 2014; Balbuena *et al.* 2015; Faita *et al.* 2018; Vázquez *et al.* 2020). Esses efeitos se manifestam em diferentes momentos do ciclo de vida das abelhas, o que sugere que as alterações na biologia das operárias pode acarretar perturbações na dinâmica do polietismo etário e, assim, no equilíbrio da colônia (Wu *et al.* 2017; Farina *et al.* 2019).

Considerando este contexto, a importância dos meliponínios e a escassez de informações referentes aos efeitos do GLY em abelhas sem ferrão, este estudo é o primeiro a avaliar os efeitos subletais desse herbicida em *Frieseomelitta varia*. Apesar da escassez de informações sobre o papel de *F. varia* como polinizadora em cultivos agrícolas e sobre os riscos de agrotóxicos para esta espécie, sabe-se que a presença dessa espécie, e de outras espécies de abelhas, contribuíram na qualidade e no peso dos frutos em cultivo de pimenta-doce (*Capsicum annuum*) (Nascimento *et al.* 2012), também foram registradas como polinizadores de flores de pimentão (*Capsicum annuum*) e goiaba (*Pisidium guajava*) (BPBES/REBIPP 2019), além de *F. varia* ter um papel na reprodução de espécies de plantas em área urbana (Marques-Souza 2010; Aleixo *et al.* 2013).

Para determinar os efeitos da ingestão de alimentos contaminados com GLY em *F. varia*, criamos as operárias de primeiro ínstar larval em condições de laboratório, de três colônias diferentes, expostas a diferentes concentrações de GLY diluídas no alimento larval. Em seguida, avaliamos os efeitos de mortalidade durante o estágio larval e alterações morfológicas externas nas abelhas sobreviventes após 24 horas de emergência de adultos causadas pela alimentação contendo glifosato em relação a condições controle.

Materiais e Métodos

Sistema de estudo

Larvas de *Frieseomelitta varia* (Lepeletier 1836) foram coletadas de colônias presentes no Meliponário Experimental da Universidade Federal de Alfenas (21°25'14,6"S, 45°56'52,8"W), *campus* Sede, Alfenas, Minas Gerais, Brasil. A área do meliponário é localizada dentro do perímetro urbano do município, com intenso movimento de veículos e

cercado por residências. Para a seleção das três colônias (réplicas) das quais as abelhas foram coletadas, foram considerados requisitos como: colônias com ausência de doenças ou parasitas, colônias geneticamente não relacionados, com base no número de células recém-criadas, com grande disponibilidade de alimentos larvais, rainhas fortes e que apresentavam maior número de operárias.

Criação in vitro

Para a criação *in vitro* de operárias, seguimos o método descrito por Baptistella e colaboradores (2009; 2012) e adaptado (Capítulo 1), usando 27 μL de alimento larval. Os procedimentos de coleta de amostras, armazenamento de alimento larval, número de larvas e parâmetros físicos dentro da estufa (BOD, Demanda bioquímica de oxigênio) também seguiram o protocolo descrito no Capítulo 1. Após o período de alimentação, as larvas foram transferidas para placas novas, limpas e esterilizadas de acordo com o protocolo para evitar a proliferação de fungos.

Determinação dos efeitos do herbicida glifosato

Os procedimentos de avaliação dos efeitos orais do princípio ativo do glifosato e as concentrações aqui propostas, foram baseados a partir do estudo de Dorigo e colaboradores (2019). Para os bioensaios, o glifosato foi diluído diretamente no alimento larval. Diluições subsequentes foram realizadas no alimento larval para atingir as concentrações a serem oferecidas às larvas (em ng de ingrediente ativo / larva): 1000, 500, 250, 125. Após as diluições, usamos uma micropipeta automática (100 μL) para transferir 27 μL deste alimento larval contaminando para placas de acrílico para as larvas se alimentarem. Assim, como as larvas de abelhas sem ferrão consomem todo o alimento depositado na célula de criação, é possível determinar a concentração total ingerida.

Cada experimento foi desenvolvido separadamente e consistiu de três repetições com 10 larvas em cada concentração ($n = 540$). O controle negativo foi dado pelas larvas alimentadas com 27 μL de alimento larval sem adição de glifosato. Para verificar a mortalidade das larvas expostas ao glifosato e do grupo controle, removemos cuidadosamente as tampas dos recipientes de plásticos, e placas de acrílico mantidas no interior dos recipientes com amostras biológicas foram levadas para serem observadas em estereomicroscópio (Carl-Zeiss-Promenade 10). As larvas mortas foram identificadas pela ausência de movimento do espiráculo e alimentação ou pela presença de coloração escura, sendo então removidas com auxílio de cotonetes. A mortalidade dos indivíduos foi registrada pelo monitoramento diário de cada indivíduo ao longo do período de alimentação (120 horas) e avaliada diariamente até 48 horas após o término da alimentação (168 horas de experimento).

Emergência de adultos e alterações morfológicas

Após o registro da mortalidade de larvas durante as primeiras 168 horas de experimento, foi avaliada também a emergência de operárias para cada concentração e controle. Os adultos foram inspecionados visualmente após 33 dias em busca de deformidades morfológicas externas observáveis e os indivíduos deformados, que geralmente exibiam apêndices malformados (ou seja, asas contorcidas ou não esticadas, pernas, antenas, tromba ou tarso), foram fotografados sob estereomicroscópio (Carl-Zeiss-Promenade 10) para posteriores análises.

Análises estatísticas

A mortalidade de larvas expostas ao glifosato foi determinada com os dados de mortalidade de 144 e 168 horas, que corresponderam a 24 e 48 horas, respectivamente, após o consumo de alimentos contaminados com o herbicida. As pressuposições de normalidade dos dados foram avaliadas por meio do teste de Shapiro Wilk. Para dados normais usamos análise de variância (ANOVA) e teste de Kruskal-Wallis para dados que não apresentaram distribuição normal. Os valores de probabilidade foram considerados significativos quando menores que 5% ($p < 0,05$), usando a função *summary* () em ambiente R (R Core Team 2016).

Resultados

Mortalidade de larvas expostas ao herbicida glifosato

A mortalidade larval durante a alimentação e defecação não diferiu entre as concentrações de glifosato ($X^2 = 6,573$; $df = 6$; $p = 0,362$) (Tabela 1). O teste Shapiro-Wilk indicou que os dados não seguiram distribuição normal ($W = 0,652$; $p = 4,833$).

Tabela 1. Mortalidade média de larvas de *Frieseomelitta varia* no grupo controle e entre concentrações de glifosato ng / 27 μ L de alimento larval ao longo do período de exposição (sete dias). N° amostral = número de larvas de primeiro ínstar transferidas, Mortalidade = número de larvas mortas durante o período de exposição, Percentual = porcentagem de larvas mortas, Mediana = mediana do número de larvas mortas, Desvio padrão = desvio padrão da quantidade de larvas mortas por tratamento.

Tratamento	N° amostral	Mortalidade	Percentual (%)	Média	Mediana	Desvio Padrão
Controle	90	9	10	1	0	1,802
125	90	6	7	0,666	0	0,866
250	90	8	9	0,888	0	1,166
500	90	10	11	1,111	0	1,536
1000	90	12	13	1,333	0	3,278

Emergência de operárias

Os resultados indicaram diferenças significativas na emergência de operárias sobreviventes da exposição de larvas entre as concentrações de glifosato ($X^2 = 23,74$; $d.f. = 10$; $p = 0,001$). O grupo controle apresentou o maior número de operárias emergidas ($n = 81$),

seguido pela concentração de 125 ng / 27 μ L de alimento larval (n = 69). Em relação às concentrações 250, 500 e 1000, os resultados indicaram um número menor de operárias emergentes (Tabela 2, Figura 1). O teste de Shapiro-Wilk indicou que os dados não apresentam distribuição normal (W = 0,911; p = 0,002).

Tabela 2. Emergência de operárias de *Frieseomelitta varia* alimentadas com alimento larval com diferentes concentrações de glifosato ng / 27 μ L de alimento larval e grupo controle 27 μ L de alimento larval. N° amostral = número de larvas de primeiro ínstar transferidas, Emergência = número de larvas emergentes durante o período de exposição, Percentual = porcentagem de larvas emergentes, Mediana = mediana de larvas emergentes, Desvio padrão = desvio padrão da quantidade de larvas emergente por tratamento. Valor de média de emergência de operárias por Silva e colaboradores 2020 (Capítulo 1).

Concent.	N° amostral	Emergência	Percentual (%)	Média	Mediana	Desvio Padrão
Controle	90	81	90	9	10	1,802
125	90	62	69	6,888	8	2,666
250	90	40	44	4,444	4	3,205
500	90	35	39	3,888	4	2,848
1000	90	24	27	2,666	3	2,061

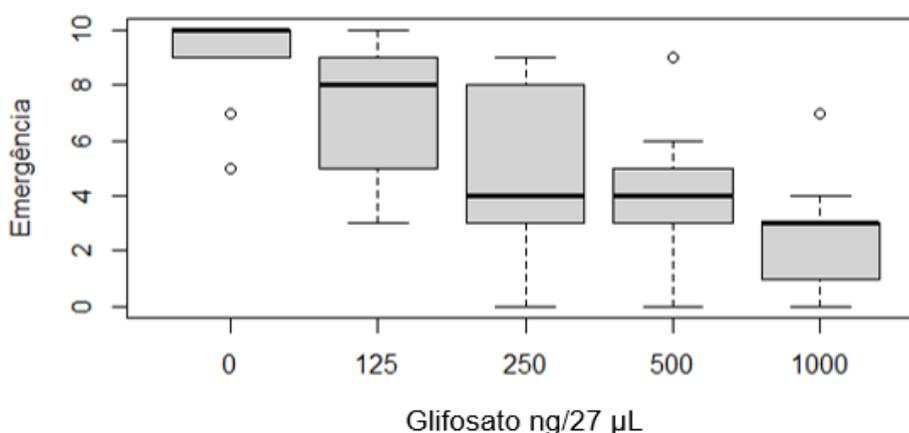


Figura 1: A emergência de adultos da espécie *Frieseomelitta varia* sobreviventes ao longo do período de exposição larval ao glifosato ng / 27 μ L e controle de 27 μ L de alimento larval.

Alterações morfológicas

Trinta e seis operárias recém-emergidas (7% de 242) expostas na fase larval à concentração de 1000 ng glifosato / 27 μ L de alimento larval apresentaram asas anteriores com malformações (Figura 1, A, B, C, D e E). As abelhas nas demais concentrações não apresentaram malformações observáveis externamente. As abelhas submetidas à concentração de 1000 ng glifosato / 27 μ L de alimento larval apresentaram uma variedade de anomalias observadas após 24 h da emergência de operárias. As abelhas dos grupos controle não apresentaram alterações na morfologia das asas (Figura 2 F).

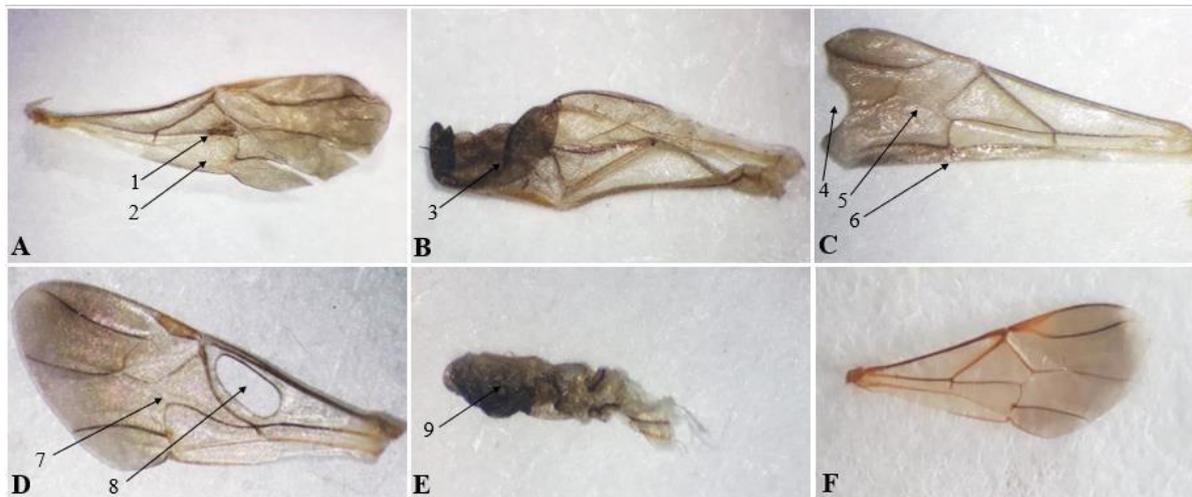


Figura 2. Deformações nas asas anteriores de operárias *Frieseomelitta varia* expostas oralmente ao glifosato / 27 μL de alimento larval e oferecido às larvas no primeiro ínstar larval em placas de cultura a 30°C e 99% umidade. **A)** (1) indica uma mancha na célula medial e veia Cu; (2) indica ausência da veia V de operárias emergidas exposta a concentração de 1000 ng glifosato / 27 μL de alimento larval. **B)** Asa anterior dobrada de operárias emergidas exposta a concentração de 1000 ng glifosato / 27 μL de alimento larval. **C)** Asa anterior (4) indica alterações na parte distal da asa; (5) ausência da (veia Rs+M) que completa a célula submarginal; (6) ausência da bifurcação da asa (localizada na parte inferior da asa, abaixo da célula Cu2) de abelhas emergidas na concentração de 1000 ng glifosato / 27 μL de alimento larval. **D)** (7) deformações na veia 1 m-cu; (8) presença de um furo na célula radial de abelhas expostas a concentração de 1000 ng glifosato / 27 μL de alimento larval. **E)** Asa anterior amassada de operárias emergidas exposta a concentração de 1000 ng glifosato / 27 μL de alimento larval. **F)** Asa anterior controle sem resíduos de glifosato. Morfologia das asas descrita de acordo com Michener 2007. Imagens obtidas com lupa (Carl-Zeiss-Promenade 10).

Discussão

Neste estudo, demonstramos que a ingestão do herbicida glifosato nas concentrações propostas não foi letal durante a fase larval, mas pode ter efeitos subletais graves na sobrevivência e no desenvolvimento da abelha sem ferrão *Frieseomelitta varia*. Os efeitos subletais foram observados principalmente como deformidades nas asas de abelhas operárias recém-emergidas após 33 dias de desenvolvimento *in vitro*. A morfologia das asas sofreu desenvolvimento anormal em pelo menos (7% das abelhas recém-emergidas) em resposta à exposição de larvas de primeiro ínstar apenas nas concentrações altas de glifosato, com diversas anormalidades observadas nas asas de abelhas expostas à concentração de 1000 ng de glifosato / 27 μL de alimento larval.

O desenvolvimento anormal das asas observados não parece ser devido ao método de criação *in vitro* de operárias, já que as abelhas do grupo controle não apresentaram alterações na morfologia das asas. Ademais, em um estudo anterior de padronização de método de criação *in vitro* de operárias, utilizando a mesma espécie de abelha sem ferrão, não foram constatadas alterações morfológicas nas asas decorrentes da criação *in vitro*, com uma taxa satisfatória de emergência de 82% (Capítulo 1).

O glifosato parece estar relacionado a mudanças morfológicas em animais e humanos. Estudos indicam que o glifosato é capaz de causar deformidades em embriões de rãs e galinhas

(Paganelli *et al.* 2010). Em áreas com aplicação intensiva de herbicidas à base de glifosato, onde há culturas resistentes (por exemplo, Argentina e Paraguai), foram registrados impactos negativos na saúde humana, incluindo defeitos de nascença (Antoniou *et al.* 2012). Em abelhas, malformações na morfologia das asas de espécies de abelhas (como as observadas neste estudo) podem comprometer a atividade de forrageamento, uma vez que prejudicam a atividade de voo.

Estudos anteriores demonstraram que a mortalidade observada de abelhas *A. mellifera* criadas em condições de laboratório, expostas as concentrações de glifosato (2,5, 5 e 10 mg^l⁻¹) e abelhas forrageiras em campo aberto (2,5 e 5 mg), expostas oralmente ao glifosato nas concentrações recomendadas para pulverização e nas medidas ambientais, parece ser baixa (Balbuena *et al.* 2015; Herbert *et al.* 2014). Embora o glifosato não seja letal nas concentrações recomendadas, a exposição ao longo do tempo prejudica a sensibilidade à recompensa do néctar, aprendizado associativo (Herbert *et al.* 2014) e capacidades cognitivas (Balbuena *et al.* 2015). Enquanto outro estudo mostrou que *A. mellifera* e *Hypotrigona ruspollii* expostas duas vezes à concentração recomendada apresentaram mortalidade elevada (Abraham *et al.* 2018). Esses resultados sugerem que a saúde da ninhada na colônia de abelhas na natureza pode ser substancialmente prejudicada quando as abelhas forrageiras coletam recursos como pólen e néctar em áreas contaminadas com quantidade elevada ou baixa de resíduos de glifosato.

Contudo, para *F. varia*, nosso modelo de estudo, há poucos dados de plantas agrícolas visitadas pela espécie, mas sabe-se que é polinizada da pimenta, pimentão e goiaba, coletando recursos florais de diversas espécies de plantas em áreas urbanas (Marques-Souza 2010; Aleixo *et al.* 2013). Supondo-se que a espécie tenha o mesmo comportamento generalista na natureza, possivelmente pode entrar em contato, durante o forrageamento, com plantas daninhas, culturas agrícolas ou plantas nativas próximas a áreas agrícolas que tenham resíduos de glifosato em seus recursos florais. Ao coletar e levar esses recursos contaminados para dentro da colônia para alimentação das larvas por provisionamento massal (Michener 1974; Nogueira-Neto 1997) pode causar consequências negativas na história de vida das abelhas ao longo do desenvolvimento (Blot *et al.* 2019; Vázquez *et al.* 2018; Dai *et al.* 2018; Motta *et al.* 2018). A contaminação por glifosato já foi detectado em cultivos e florestas nativas após sua aplicação em cultivos adjacentes para o controle de plantas daninhas (Bai e Ogbourne 2016). Além disso, em países que introduziram culturas geneticamente modificadas resistentes ao glifosato, traços de glifosato foram detectados no mel (Chile: CIAP 2012; Rubio *et al.* 2014), em cera de abelha (El Alghebi *et al.* 2020), partículas de ar e amostras de chuva (EUA: CHANG *et al.* 2011; Argentina: Alonso *et al.* 2014) e na superfície de corpos de água localizados próximos a campos tratados que podem ser visitados por abelhas (Canadá: CCME 1989). A causa das deformidades de abelhas ao entrar em contato com o herbicida glifosato pode ser um assunto interessante para futuras investigações científicas dada a importância das abelhas para a polinização de plantas nativas e culturas agrícolas (Kevan e Baker 1983; Klein *et al.* 2007).

Apesar de nossos resultados não terem sido expressivos com relação à mortalidade de

larvas, o efeito da exposição do glifosato a longo prazo em abelhas ainda não foi explorado exaustivamente (Herbert *et al.* 2014; Balbuena *et al.* 2015). De fato, verificamos que a alimentação contendo glifosato afetou o desenvolvimento das abelhas, o que sugere que este efeito também pode ocorrer no campo. Com isso em mente, investigar os efeitos da exposição ao glifosato e de outros agrotóxicos ao longo da vida das abelhas sem ferrão necessita de técnicas ou mesmo protocolos bem estabelecidos que permitam o monitoramento de longo prazo, pois alguns efeitos só podem se tornar visíveis após um período de tempo e mais tarde no ciclo de vida.

No presente estudo, demonstramos que o glifosato, usado no controle de plantas daninhas, pode afetar negativamente insetos benéficos aos ecossistemas. As larvas da abelha sem ferrão *F. varia* alimentadas com uma dieta de glifosato apresentaram mortalidade e malformações nas asas de operárias recém-emergidas, consequentemente comprometendo as funções essenciais como o forrageamento para sobrevivência social e os serviços de polinização que possivelmente a espécie possa oferecer. A causa das deformidades nas asas das abelhas ao entrar em contato com o herbicida glifosato pode ser um assunto interessante para futuros estudos, pois tais alterações podem causar efeito cascata nos serviços ecossistêmicos comprometendo a polinização de culturas agrícolas (Kevan e Baker, 1983; Klein *et al.* 2007). O método aqui utilizado para avaliar os riscos do glifosato em uma casta específica de abelha (operárias) pode ser adaptado para que estudos futuros avaliem os efeitos do herbicida em outras castas isoladas (rainhas e machos) de abelhas sem ferrão na colônia que se alimentam de recursos florais contaminados com glifosato coletados pelas operárias. Isto porque todas as castas na colônia podem ser afetadas por meio da alimentação de recursos florais contaminados por resíduos de glifosato coletados pelas operárias. Propomos que estudos futuros sejam realizados para determinar se o glifosato é um fator que pode contribuir para o distúrbio do colapso das colônias já que fatores como patógenos e parasitas e o uso de agrotóxicos estão entre as causas mais prováveis (Johnson *et al.* 2010; Wu *et al.* 2011).

Agradecimentos

À Professora Roberta Nocelli por ter cedido o ingrediente ativo do herbicida usado nesta pesquisa (Processo: CNPq – 400540/2018 – 5).

Declaração de interesse

Os autores declaram não haver potenciais conflitos de interesse.

Financiamento

Este trabalho foi apoiado pelo CNPq (Processo: 406734/2018-6), a FINEP/PROINFRA (01/2008) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código 001.

ORCID

Jaqueline Aparecida da Silva  <https://orcid.org/0000-0002-4786-6114> Angel Roberto

Barchuk  <https://orcid.org/0000-0001-8417-2763> Marina Wolowski 

<https://orcid.org/0000-0001-5481-1472>

Referências Bibliográficas

Abraham, J., Benhotons, G. S., Krampah, I., Tagba, J., Amissah, C., & Abraham, J. D. (2018). Commercially formulated glyphosate can kill non-target pollinator bees under laboratory conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 166(8), 695-702.

Aleixo, K. P., de Faria, L. B., Garófalo, C. A., Fonseca, V. L. I., & da Silva, C. I. (2013). Pollen collected and foraging activities of *Frieseomelitta varia* (Lepeletier)(Hymenoptera: Apidae) in an urban landscape. *Sociobiology*, 60(3), 266-276.

Allsopp, M. H., De Lange, W. J., & Veldtman, R. (2008). Valuing insect pollination services with cost of replacement. *PloS one*, 3(9), e3128.

Alonso, L. L., Ronco, A. E., & Marino, D. J. (2014). C15-Niveles de glifosato y atrazina en aguas de lluvia de la región pampeana. *Vcongreso Argentino, Sociedad de Toxicología y Químics Ambiental*.

Antoniou, M., Robinson, C., & Fagan, J. (2012). *GMO Myths and Truths: An evidence-based examination of the claims made for the safety and efficacy of genetically modified crops*. Earthcare Books.

Bai, S. H., & Ogbourne, S. M. (2016). Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 18988-19001.

Balbuena, M. S., Tison, L., Hahn, M. L., Greggers, U., Menzel, R., & Farina, W. M. (2015). Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *Journal of Experimental Biology*, 218(17), 2799-2805.

Baptistella, A. R. (2009). *Produção "in vitro" de rainhas e ocorrência natural de machos de Frieseomelitta varia (Apidae: Meliponina)* (Doctoral dissertation, Master Thesis. University of São Paulo, Brazil).

Blot, N., Veillat, L., Rouzé, R., & Delatte, H. (2019). Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. *PloS one*, 14(4), e0215466.

Boily, M., Sarrasin, B., DeBlois, C., Aras, P., & Chagnon, M. (2013). Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(8), 5603-5614.

Bridges, D. C. (2003). Glyphosate-type herbicidas. *BRIDGES, DC Herbicide action course. West Lafayette: Purdue University*, 501-513.

BPBES/REBIPP (2019): Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de

Alimentos no Brasil. Marina Wolowski; Kayna Agostini; André Rodrigo Rech; Isabela Galarda Varassin; Márcia Maués; Leandro Freitas; Liedson Tavares Carneiro; Raquel de Oliveira Bueno; Hélder Consolaro; Luisa Carvalheiro; Antônio Mauro Saraiva; Cláudia Inês da Silva; Padgurschi M. C. G. (Org.). 1ª edição, Campinas, SP. 184 páginas. ISBN: 978-85- 60064-83-0.

Brown, M. J., & Paxton, R. J. (2009). The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie*, 40(3), 410-416.

Brunner, F. S., Schmid-Hempel, P., & Barribeau, S. M. (2014). Protein-poor diet reduces host-specific immune gene expression in *Bombus terrestris*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1786), 20140128.

Bryden, J., Gill, R.J., Mitton, R.A.A., Raine, N.E., Jansen, V.A.A. (2013). Chronic sublethal stress causes failure in the bee colony. *Ecol. Lett.* 2013; 16: 1463-1469.

CCME, Canadian Water Quality Guidelines, Ottawa, Ontario. Environment Canada. Canadian Council of Ministers of the Environment, 1989.

Chang, F. C., Simcik, M. F., & Capel, P. D. (2011). Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(3), 548-555.

CIAP, Desaparición de las abejas y los residuos de plaguicidas en miel, Situación de la región de O'Higgins. Centro de investigaciones aplicadas. Chile. Boletín N° 1, 1-4, 2012.

Dai, P., Yan, Z., Ma, S., Yang, Y., Wang, Q., Hou, C., ... & Diao, Q. (2018). The herbicide glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of honey bee during larvae reared in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(29), 7786-7793.

Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., ... & Alaux, C. (2013). Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter?. *PloS one*, 8(8), e72016.

do Carmo Langiano, V., & Martinez, C. B. (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 147(2), 222-231.

Dorigo, A. S., Rosa-Fontana, A. D. S., Soares-Lima, H. M., Galaschi-Teixeira, J. S., Nocelli, R. C. F., & Malaspina, O. (2019). In vitro larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. *PloS one*, 14(3), e0213109.

Doublet, V., Labarussias, M., de Miranda, J. R., Moritz, R. F., & Paxton, R. J. (2015). Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environmental microbiology*, 17(4), 969-983.

Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(4), 319-325.

El Agrebi, N., Tosi, S., Wilmart, O., Scippo, M. L., de Graaf, D. C., & Saegerman, C. (2020). Honeybee and consumer's exposure and risk characterisation to glyphosate-based herbicide

- (GBH) and its degradation product (AMPA): Residues in beebread, wax, and honey. *Science of The Total Environment*, 704, 135312.
- Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, M., ... & Pettis, J. S. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS one*, 4(8), e6481.
- Faita, M. R., de Medeiros Oliveira, E., Júnior, V. V. A., Orth, A. I., & Nodari, R. O. (2018). Changes in hypopharyngeal glands of nurse bees (*Apis mellifera*) induced by pollen- containing sublethal doses of the herbicide Roundup®. *Chemosphere*, 211, 566-572.
- Faita, M. R., de Medeiros Oliveira, E., Júnior, V. V. A., Orth, A. I., & Nodari, R. O. (2018). Changes in hypopharyngeal glands of nurse bees (*Apis mellifera*) induced by pollen- containing sublethal doses of the herbicide Roundup®. *Chemosphere*, 211, 566-572.
- Franz, J. E., Mao, M. K., & Sikorski, J. A. (1997). *Glyphosate: a unique global herbicide*. American Chemical Society.
- Ghazoul, J. (2005). Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. *Trends in ecology & evolution*, 20(7), 367-373.
- Ghazoul, J. (2005). Response to Steffan-Dewenter et al.: Questioning the global pollination crisis. *Trends in Ecology & Evolution*, 12(20), 652-653.
- Goldsborough, L. G., & Brown, D. J. (1988). Effect of glyphosate (Roundup® formulation) on periphytic algal photosynthesis. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(2), 253-260.
- Goñalons, C. M., & Farina, W. M. (2018). Impaired associative learning after chronic exposure to pesticides in young adult honey bees. *Journal of Experimental Biology*, 221(7).
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229).
- Gregorc, A., & Ellis, J. D. (2011). Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide biochemistry and physiology*, 99(2), 200-207.
- Gregorc, A., Evans, J. D., Scharf, M., & Ellis, J. D. (2012). Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). *Journal of Insect Physiology*, 58(8), 1042-1049.
- Helmer, S. H., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C., & Boily, M. (2015). Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11), 8010-8021.
- Herbert, L. T., Vázquez, D. E., Arenas, A., & Farina, W. M. (2014). Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *Journal of Experimental Biology*, 217(19), 3457-3464.
- Howe, C. M., Berrill, M., Pauli, B. D., Helbing, C. C., Werry, K., & Veldhoen, N. (2004). Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental*

Toxicology and Chemistry: An International Journal, 23(8), 1928-1938.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis. Relatórios de comercialização de agrotóxicos, 2019. Disponível: http://www.ibama.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=594&Itemid=5
Acesso em: 09 abr. 2021.

Johnson, R. M., Ellis, M. D., Mullin, C. A., & Frazier, M. (2010). Pesticides and honey bee toxicity—USA. *Apidologie*, 41(3), 312-331.

Kale, P. G., Petty Jr, B. T., Walker, S., Ford, J. B., Dehkordi, N., Tarasia, S., ... & Sohni, Y. R. (1995). Mutagenicity testing of nine herbicides and pesticides currently used in agriculture. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 25(2), 148-153.

Kaya, B., Creus, A., Yanikoğlu, A., Cabré, O., & Marcos, R. (2000). Use of the *Drosophila* wing spot test in the genotoxicity testing of different herbicides. *Environmental and molecular mutagenesis*, 36(1), 40-46.

Kevan, P. G., & Baker, H. G. (1983). Insects as flower visitors and pollinators. *Annual review of entomology*, 28(1), 407-453.

Klein, A. M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharrntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the royal society B: biological sciences*, 274(1608), 303-313.

Levenbook, L., & Bauer, A. C. (1984). The fate of the larval storage protein calliphorin during adult development of *Calliphora vicina*. *Insect biochemistry*, 14(1), 77-86.

Locke, M. T., & Collins, J. V. (1968). Protein uptake into multivesicular bodies and storage granules in the fat body of an insect. *The Journal of cell biology*, 36(3), 453-483.

Locke, M., & Collins, J. V. (1965). The structure and formation of protein granules in the fat body of an insect. *The Journal of cell biology*, 26(3), 857-884.

Locke, M., & Collins, J. V. (1966). Sequestration of protein by the fat body of an insect. *Nature*, 210(5035), 552-553.

Locke, M., & Collins, J. V. (1967). Protein uptake in multivesicular bodies in the molt-intermolt cycle of an insect. *Science*, 155(3761), 467-469.

Maggi, F., Tang, F. H., la Cecilia, D., & McBratney, A. (2019). PEST-CHEMGRIDS, global gridded maps of the top 20 crop-specific pesticide application rates from 2015 to 2025. *Scientific data*, 6(1), 1-20.

Manley, R., Boots, M., & Wilfert, L. (2017). Condition-dependent virulence of slow bee paralysis virus in *Bombus terrestris*: are the impacts of honeybee viruses in wild pollinators underestimated?. *Oecologia*, 184(2), 305-315.

Marques-Souza, A. C. (2010). Ocorrência do pólen de *Podocarpus* sp. (Podocarpaceae) nas coletas de *Frieseomelitta varia* Lepelletier 1836 (Apidae: Meliponinae) em uma área de Manaus, AM, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 24(2), 558-566.

Martins, J. R. *Genes de Hexamerinas em Apis mellifera: Busca de Funções Alternativas durante*

o Desenvolvimento (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Matthews, G. A. (2006). *Pesticides: Health, Safety and the Environment*, UK: Blackwell publishing.

Meza-Joya, F. L., Ramírez-Pinilla, M. P., & Fuentes-Lorenzo, J. L. (2013). Toxic, cytotoxic, and genotoxic effects of a glyphosate formulation (Roundup® SL–Cosmoflux® 411F) in the direct-developing frog *Eleutherodactylus johnstonei*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 54(5), 362-373.

Michener, C. D., & Michener, C. D. (1974). *The social behavior of the bees: a comparative study*. Harvard University Press.

Moreno, N. C., Sofia, S. H., & Martinez, C. B. (2014). Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 37(1), 448-454.

Motta, E. V., Raymann, K., & Moran, N. A. (2018). Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(41), 10305-10310.

Nascimento, W. M., Gomes, E. M. L., Batista, E. A., & Freitas, R. A. (2012). Utilização de agentes polinizadores na produção de sementes de cenoura e pimenta doce em cultivo protegido. *Embrapa Hortaliças-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.

Nocelli, R., Soares, S., & Monquero, P. (2019). Efeito de Herbicidas na Sobrevivência de Abelhas Nativas Brasileiras *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). *Planta Daninha*, 37.

Nogueira Neto, P. (1997). *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão* (No. 595.799 N778). Nogueirapis.

Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S. L., & Carrasco, A. E. (2010). Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical research in toxicology*, 23(10), 1586-1595.

Pires, C. S. S., Pereira, F. D. M., Lopes, M. D. R., Nocelli, R. C. F., Malaspina, O., Pettis, J. S., & Teixeira, E. W. (2016). Weakness and collapse of bee colonies in Brazil: are there cases of CCD?. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(5), 422-442.

Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H. T., Aizen, M. A., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., ... & Vanbergen, A. J. (2016). Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540(7632), 220-229.

R Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019. URL <https://www.Rproject.org/>.

Rafael Valdovinos-Nunez, G., Quezada-Euán, J. J. G., Ancona-Xiu, P., Moo-Valle, H., Carmona, A., & Ruiz Sánchez, E. (2009). Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Journal of economic entomology*, 102(5), 1737-1742.

Rubio, F., Guo, E., & Kamp, L. (2014). Survey of glyphosate residues in honey, corn and soy products. *J. Environ. Anal. Toxicol*, 5(249), 2161-0525.

- Rundlöf, M., Andersson, G. K., Bommarco, R., Fries, I., Hederström, V., Herbertsson, L., ... & Smith, H. G. (2015). Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature*, *521*(7550), 77-80.
- Seide, V. E., Bernardes, R. C., Pereira, E. J. G., & Lima, M. A. P. (2018). Glyphosate is lethal and Cry toxins alter the development of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Environmental Pollution*, *243*, 1854-1860.
- Steffan-Dewenter, I., Potts, S. G., & Packer, L. (2005). Pollinator diversity and crop pollination services are at risk. *TRENDS in Ecology and Evolution*, *20*(12), 651-651.
- Vázquez, D. E., Ilina, N., Pagano, E. A., Zavala, J. A., & Farina, W. M. (2018). Glyphosate affects the larval development of honey bees depending on the susceptibility of colonies. *PloS one*, *13*(10), e0205074.
- Vázquez, D. E., Latorre-Estivalis, J. M., Ons, S., & Farina, W. M. (2020). Chronic exposure to glyphosate induces transcriptional changes in honey bee larva: A toxicogenomic study. *Environmental Pollution*, *261*, 114148.
- Winfree, R., Aguilar, R., Vázquez, D. P., LeBuhn, G., & Aizen, M. A. (2009). A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. *Ecology*, *90*(8), 2068-2076.
- Woodcock, B. A., Bullock, J. M., Shore, R. F., Heard, M. S., Pereira, M. G., Redhead, J., ... & Pywell, R. F. (2017). Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. *Science*, *356*(6345), 1393-1395.
- Woodcock, B. A., Isaac, N. J., Bullock, J. M., Roy, D. B., Garthwaite, D. G., Crowe, A., & Pywell, R. F. (2016). Impacts of neonicotinoid use on long-term population changes in wild bees in England. *Nature Communications*, *7*(1), 1-8.
- Wu, J. Y., Anelli, C. M., & Sheppard, W. S. (2011). Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PloS one*, *6*(2), e14720.
- Wu, M. C., Chang, Y. W., Lu, K. H., & Yang, E. C. (2017). Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *88*, 12-20.
- Zhu, Y. C., Yao, J., Adamczyk, J., & Luttrell, R. (2017). Feeding toxicity and impact of imidacloprid formulation and mixtures with six representative pesticides at residue concentrations on honey bee physiology (*Apis mellifera*). *PLoS One*, *12*(6), e0178421.

NOTES AND COMMENTS

2.3 First report of *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acari: Acaridae) in colonies of the stingless bee *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Jaqueline Aparecida da Silva^{a*}, Júlia Jantsch Ferla^b, Angelo Pallini^b, Angel Roberto Barchuk^c, Marina Wolowski^d

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas - Minas Gerais – Brasil

^b Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais – Brazil

^c Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas - Minas Gerais – Brazil

^d Instituto de Ciências da Natureza, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas - Minas Gerais – Brazil

Corresponding author. Email: jaqueline.a.silva28@gmail.com

Tyrophagus putrescentiae (Schrank) (Acari: Acaridae) has potential for controlling pest insects in the laboratory, although little is known about its interaction with beneficial species such as bees. Here we report an infestation of *T. putrescentiae* and its parasitic effect in colonies of the stingless bee *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) in Minas Gerais State, Brazil. After the mite infestation, the *F. varia* colonies became weak and then the population died. Studies aimed at determining the details of ecological interactions between species of bees and this mite will contribute to planning conservation actions for bee populations and, consequently, the maintenance of pollination services.

Keywords: Parasitic relationship; Natural enemies; Mite; Stingless bee; Impacts on pollination.

Due to its ability to prey on immatures of various dipteran and coleopteran species reared in the laboratory (Serpa et al., 2004; Kumar, 1997; Brust and House, 1988; Papadopoulou et al., 2006; Canevari et al., 2012), the cosmopolitan mite *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acari: Acaridae) has been suggested as a possible biological control agent. However, little is known about some of the ecological relationships that *T. putrescentiae* has with bees. *Tyrophagus putrescentiae* has been observed in nests (Rozejy et al., 2011) and on the bodies (Maggi et al. 2011; Revainera et al., 2014; Revainera et al., 2019) of *Bombus* species, as well as in hives of *Apis mellifera* L (Flechtmann, 1980) and on the “beebread” of this species (Teixeira et al., 2014).

In this work, we report the first record of *T. putrescentiae* in colonies of stingless bees and the negative impact of this mite on these insects, in the state of Minas Gerais, Brazil. In winter (July and August) of 2020, six dead colonies of *Frieseomelitta varia* (Lepeletier, 1836) were found in the Experimental Meliponary, at the Universidade Federal de Alfenas, Campus Sede. The colonies were maintained to obtain individuals used in molecular and developmental biology experiments (the genome of *F. varia* was recently made available, Freitas et al., 2020), where larvae were reared under laboratory conditions. Mortality was observed of larvae and pupae reared *in vitro* on ELISA acrylic plates in an incubator set at 28°C and 80% humidity. When the larvae and pupae were examined with a stereoscope (Carl-Zeiss-Promenade 10), adults and eggs of mites were observed on them. After discovering that the bees reared *in vitro* were probably killed by mites, all material of the colonies that completely died were taken to the laboratory. The material was analyzed with a light field optical microscope (Nikon Eclipse 80i) and mites were found. Samples of the mites were placed in 70% alcohol, for subsequent identification, and taken to the Acarology Laboratory of the Entomology Department at the Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. To identify the mite species, the dichotomous keys in Norton et al. (2009) and Hughes (1976) were used. Images of adult mites were taken using a phase-contrast microscope (Zeiss axioskop 40).

The mite samples were identified as *T. putrescentiae*. Eggs and adults of *T. putrescentiae* were found on larvae and pupae inside brood cells in the colony and on the acrylic plates in the laboratory (Figure 1).



Figure 1. Representative photos of adult *Tyrophagus putrescentiae* individuals. (1) Female *T. putrescentiae*. (2) Male *T. putrescentiae*. The individuals were found on pupae and larvae in *F. varia* colonies and ELISA acrylic plates. The images were taken using a phase-contrast microscope.

In the affected colonies, the emergence of worker bees that are fundamental to the maintenance of the nest was interrupted by the mite infestation. It is not possible to estimate how long it took for the first colony to die or when it was infested. The presence of *T. putrescentiae* mites promoted typical consequences of parasitic relationships. Mite eggs and adults were not recorded on forager bees and the queen, but there is evidence that the mite *Varroa destructor* is highly capable of infesting foraging bees in search of food (Peck et al., 2016), which suggests that the mite *T. putrescentiae* needs foraging bees to invade a nest. Once the mites are inside a nest, it is thought that they invade the cells of young bees where females lay eggs on bee larvae and pupae and, when the eggs hatch, the mites exhibit a parasitic behavior that eventually kills the developing bees and weakens the colony.

The incubator where the *F. varia* bees were maintained provided favorable conditions for the development of *T. putrescentiae* (Figure S2). According to Li and collaborators (2015), the ideal laboratory conditions to mass rear *T. putrescentiae* are 28°C and 80% relative humidity. On the acrylic plates and in some brood cells, the developing bees had dark spots or dark colorations and bees with a malnourished appearance were observed after the mites appeared. The proliferation of a fungus also occurred on the acrylic plates, which might explain why the bee colonies died.

It is possible that developing bees contaminated with the mites were handled by a researcher, resulting in the transfer of contaminated material from the colonies to the laboratory. Thus, it is important to sterilize tools (e.g., transfer needles and tweezers) after using them in bee colonies so the biological cycle of contaminating mites is not completed. The health of a bee colony can be monitored by looking for dead bees in brood cells and dead

adults in the colony. Studies that determine the inherent mechanisms of ecological interactions between stingless bees and this mite will allow conservation actions to be planned for bee populations. Consequently, this will help maintain pollination services.

Supplementary Information

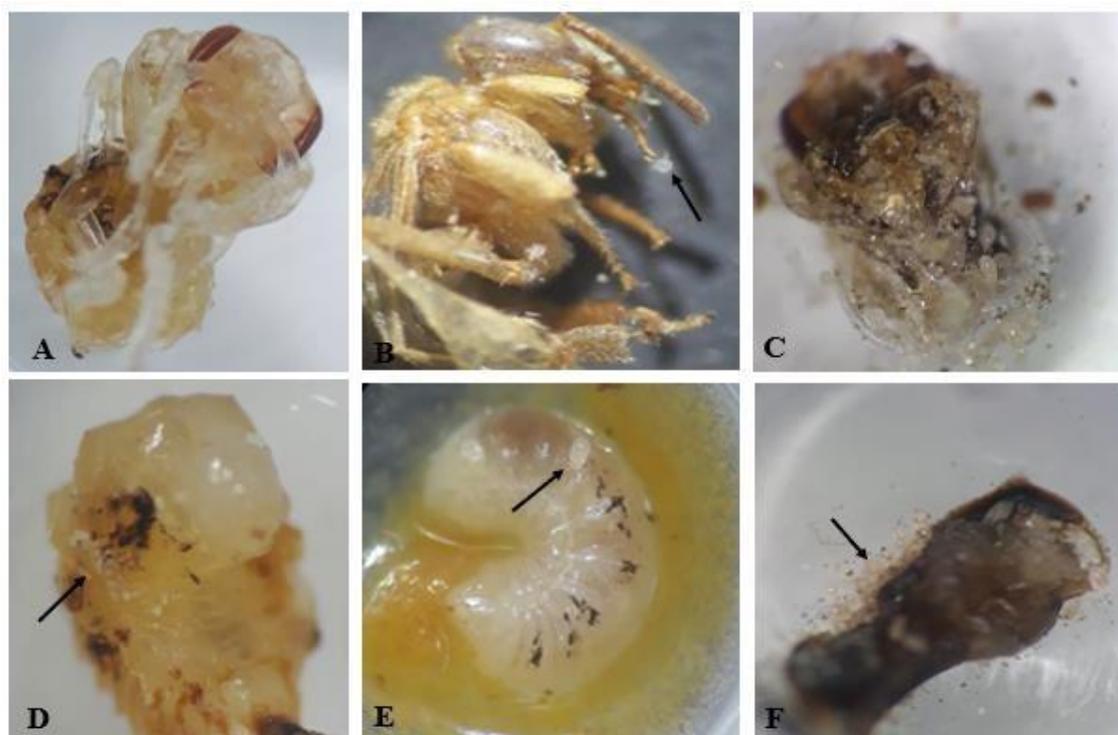


Figure S2. Presence of *T. putrescentiae* mites on pupae and larvae of *F. varia* bees on ELISA acrylic plates in an incubator at 28°C and 80% humidity. A) Pupa with dark abdomen and malnourished aspect after the appearance of the mites, **Pbl** phase – Eye brown; body with orangish appendages. B) Egg on recently emerged bee– Thorax and abdomen clear. C) Pupa infested with mites at various development stages, phase **Pbd** – Eye brown; body with well-pigmented appendages (thorax and abdomen clear). D) Larva after defecating with mite eggs and dark spots on the body. E) Larva on the fifth day of feeding with dark spots and adult mites. F) Infestation of mites after a week of larva defecation and individual with dark coloration. Development phases described based on Hartfelder and collaborators (2006). Images taken using a camera coupled to a stereoscope (Carl-Zeiss- Promenade 10).

Acknowledgments

We thank Prof. Dr. Weyder Cristiano Santana and Dr. Dirk Louis Schorkopf for their suggestions on the mite identification.

Declaration of interest

The authors declare no potential conflicts of interest.

Financing

This work was supported by CNPq (Processo: 406734/2018-6), FINEP/PROINFRA (01/2008) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código 001.

ORCID

Jaqueline Aparecida da Silva  <https://orcid.org/0000-0002-4786-6114>

Júlia Jantsch Ferla  <https://orcid.org/0000-0003-4288-1654>

Angelo Pallini  <https://orcid.org/0000-0003-3752-3545>

Angel Roberto Barchuk  <https://orcid.org/0000-0001-8417-2763>

Marina Wolowski  <https://orcid.org/0000-0001-5481-1472>

Literature Cited

- Brust, G. E., & House, G. J. (1988). A study of *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae) as a facultative predator of southern corn rootworm eggs. *Experimental & applied acarology*, 4(4), 335-344.
- Canevari, G. D. C., Rezende, F., Silva, R. B. D., Faroni, L. R. D. A., Zanuncio, J. C., Papadopoulou, S., & Serrão, J. E. (2012). Potential of *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank)(Astigmata: Acaridae) for the biological control of *Lasioderma serricorne* (F.)(Coleoptera: Anobiidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(2), 299-303.
- Flechtmann, C. H. (1980). Dois ácaros associados à abelha (*Apis mellifera* L.) no Perú. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, 37(2), 737-741.
- Freitas, F. C. P., Lourenço, A. P., Nunes, F. M., Paschoal, A. R., Abreu, F. C., Barbin, F. O., ...& Dalarmi, F. (2020). The nuclear and mitochondrial genomes of *Frieseomelitta varia* a highly eusocial stingless bee (Meliponini) with a permanently sterile worker caste. *BMC Genomics*, 21, 1-26.
- Hartfelder, K., Makert, G. R., Judice, C. C., Pereira, G. A., Santana, W. C., Dallacqua, R., & Bitondi, M. M. (2006). Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie*, 37(2), 144-163.
- Hughes, A. M. (1976). The mites of stored food and houses (No. 2nd edition). Her Majesty's Stationery Office.
- Kumar, D. (1997). Mite infestation in stored grain pest culture. *Insect Environ*, 3, 42-47.
- Li, Y. Y., Zhang, Y., Hu, Q., Liu, L., Xu, X. N., Liu, H., & Wang, J. J. (2015). Effect of bran moisture content and initial population density on mass production of *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank)(Acari: Acaridae). *Systematic and Applied Acarology*, 20(5), 497-506.

- Maggi, M., Lucia, M., & Abrahamovich, A. H. (2011). Study of the acarofauna of native bumblebee species (*Bombus*) from Argentina. *Apidologie*, 42(3), 280-292.
- Norton, R. A., Behan-Pelletier, V. M., Krantz, G. W., & Walter, D. E. (2009). A manual of acarology.
- Papadopoulou, S. C. (2006). *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank)(Astigmata: Acaridae) as a new predator of *Lasioderma serricorne* (F.)(Coleoptera: Anobiidae) in tobacco stores in Greece. *Journal of stored products research*, 42(3), 391-394.
- Peck, D. T., Smith, M. L., & Seeley, T. D. (2016). *Varroa destructor* mites can nimbly climb from flowers onto foraging honey bees. *PLoS one*, 11(12), e0167798.
- Revainera, P. D., Salvarrey, S., Santos, E., Arbulo, N., Invernizzi, C., Plischuk, S., ... & Maggi, M. D. (2019). Phoretic mites associated to *Bombus pauloensis* and *Bombus bellicosus* (Hymenoptera: Apidae) from Uruguay. *Journal of Apicultural Research*, 58(3), 455-462.
- Revainera, P., Lucia, M., Abrahamovich, A. H., & Maggi, M. (2014). Spatial aggregation of phoretic mites on *Bombus atratus* and *Bombus opifex* (Hymenoptera: Apidae) in Argentina. *Apidologie*, 45(5), 579-589.
- Serpa, L. L. N., Franzolin, M. R., Barros-Battesti, D. M., & Kakitani, I. (2004). *Tyrophagus putrescentiae* predando insetos adultos de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em laboratório. *Revista de saude publica*, 38, 735-737.
- Texeira, É. W., dos Santos, L. G., Matioli, A. L., & Alves, M. L. T. M. F. (2014). First report in Brazil of *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank)(Acari: Acaridae) in colonies of Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.). *Interciencia*, 39(10), 742-744.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, tivemos como primeiro objetivo (Capítulo 1) adaptar o método já descrito para a produção *in vitro* de rainhas de *Frieseomelitta varia* para a produção de operárias, oferecendo volumes de 25 e 27 µL de alimento larval e avaliando parâmetros como viabilidade de ovos e larvas de primeiro ínstar transferidas para placas de acrílico, taxa de emergência e mortalidade, tempo de desenvolvimento e parâmetros morfológicos como peso e tamanho das operárias que emergiram em até 24 horas. Para comparação e validação do método, foram utilizadas abelhas operárias emergidas de células de cria naturais (*in natura*). Tivemos resultados satisfatórios na taxa de sobrevivência e na emergência ($33,3 \pm 0,57$ dias) de operárias quando larvas de primeiro ínstar são alimentadas com o volume de 27 µL de alimento larval e mantidas em condições favoráveis em placas de acrílicos limpas e esterilizadas com temperatura constante de 30°C e umidade relativa de 99% durante o período de alimentação e 75% durante os dias adicionais de desenvolvimento. A transferência dos ovos para as placas não mostraram o mesmo sucesso quando comparado à transferência de

larvas, sendo recomendado não utilizar ovos na produção de abelhas *in vitro*. Assim, o protocolo, aqui apresentado (Capítulo 1), pode ser aplicado com sucesso como ferramenta nos estudos de exposição de *F. varia* em testes ecotoxicológicos. O método pode ser usado em avaliações dos efeitos que podem ocorrer durante a exposição de larvas de primeiro ínstar a agrotóxicos no período de alimentação ou mesmo em estudos em que a contaminação larval ocorra associada também aos efeitos dos agrotóxicos durante todos os estágios de desenvolvimento de *F. varia*, avaliando também alterações morfológicas e comportamentais pós-emergência. Embora o protocolo tenha resultados satisfatórios, diferenças na morfologia, como peso corporal e largura da cabeça, foram observadas entre as operárias produzidas *in vitro* e as que se desenvolveram naturalmente na colônia. Diante desses resultados, recomenda-se que estudos futuros investiguem a influência do volume de 27 μL de alimento larval proposto aqui, em nível individual e colonial. Para isso, critérios como comportamento pós-emergência dentro da colônia podem ser avaliados.

Em seguida (Capítulo 2), avaliamos os efeitos do glifosato na morfologia de operárias de *F. varia* após o período de alimentação de larvas com alimento larval contendo glifosato. Os resultados mostraram que este herbicida não foi letal durante a alimentação, mas mostrou efeitos negativos como malformações na morfologia das asas das abelhas emergentes (33 dias). Esses efeitos foram observados somente na maior concentração de 1000 ng de glifosato / 27 μL de alimento larval e os efeitos foram diversos na concentração de 1000 ng de glifosato / 27 μL de larva alimentar. As malformações no nível individual comprometem as funções básicas de sobrevivência da colônia, como capacidade de voo e coleta recursos como pólen e néctar. Os efeitos da exposição do glifosato em abelhas produzidas *in vitro*, tem potencial de ocorrer quando as abelhas forrageiam na natureza e entram em contato com traços de glifosato nos recursos alimentares. Consequentemente, isto pode gerar efeitos cascatas no ecossistema, impactando o processo de polinização nas plantas visitadas por populações de abelhas expostas a agrotóxicos em agroecossistemas. Portanto, futuras investigações são necessárias para avaliar a presença de resíduos de glifosato na flora visitada por essas abelhas, bem como monitorar resíduos de glifosato presentes no interior da colônia, como no mel, cera de abelha e no alimento larval fornecidos às larvas. Esses registros poderão fomentar um banco de dados para compreender as vias de exposição e os possíveis efeitos do glifosato nas abelhas nativas na natureza.

Mais além, durante o desenvolvimento desta dissertação, registramos, pela primeira vez, a ocorrência de populações do ácaro *Tyrophagus putrescentiae* e seu impacto negativo nas colônias de *F. varia* (Capítulo 3). O registro foi feito no inverno de 2020 com a morte de seis colônias nas quais os ácaros foram encontrados. A presença do ácaro *T. putrescentiae* promoveu nas colônias a mortalidade de abelhas em desenvolvimento, interrupção da emergência de operárias e enfraquecimento da colônia, consequências típicas das resultantes

de uma relação parasítica nas colônias de *F. varia*. Os ácaros não foram encontrados nos corpos da rainha e nem em operárias dentro da colônia, mas sim dentro das células de cria. Este fato pode explicar também a mortalidade das abelhas em desenvolvimento e a interrupção da emergência de operárias e enfraquecimento da colônia. Contudo, não foi possível saber quando as colônias foram afetadas, mas, acreditamos que os ácaros tenham invadido as colônias por meio de abelhas forrageiras que foram buscar néctar e pólen no ambiente externo. A presença de ácaros na estufa onde as abelhas eram mantidas na ocasião do evento, possivelmente foi devido à transferência de material contaminado das colônias para o laboratório. Embora nas colônias de *F. varia*, o ácaro tenha comportamento parasitário, pouco se sabe sobre a relação entre *T. putrescentiae* e abelhas sem ferrão, sugerindo que estudos futuros serão necessários para investigar o potencial risco dessa espécie de ácaro para as abelhas nativas na natureza.

Diante dos estudos, podemos perceber que a abelha sem ferrão *F. varia* tem potencial para ser produzida *in vitro* e suas populações podem ser afetadas por agrotóxicos utilizados em agroecossistemas e também por patógenos, ambos com efeitos severos na sobrevivência da espécie, fatores que possivelmente são considerados riscos para outras abelhas sem ferrão nativas. A consolidação do protocolo nos permitiu entender melhor a biologia da espécie em estudo, bem como os procedimentos para sua criação, permitindo que experimentos de exposição dessa espécie ao glifosato ou a outro agrotóxico sejam feitos de acordo com outros testes de toxicidade, nos quais a espécie em estudo seja avaliada em relação à exposição ao agrotóxico e não pelo manuseio incorreto de abelhas. Ressaltamos ainda a importância de estudos que avaliem os efeitos ao longo da história de vida em abelhas sem ferrão. Estudos mais aprofundados, como análise molecular, também podem fornecer respostas necessárias para conservação das espécies e manutenção do serviço ecossistêmico de polinização, embora se saiba pouco sobre a relação de *F. varia* e a polinização de culturas agrícolas.

Tendo em vista a dificuldade de identificar ainda alguns parâmetros como comportamento das abelhas expostas ao glifosato, nossos próximos esforços serão realizar novamente os experimentos de contaminação do alimento larval de *F. varia*. Especificamente, iremos usar as concentrações recomendadas e o dobro para avaliar a mortalidade e parâmetros morfológicos e moleculares (genes de detoxificação, marcadores de estresse, imunidade e genes neurogênicos), como indicadores dos efeitos do glifosato, a fim de compreender os mecanismos que possivelmente afetam o desenvolvimento de abelhas *in vitro*. A continuidade desses experimentos possibilitará agregar mais informações para subsidiar planos de ações de conservação de populações de abelhas nativas.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, John *et al.* Commercially formulated glyphosate can kill non-target pollinator bees under laboratory conditions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 166, n. 8, p. 695-702, abr./jul. 2018.

ALEIXO, Kátia Paula *et al.* Pollen collected and foraging activities of *Frieseomelitta varia* (Lepeletier)(Hymenoptera: Apidae) in an urban landscape. **Sociobiology**, v. 60, n. 3, p. 266-276, mai./jul. 2013.

BAI, Shahla Hosseini; OGBOURNE, Steven M. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 19, p. 18988- 19001, out./agost. 2016.

BAPTISTELLA, Ana Rita *et al.* Techniques for the *in vitro* production of queens in stingless bees (Apidae, Meliponini). **Sociobiology**, v. 59, n. 1, p. 297-310, jan. 2014.

BAPTISTELLA, Ana Rita Tavares de Oliveira. **Produção “in vitro” de rainhas e ocorrência natural de machos de *Frieseomelitta varia* (Apidae: Meliponina)**. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2009.

BARBOSA, Wagner F. *et al.* Biopesticide-induced behavioral and morphological alterations in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 34, n. 9, p. 2149-2158, fev./abr. 2015.

BENBROOK, Charles M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, v. 28, n. 1, p. 1-15, out./fev. 2016.

BERNARDES, Rodrigo Cupertino *et al.* The reduced-risk insecticide azadirachtin poses a toxicological hazard to stingless bee *Partamona helleri* (Friese, 1900) queens. **Chemosphere**, v. 201, p. 550-556, dez./mar. 2018.

BOFF, Samuel *et al.* Changes in social behavior are induced by pesticide ingestion in a Neotropical stingless bee. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 164, p. 548-553, dez./agos. 2018.

BOTINA, L. L. *et al.* Behavior and gut bacteria of *Partamona helleri* under sublethal exposure to a bioinsecticide and a leaf fertilizer. **Chemosphere**, v. 234, p. 187-195, abr./jun. 2019.

BPBES/REBIPP. **Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil**. Marina Wolowski; Kayna Agostini; André Rodrigo Rech; Isabela

Galarda Varassin; Márcia Maués; Leandro Freitas; Liedson Tavares Carneiro; Raquel de Oliveira Bueno; Hélder Consolaro; Luisa Carneiro; Antônio Mauro Saraiva; Cláudia Inês da Silva; Padgurschi M. C. G. (Org.). 1ª edição, Campinas, SP. 184 p. 2019.

BRITO, Pedro *et al.* The effects of field-realistic doses of imidacloprid on *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) workers. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 31, p. 38654-38661, out./mar. 2020.

China Food Economy. Agricultural Chemical Residuals Have Been Detected in Food Products Processed from Imported GM Soybeans by the China Food Economy. 2014.

DA COSTA DOMINGUES, Caio Eduardo *et al.* Fungicide pyraclostrobin affects midgut morphophysiology and reduces survival of Brazilian native stingless bee *Melipona scutellaris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, p. 111395, jul./set. 2020.

DA COSTA, Leticia Mariano *et al.* Determination of acute lethal doses (LD50 and LC50) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 62, n. 4, p. 578-582, abr./ago. 2015.

DE SOUZA ROSA, Annelise *et al.* Consumption of the neonicotinoid thiamethoxam during the larval stage affects the survival and development of the stingless bee, *Scaptotrigona depilis*. **Apidologie**, v. 47, n. 6, p. 729-738, ago./set. 2016.

DEL SARTO, Mário César L. *et al.* Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 45, n. 5, p. 626-636, out./fev. 2014.

DESNEUX, Nicolas; DECOURTYE, Axel; DELPUECH, Jean-Marie. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 52, p. 81-106, jul. 2007.

DO PRADO, Fernanda Scavassa Ribeiro *et al.* Determination and uptake of abamectin and difenoconazole in the stingless bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 via oral and topic acute exposure. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114313, nov./mar. 2020.

DORIGO, Adna Suelen *et al.* *In vitro* larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. **PloS one**, v. 14, n. 3, p. e0213109, nov./mar. 2019.

DORNELES, Andressa Linhares; DE SOUZA ROSA, Annelise; BLOCHTEIN, Betina. Toxicity of organophosphorus pesticides to the stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* and *Tetragonisca fiebrigi*. **Apidologie**, v. 48, n. 5, p. 612-620, out./fev. 2017.

DOS SANTOS ARAUJO, Renan *et al.* Spinosad-mediated effects on survival, overall group activity and the midgut of workers of *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 175, p. 148-154, out./mar. 2019.

DOS SANTOS, Charles Fernando; DOS SANTOS, Patrick Douglas de Souza; BLOCHTEIN, Betina. *In vitro* rearing of stingless bee queens and their acceptance rate into

colonies. **Apidologie**, v. 47, n. 4, p. 539-547, jun./set. 2016.

DUKE, Stephen O.; POWLES, Stephen B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 64, n. 4, p. 319-325, jun./ago. 2008.

Faustino, Christiane Dias. **Mini-colônias de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) e sua utilização na solução de problemas bionômicos**. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, SP, 2002.

FERREIRA, Maria Fernanda de Oliveira *et al.* Effects of abamectin and acetamiprid pesticides on the survival and behavior of *Scaptotrigona xanthotricha* (Apidae, Meliponini). **Journal of Apicultural Research**, p. 1-8, out./nov. 2020.

GÓMEZ-ESCOBAR, Enoc *et al.* Effect of GF-120 (Spinosad) aerial sprays on colonies of the stingless bee *Scaptotrigona mexicana* (Hymenoptera: Apidae) and the honey bee (Hymenoptera: Apidae). **Journal of economic entomology**, v. 111, n. 4, p. 1711-1715, mar./ma. 2018.

HARTFELDER, Klaus *et al.* Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 144-163, set./dez. 2006.

JACOB, Cynthia Renata Oliveira *et al.* Acute toxicity of fipronil to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 90, n. 1, p. 69-72, out./nov. 2013.

JACOB, Cynthia RO *et al.* Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. **Pest management science**, v. 71, n. 1, p. 114-122, mar./abr. 2015.

JACOB, Cynthia RO *et al.* Oral acute toxicity and impact of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. and *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). **Ecotoxicology**, v. 28, n. 7, p. 744-753, jun./jun. 2019.

KERR, Warwick Estevam *et al.* Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias estratégicas**, v. 6, n. 12, p. 20-41, set. 2010.

LOURENÇO, Clara T. *et al.* Determination of fipronil LD50 for the Brazilian bee *Melipona scutellaris*. **Julius-Kühn-Archiv**, n. 437, p. 174, 2012a.

LOURENÇO, Clara Tavares *et al.* Oral toxicity of fipronil insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 89, n. 4, p. 921-924, abr./ago. 2012b.

MACÍAS-MACÍAS, José O. *et al.* *Nosema ceranae* causes cellular immuno suppression and interacts with thiamethoxam to increase mortality in the stingless bee *Melipona colimana*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-8, mai./out. 2020.

MARQUES, R. D.; LIMA, M. A. P.; BERNARDES, R. C. A spinosad-based formulation reduces the survival and alters the behavior of the stingless bee *Plebeia lucii*.

Neotropical entomology, v. 49, n. 4, p. 578-585, ago./set. 2020.

MARQUES-SOUZA, Antonio Carlos. Ocorrência do pólen de *Podocarpus* sp.(Podocarpaceae) nas coletas de *Frieseomelitta varia* Lepeletier 1836 (Apidae: Meliponinae) em uma área de Manaus, AM, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 558-566, nov./abr. 2010.

MC CABE, Sofia I. *et al.* Dose-and time-dependent effects of oral octopamine treatments on the sucrose responsiveness in stingless bees (*Melipona scutellaris*). **Apidologie**, v. 48, n. 1, p. 1-7, nov./mar. 2017.

MEIXNER, Marina Doris *et al.* A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. **Journal of invertebrate pathology**, v. 103, p. S80-S95, jun./nov. 2010.

MOREIRA, Daiani Rodrigues *et al.* Toxicity and effects of the neonicotinoid thiamethoxam on *Scaptotrigona bipunctata* lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae). **Environmental toxicology**, v. 33, n. 4, p. 463-475, set./jan. 2018.

Moure, Jesus Santiago, Urban D, Melo G.A.R. Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. (2015).

NOCELLI, RCF; SOARES, SMM; MONQUERO, P. A. Efeito de Herbicidas na Sobrevivência de Abelhas Nativas Brasileiras *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Planta Daninha**, v. 37, fev./mai. 2019.

Nocelli, Roberta Cornélio Ferreira. *et al.* As abelhas e os defensivos agrícolas. Imperatriz-Fonseca, VL, Canhos, Dal, Saraiva, AM, Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. EDUSP, São Paulo, p. 285-300, 2011.

OECD. Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test [Internet]. OECD [citado 2020 Dez 11]. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2). (1998a). Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-213-%20honeybees-acute-oral-toxicity%20test9789264070165-em>.

OECD. Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test [Internet]. OECD [cited 2019 Sep 10]. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2). 1998b. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-214-%20honeybees-acute-contact-toxicitytest_9789264070189-en.

OTESBELGUE, Alex; DOS SANTOS, Charles Fernando; BLOCHTEIN, Betina. Queen bee acceptance under threat: Neurotoxic insecticides provoke deep damage in queen-worker relationships. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 166, p. 42-47, mai./set. 2018.

PADILHA, A. C. *et al.* Toxicity of insecticides on Neotropical stingless bees *Plebeia emerina* (Friese) and *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz)(Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Ecotoxicology**, v. 29, n. 1, p. 119-128, dez./dez. 2020.

PEDRO, Silvia RM. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348-354, out./dez. 2014.

PIOVESAN, Bruna *et al.* Effects of insecticides used in strawberries on stingless bees *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 34, p. 42472-42480, mai./jun. 2020.

PRADO-SILVA, Arlete *et al.* Morphogenetic alterations in *Melipona quadrifasciata* anthidioides (Hymenoptera: Apidae) associated with pesticides. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 74, n. 4, p. 627-632, ago./fev. 2018.

RAFAEL VALDOVINOS-NUNEZ, Gustavo *et al.* Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Journal of economic entomology**, v. 102, n. 5, p. 1737-1742, out. 2009.

RAVAIANO, Samira Veiga *et al.* Acute and oral exposure to imidacloprid does not affect the number of circulating hemocytes in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* post immune challenge. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 152, p. 24-28, abr./ago. 2018.

RODRIGUES, Cleiton G. *et al.* Leaf fertilizers affect survival and behavior of the neotropical stingless bee *Friesella schrottkyi* (Meliponini: Apidae: Hymenoptera). **Journal of economic entomology**, v. 109, n. 3, p. 1001-1008, dez./fev. 2016.

RORTAIS, Agnès *et al.* Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v. 36, n. 1, p. 71-83, dez./mai. 2005.

ROSA-FONTANA, Annelise *et al.* What is the most suitable native bee species from the Neotropical region to be proposed as model-organism for toxicity tests during the larval phase?. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114849, jan./mai. 2020.

SEIDE, Vanessa Eler *et al.* Glyphosate is lethal and Cry toxins alter the development of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 1854-1860, jun./out. 2018.

SILVA, Claudia Inês *et al.* Guia ilustrado de abelhas polinizadoras no Brasil. **Instituto de Estudos Ambientais**, 2014.

SOARES, Hellen Maria *et al.* Toxicity of imidacloprid to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 94, n. 6, p. 675-680, ago./fev. 2015.

TAVARES, Daiana Antonia *et al.* Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. **Environmental pollution**, v. 229, p. 386-393, abr./mai. 2017.

Terada, Y. **Contribuição ao estudo da regulação social em *Leurotrigona mulleri* e *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae)**. Ribeirão Preto. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP, 96 pp. 1974.

TOLEDO-HERNÁNDEZ, R. A. *et al.* Effect of three entomopathogenic fungi on three

species of stingless bees (Hymenoptera: Apidae) under laboratory conditions. **Journal of economic entomology**, v. 109, n. 3, p. 1015-1019, nov./mar. 2016.

TOMÉ, Hudson Vaner V. *et al.* Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata* anthidioides. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38406, fev./jun. 2012.

TOMÉ, Hudson Vaner V. *et al.* Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. **Chemosphere**, v. 124, p. 103-109, mar./dez. 2015.

VÁZQUEZ, Diego E. *et al.* Chronic exposure to glyphosate induces transcriptional changes in honey bee larva: A toxicogenomic study. **Environmental Pollution**, v. 261, p. 114148, nov./fev. 2020.

VIANA, Blandina F. *et al.* How well do we understand landscape effects on pollinators and pollination services?. **Journal of Pollination Ecology**, v. 7, ago./mai. 2012.

VIANA, Thais Andrade *et al.* Changes in innate immune response and detoxification in *Melipona quadrifasciata* (Apinae: Meliponini) on oral exposure to azadirachtin and spinosad. **Apidologie**, v. 52, n. 1, p. 252-261, fev./set. 2021.

VIT, Patricia; PEDRO, Silvia RM; ROUBIK, David (Ed.). **Pot-honey: a legacy of stingless bees**. Springer Science & Business Media, 2013.