**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Efeito do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* no
reconhecimento de companheiras de ninho da abelha *Tetragonisca
angustula* (Apidae: Meliponini)**

Felipe Chagas Rocha Almeida

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2020**

Felipe Chagas Rocha Almeida
Bacharel em Ciências Biológicas

Efeito do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* no reconhecimento de companheiras de ninho da abelha *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini)

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES BENTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Almeida, Felipe Chagas Rocha

Efeito do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* no reconhecimento de companheiras de ninho da abelha nativa *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini) / Felipe Chagas Rocha Almeida. - - Piracicaba, 2020.

55 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Hidrocarbonetos cuticulares 2. Insetos sociais 3. Abelhas sem ferrão
I. Título

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Orlivan Vieira (in memorian) e Rita de Cássia.
A todos que deixaram sua Terra-mãe em busca de um sonho ou algo maior.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Orlivan Vieira (in memorian) e Rita de Cássia, por todo amor e apoio durante todos esses anos. Obrigado pelo suor que por mim derramaram, pela fibra e coragem que nunca lhes faltou.

Ao Prof. Dr. José Maurício Simões Bento, pela confiança e orientação. Obrigado por todos os ensinamentos e oportunidades que me apresentou ao longo desta caminhada.

À Dra. Denise de Araujo Alves, por toda a ajuda.

Ao Fernando Sujimoto e Mariana Leite, pela amizade, carinho e atenção. Obrigado por toda a assistência e acolhimento, dividindo comigo todo esse afeto da socialidade.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Franciele, Madalon, Amanda, Hugo, Arodí, Paolo, Kamila, Mateus, Isabella, Felipe G., Rafaela, Rodrigo, Andresa, Diego M., Diego B., Leonardo, Flávia e Weliton. Obrigado pelo bom humor, companheirismo, auxílio, parcerias, as muitas risadas, aprendizado e momentos juntos.

Ao Dr. Jonathan Guerrero da UENF – RJ. Obrigado por toda a sua ajuda e assistência com os seus conhecimentos na identificação dos compostos cuticulares.

Ao Departamento de Entomologia e Acarologia e as queridas amizades que neste fiz: Maysa, Mayara, Isabella, Igor, Isabelle, Larine, Jéssica, Walter, Lucas, Thalita, Alexandre e Mateus. Agradeço a companhia e todas as conversas que ficarão comigo por onde eu for.

Aos meus amigos de longa data, Palloma, Denise, Verônica, Natali, Rafael, Thiago, Marlon e Hallyson, por todo o apoio e torcida. Obrigado por estarem comigo em cada momento e por acreditarem que era possível. Contar com vocês, mesmo que por distância, foi de grande valor para mim.

A todos os meus familiares, irmã, tios e tias, primos e primas, padrinho e madrinha. Obrigado por entenderem a minha ausência e depositarem em mim todo amor e afeto.

Ao órgão de fomento, CAPES, pelo auxílio financeiro e apoio científico.

Ao Criador, pelo sustento e luz a cada momento desta caminhada. Obrigado pela natureza!

EPÍGRAFE

Este é um capítulo a se findar, mas sei que ainda existem outros para começar.

Eu Estive Aqui.

[...]

“ É difícil em tempos como estes: ideais, sonhos e esperanças permanecerem dentro de nós, sendo esmagados pela dura realidade. É um milagre eu não ter abandonado todos os meus ideais, eles parecem tão absurdos e impraticáveis. No entanto, eu me apego a eles, porque eu ainda acredito, apesar de tudo, que as pessoas são realmente boas de coração. ”

- O Diário de Anne Frank, Anne Frank.

SUMÁRIO

Resumo	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELA	10
1. Introdução	12
2. Revisão bibliográfica	15
2.1. Abelhas eussociais e comunicação.....	15
2.2. Hidrocarbonetos cuticulares e o reconhecimento intraespecífico em abelhas sociais	16
2.3. Abelhas eussociais e microrganismos entomopatogênicos	18
2.4. Imunidade social em abelhas	19
2.5. <i>Tetragonisca angustula</i> como modelo de estudo	20
3. Material e métodos	24
3.1. Preparo dos isolados fúngicos	24
3.2. Aplicação dos inóculos fúngicos.....	26
3.3. Ensaio comportamentais	26
3.4. Análises químicas	27
3.5. Análises estatísticas	28
4. Resultados	30
4.1. Ensaio comportamentais	30
4.2. Hidrocarbonetos cuticulares.....	36
5. Discussão	40
6. CONCLUSÕES	45
Referências.....	46

RESUMO

Efeito do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* no reconhecimento de companheiras de ninho da abelha nativa *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini)

Os fungos entomopatogênicos são uma alternativa aos inseticidas para o controle de pragas agrícolas, em razão de sua maior seletividade aos inimigos naturais e polinizadores, porém seus efeitos sobre insetos benéficos são pouco conhecidos. Considerando que as abelhas sem ferrão (Meliponini) polinizam um amplo número de espécies vegetais silvestres e de culturas agrícolas de regiões tropicais, este estudo visou avaliar o efeito do fungo, *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin, na capacidade de reconhecimento das guardas de ninhos de *Tetragonisca angustula* (Latreille). Por meio de ensaios comportamentais, foram registradas as respostas das guardas em relação às forrageiras companheiras ou não-companheiras do ninho, expostas ou não ao fungo (por 2h e 24h), nas épocas seca e chuvosa. Adicionalmente, perfis de hidrocarbonetos cuticulares das forrageiras contaminadas ou não pelo fungo foram analisados. Os resultados mostraram que as forrageiras companheiras que foram expostas ao fungo apresentaram perfis cuticulares alterados e foram rejeitadas pelas guardas, do mesmo modo que observado para as não-companheiras de ninho. Estes resultados sugerem que o uso intensivo de fungos entomopatogênicos na agricultura pode interferir na composição de hidrocarbonetos cuticulares e, conseqüentemente, afetar na eficiente capacidade de reconhecimento de companheiras de ninho por guardas de *T. angustula*.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos cuticulares, Insetos sociais, Abelhas sem ferrão

ABSTRACT

Effect of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on recognition of nestmates of the native bee *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini)

Entomopathogenic fungi are an alternative form of insect-pest control, due to their higher selectivity to natural enemies and pollinators, but their effects on these beneficial insects remain largely unknown. Considering that in the tropics a large number of wild plant species and agricultural crops are pollinated by stingless bees (Meliponini), this study aimed to evaluate the effect of the fungus, *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin, on the nestmate recognition ability of guards in *Tetragonisca angustula* (Latreille). Through behavioural assays, guards' responses were recorded towards nestmate and non-nestmates, fungus-exposed versus unexposed foragers (for 2h and 24h), in the dry and rainy seasons. In addition, cuticular hydrocarbon profiles of fungus-exposed and unexposed foragers were analysed. The results showed that fungus-exposed nestmates have altered their cuticular profiles and were aggressively rejected by guards, as well as for non-nestmate foragers. These results suggest that the intensive use of entomopathogenic fungi in crop fields can interfere in the composition of cuticular hydrocarbon profiles and, consequently, affect the efficient capacity of nestmate recognition by *T. angustula* guards.

Keywords: Cuticular hydrocarbons, Social insects, Stingless bees

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. a) Interior do ninho da abelha, *Tetragonisca angustula* com favos de cria sobrepostos no centro, envoltos por lamelas de cerume e potes de pólen (à esquerda). b) Rainha fisogástrica ovipositando com corte de operárias. c) Guardas paradas sobre o tubo de entrada do ninho. d) Guarda (esquerda) e forrageira (direita). e) Forrageira com carga de pólen na corbícula em flor de lichia. (Fonte: Fototeca Cristiano Menezes). 23.
- Fig. 2. (a) Fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, em placa de Petri com meio de cultura BDA. (b) Guardas da abelha, *Tetragonisca angustula* sobre a entrada do ninho enquanto forrageira com carga polínica se aproxima (Fonte: Fototeca Cristiano Menezes). 25.
- Fig. 3. Porcentagem média ($\pm$ desvio-padrão) de forrageiras companheiras e não-companheiras de ninho, expostas ou não ao fungo, *Beauveria bassiana* por 2h e rejeitadas por guardas de *Tetragonisca angustula*, nas épocas seca (A) e chuvosa (B). Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, $P<0,05$). 31.
- Fig. 4. Porcentagem média ($\pm$ desvio-padrão) de forrageiras companheiras e não-companheiras de ninho, expostas ou não ao fungo, *Beauveria bassiana* por 24h e rejeitadas por guardas de *Tetragonisca angustula*, nas épocas seca (A) e chuvosa (B). Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, $P<0,05$). 32.
- Fig. 5. Tempo médio ($\pm$ desvio-padrão) para o início da rejeição de forrageiras companheiras ou não-companheiras de ninho, expostas ou não ao fungo, *Beauveria bassiana* por 2h, pelas guardas de *Tetragonisca angustula*, nas épocas seca (A) e chuvosa (B). Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, $P<0,05$); *Devido ao baixo número de companheiras não-expostas rejeitados, elas foram excluídas desta análise. 34.
- Fig. 6. Tempo médio ($\pm$ desvio-padrão) para o início da rejeição de forrageiras companheiras ou não-companheiras de ninho, expostas ou não ao fungo, *Beauveria bassiana* por 24h, pelas guardas de *Tetragonisca angustula*, nas épocas seca (A) e chuvosa (B). Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, $P<0,05$); *Devido ao baixo número de companheiras não-expostas rejeitados, elas foram excluídas desta análise. 35.
- Fig. 7. Média ($\pm$ desvio-padrão) da quantidade relativa de compostos cuticulares presentes nas forrageiras da abelha, *Tetragonisca angustula*, expostas ou não ao fungo, *Beauveria bassiana* por 2 e 24h, respectivamente. Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, $P<0,05$). 36.
- Fig. 8. Análise discriminante linear (LDA) dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares dos grupos de forrageiras da abelha, *Tetragonisca angustula*, não-expostas e expostas ao fungo, *Beauveria bassiana* por 2 e 24h. Letras de A a R representam os compostos apresentados na Tabela 1. . 39.

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Quantidade de hidrocarbonetos cuticulares (média $\pm$ desvio-padrão) nos corpos de forrageiras de <i>Tetragonisca angustula</i> , expostas ou não ao fungo <i>Beauveria bassiana</i> por 2 e 24h.	38.
---	-----

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional humano das últimas décadas tem imposto desafios significativos para atender as demandas de produção de alimentos (Barret, 2010). Para suprir essa crescente necessidade, avanços tecnológicos e na pesquisa baseiam-se amplamente na intensificação do manejo das terras já cultivadas (Southgate, 2009). Para tal tem-se o uso de variedades agrícolas de alta produtividade, irrigação, mecanização, fertilizantes e agroquímicos (Tilman *et al.*, 2011; Jayne *et al.*, 2019). Contudo, a intensificação da agricultura foi acompanhada pelo aumento do comércio internacional e a resultante transferência de culturas agrícolas e espécies de pragas em todo o mundo (MacLeod *et al.*, 2010). Desencadeou-se então uma dependência do controle químico, altos custos de produção, bioacumulação nas cadeias alimentares, resistência de insetos-praga e perda de biodiversidade nos agroecossistemas (Southgate, 2009).

Dentre os organismos não-alvo afetados pelo uso indiscriminado de pesticidas químicos estão os polinizadores (Whitehorn *et al.*, 2012; Sanchez-Bayo & Goka, 2014; Potts *et al.*, 2016). O risco para esses agentes ocorre por uma combinação da toxicidade e do nível de exposição, que varia de acordo com os compostos utilizados e da escala de manejo da paisagem agrícola (Migdał *et al.*, 2018). Como as abelhas correspondem a cerca de 90% dos polinizadores de culturas agrícolas economicamente importantes, os inseticidas e fungicidas químicos causam uma ampla gama de efeitos letais e subletais (Potts *et al.*, 2016), impactando negativamente suas populações (Brittain & Potts, 2011; Fairbrother *et al.*, 2014; Crenna *et al.*, 2020).

Diante de tais preocupações, tecnologias e práticas agrícolas mais sustentáveis e com menores impactos ambientais vêm recebendo maior atenção. Nesse cenário, encontra-se o controle biológico, que consiste no uso de predadores, parasitoides e/ou patógenos para controle de populações da praga-alvo (van Lenteren & Woets). O uso de fungos entomopatogênicos cresce a cada ano, graças à sua capacidade de infectar e eliminar múltiplas espécies de insetos e ácaros (Shah & Pell, 2003).

Amplamente propagado na natureza, *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin está entre os agentes microbianos mais promissores nos agroecossistemas. Aparentemente, por não representar uma ameaça direta à sobrevivência das abelhas, seus esporos são disseminados em plantações por meio do uso de forrageiras de *Bombus terrestris* (L.) e *Apis mellifera* L. (Vandenberg, 1990; Meikle *et al.*, 2008). Contudo, apesar da ausência de relatos quanto aos impactos diretos sobre as colônias, seus efeitos subletais podem ser observados nos indivíduos, como por exemplo, na diminuição da

velocidade de forrageamento (Challa *et al.*, 2019). Também podem provocar alterações do perfil cuticular (Csata *et al.*, 2017), particularmente dos hidrocarbonetos que são abundantes na epicutícula dos insetos (Blomquist & Bagnères, 2010), e variações quantitativas e/ou qualitativas desses compostos orgânicos interferem no reconhecimento intra- e/ou interespecífico (van Zweden & d'Ettorre, 2010).

Em insetos com organização social, os hidrocarbonetos são cruciais em muitos contextos inter- e intracoloniais de sinalização, como reconhecimento de companheiras de ninho, divisão de tarefas e *status* reprodutivo (Martin & Drijfhout, 2009; van Zweden & d'Ettorre, 2010). Porém, a função primária desses compostos orgânicos é a proteção contra a perda de água (Gibbs, 1998) e, possivelmente, a complexidade de sua síntese esteja relacionada à supressão do crescimento de microrganismos (Golebiowski *et al.*, 2008; Baracchi *et al.*, 2012). Por outro lado, os entomopatógenos são capazes de degradar as cadeias de hidrocarbonetos (Pedrini *et al.*, 2013), podendo influenciar o sistema de reconhecimento de companheiras de ninho em espécies de insetos eussociais (Breed *et al.*, 1998).

Entre as abelhas com organização eussocial, as abelhas sem ferrão compõem o grupo mais diversos, com mais de 510 espécies distribuídas nas regiões tropicais do mundo (Ascher & Pickering, 2019). Assim como *A. mellifera*, suas colônias são perenes e compostas por uma rainha-mãe e centenas a milhares de operárias, que coordenam e desempenham diferentes atividades dentro e fora do ninho (Michener, 1974).

Além da divisão de trabalho coordenada de acordo com a idade das operárias, em *Tetragonisca angustula* (Latreille), os ninhos são defendidos por guardas morfologicamente especializadas. Estas possuem pernas posteriores mais fortes, maior massa corporal (Grüter *et al.*, 2012), maior número de sensilas sensoriais nas antenas (Grüter *et al.*, 2017), e maiores quantidades de alcanos ramificados em seus perfis de hidrocarbonetos cuticulares (Balbuena *et al.*, 2018) em relação às forrageiras. Dessa forma, guardas com adaptações morfológicas aprimoram o funcionamento das colônias, já que são melhores em reconhecer invasores intraespecíficos (Grüter *et al.*, 2017), com menores taxas de erros (Jones *et al.*, 2012). O reconhecimento de potenciais intrusos baseia-se na capacidade das guardas de detectar diferenças sutis entre o odor de sua colônia e a composição de hidrocarbonetos cuticulares das abelhas que tentam entrar em seus ninhos (van Zweden & d'Ettorre, 2010).

Considerando que (a) as forrageiras frequentemente visitam culturas agrícolas para coleta de recursos tróficos e estão expostas a fungos entomopatogênicos utilizados como controle microbiano, (b) a contaminação fúngica é capaz de alterar o perfil cuticular do

indivíduo (Cappa *et al.*, 2019), (c) as colônias são defendidas por grupos de guardas especializadas morfologicamente (Hammel *et al.*, 2016) e (d) o reconhecimento de companheiras de ninhos pelas guardas é altamente eficiente (Jones *et al.*, 2012), o objetivo deste estudo foi investigar a capacidade de guardas de *T. angustula* em reconhecer companheiras de ninho expostas ou não ao fungo, em duas épocas distintas do ano. Para tal, avaliou-se: (i) se há alteração do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de forrageiras expostas ao fungo entomopatogênico; (ii) se as guardas tratam essas forrageiras de forma diferenciada em relação às forrageiras não-expostas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Abelhas eussociais e comunicação

Enquanto algumas espécies de animais somente estabelecem relações intraespecíficas em determinadas fases da vida, como a cópula, outras interagem interruptamente com indivíduos aparentados e dispõem de repertórios comportamentais muito sofisticados (Le Conte & Hefetz, 2008). Os insetos apresentam todos os níveis de socialidade, desde o solitário até o eussocial (Michener, 1974). Com grupos bem-estruturados e mantidos por interações intraespecíficas complexas (Robinson & Ben-Shahar, 2002), os insetos eussociais são caracterizados por sobreposição de gerações, cuidado cooperativo com a prole e divisão reprodutiva de trabalho, com diferenciação de castas reprodutiva e não-reprodutiva (Wilson, 1971).

A eussocialidade evoluiu muitas vezes nas ordens de insetos, independentemente de sua estrutura genética, sejam nos organismos clonais (Hemiptera) (Aoki, 1980), nos diploides (Blattaria e Coleoptera) ou nos haplodiploides (Hymenoptera e Thysanoptera) (Crespi, 1992; Thorne, 1997; Biedermann, 2014). Contudo, a eussocialidade evoluiu mais vezes nos Hymenoptera, em especial nas abelhas. Tanto a eussocialidade primitiva (Allodapini e Bombini) quanto a avançada (Apini e Meliponini) ocorrem em Apidae (Danforth *et al.*, 2013), a maior família de abelhas, com cerca de 6 mil espécies descritas (Ascher & Pickering, 2020).

Abelhas altamente eussociais são de particular interesse econômico, além de estocarem mel, pólen e resinas, elas são manejadas em agroecossistemas para polinização agrícola (Gallai *et al.*, 2009; Potts *et al.*, 2016). Além das questões aplicadas, essas espécies são excelentes modelos biológicos para estudos ecológicos e/ou evolutivos, como os relacionados à organização e evolução do comportamento social. As colônias dessas abelhas são compostas por operárias, que são funcionalmente estéreis e responsáveis por todas as atividades de crescimento e manutenção da colônia (Michener, 1974). Todas estas interações dentro e fora do ninho são mediadas por uma comunicação eficiente e elaborada (Leonhardt *et al.*, 2016).

Em geral, os organismos comunicam-se utilizando uma variedade de meios, como referências espaciais e sinais visuais, tácteis, auditivos e químicos (Goulson *et al.*, 2000; Schneider & Lewis, 2004). A comunicação que medeia o comportamento cooperativo intraespecífico envolve a emissão de sinais específicos por um emissor, sua recepção e processamento pelo receptor com subsequente efeito adaptativo comportamental em ambos os organismos (Huber, 1988). A conhecida dança das abelhas *Apis mellifera* L.,

usada para recrutar as forrageiras para locais com recursos alimentares e decodificada por von Frisch em 1967 (Michener, 1974), constitui apenas uma parte dos sistemas de comunicação que operam em uma colônia.

Ainda assim, o modo predominante e mais antigo de comunicação nos insetos sociais se dá por meio de mensagens químicas (Richard & Hunt, 2013). Os compostos envolvidos na troca dessas mensagens podem mediar interações (i) entre indivíduos de espécies distintas, os aleloquímicos; ou (ii) entre indivíduos da mesma espécie, os feromônios (Hölldobler & Wilson, 1990). Além dos feromônios elicitarem comportamentos de alarme (Moser *et al.*, 1968) e atração (Pickett *et al.*, 1980), também são utilizados para o reconhecimento químico entre indivíduos (Alaux *et al.*, 2010), sejam dos parceiros sexuais (Koeniger *et al.*, 1989), da rainha (Noonan, 1986) ou das companheiras de ninho (Breed, 1983). Dessa forma, os feromônios são cruciais em muitos contextos de comunicação intracolônia que regulam comportamentos sociais (Hölldobler & Wilson, 1990). A percepção de variações mínimas nos compostos químicos possibilita aos membros da colônia obterem informações sobre parentesco, tarefas dentro do ninho que são valiosas para o crescimento e sobrevivência da colônia, hierarquia social e *status* reprodutivo (Blomquist & Bagnères, 2010).

O reconhecimento entre os indivíduos é mediado por pistas olfativas (Wilson 1971; Page & Breed, 1987), não somente por compostos voláteis, como também por hidrocarbonetos cuticulares (Blomquist & Bagnères, 2010). Apesar desses hidrocarbonetos apresentarem como função primária a proteção contra perda de água, eles estão relacionados com o processo de reconhecimento entre os insetos (Blomquist, 2010), quando há contato entre indivíduos. O comportamento de limpeza mútua talvez seja o principal responsável pela passagem das moléculas para os membros da colônia, homogeneizando o odor desta (Richard & Hunt, 2013).

2.2. Hidrocarbonetos cuticulares e o reconhecimento intraespecífico em abelhas sociais

Os hidrocarbonetos são os componentes químicos orgânicos mais abundantes na camada cerosa que reveste a cutícula dos insetos sociais, e são agrupados em três classes estruturais, os alcanos lineares, os alcanos ramificados e os alcenos (Blomquist & Bagnères, 2010). Embora os principais grupos químicos relacionados ao reconhecimento, em ordem de incidência, sejam n-alcanos, metilalcanos, alcenos, dienos, metilalcadienos e trienos (Martin & Drijhout, 2009), a cutícula de abelhas recém-

emergidas pode ser comparada a uma “folha em branco”, e esses compostos são adquiridos após exposição ao ambiente colonial (Breed & Page, 1991; Breed *et al.*, 2004). Em especial, os alcanos lineares e alcenos estão envolvidos com a diferenciação entre grupos de operárias de *A. mellifera* (Kather *et al.*, 2011), já que operárias tratadas com alcenos, são atacadas mais intensamente por suas companheiras de ninho do que as tratadas com alcanos (Dani *et al.*, 2005).

A complexidade dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares e suas variações, seja presença ou ausência de compostos específicos ou na abundância relativa de compostos, são detectadas pelas operárias durante contatos antenais (Buchwald & Breed, 2005). Assim, os membros das colônias obtêm informações sobre parentesco, divisão de trabalho, hierarquia social, fertilidade (Smith *et al.*, 2012).

Da mesma forma que para outras abelhas eussociais, os perfis de hidrocarbonetos das espécies sem ferrão (Meliponini) são muito diversos, variando gradualmente de indivíduos completamente estéreis aos totalmente férteis (Koedam *et al.*, 2007). Embora os meliponíneos formem o grupo com maior número de espécies entre as abelhas eussociais, avaliações sobre a relação dos hidrocarbonetos cuticulares no reconhecimento intraespecífico ainda são reduzidas, ainda mais se considerarmos que muitas características biológicas desse grupo de abelhas diferem da já bem estudada *A. mellifera* (Châline *et al.*, 2005).

Até o momento, a maioria dos estudos utilizando abelhas sem ferrão como modelos biológicos focaram na identificação dos hidrocarbonetos cuticulares de operárias e rainhas de diferentes idades e/ou estados fisiológicos (e.g., Abdalla *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2009; Nascimento & Nascimento, 2012). Dentre esses, sabemos que operárias de diferentes colônias de *Scaptotrigona bipunctata* (Lepelletier) apresentam diferenças nos perfis químicos cuticulares (Jungnickel *et al.*, 2004) e que os alcanos e alcenos são os principais compostos utilizados no reconhecimento de companheiras de ninho de *Trigona fulviventrís* Guérin (Buchwald & Breed, 2005). Nesta mesma linha, foi demonstrado que o perfil químico de operárias de *Schwarziana quadripunctata* (Lepelletier) não apenas difere entre colônias, mas também entre faixas etárias e entre castas (Nunes *et al.*, 2009). Também, operárias apresentam perfis cuticulares específicos de acordo com a tarefa executada em *Melipona marginata* Lepelletier (Ferreira-Caliman *et al.*, 2010), *S. postica* (Latreille) (Poiani *et al.*, 2000) e *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Balbuena *et al.*, 2018).

2.3. Abelhas eussociais e microrganismos entomopatogênicos

Com o crescente interesse do controle biológico no manejo integrado de pragas, cada vez mais são utilizados parasitoides e predadores (Parra, 2014), bem como microrganismos entomopatogênicos (Mascarin *et al.*, 2019), nos agroecossistemas. Entre os agentes microbianos, os fungos representam cerca de 80% das patologias que afetam esses artrópodes, com mais de 700 espécies conhecidas (Blackweel, 2010). Grande parcela desses fungos entomopatogênicos pertencem ao filo Ascomycota, ordem Hypocreales, considerados patógenos generalistas, com capacidade para infecção de diversos hospedeiros (Alves, 1998; Mascarin *et al.*, 2019).

Em Hypocreales, encontra-se Cordycipitaceae, que abriga diversos gêneros de importância agrícola como *Beauveria*, *Simplicillium* e *Isaria* (Humber, 2012). Estes patógenos desenvolveram, ao longo de seu processo evolutivo, estruturas e/ou mecanismos capazes de ultrapassar e até mesmo degradar a camada epicuticular dos insetos (Napolitano & Juárez, 1997). Os conídios são esporos infectivos que penetram na cutícula de seu hospedeiro (Hesketh *et al.*, 2010) e esse processo infeccioso se dá por interação hidrofóbica que causa alterações no tegumento do inseto, permitindo que o fungo seja nutrido e amplie seu poder germinativo (Alves, 1998).

Como *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokīn e *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin degradam uma variedade de compostos de hidrocarbonetos, é provável que eles não apenas reconheçam e assimilem hidrocarbonetos específicos dos hospedeiros, mas também sejam capazes de alterar o perfil cuticular, o que pode afetar o comportamento e a ecologia dos hospedeiros (Pedrini *et al.*, 2013). *Beauveria bassiana* utiliza vários dos hidrocarbonetos cuticulares dos insetos, incluindo os alcanos (Napolitano & Juarez, 1997). A expressão de uma variedade de enzimas hidrolíticas, como proteases e lipases, promove a germinação e crescimento do fungo através da superfície cuticular e subsequente penetração desta camada (Xiao, 2012). Durante esse processo, o fungo produz inúmeras estruturas especializadas que podem incluir apressórios, que permitem que as hifas em crescimento penetrem no tegumento do hospedeiro (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013).

Diante da eficácia em matar insetos-praga e por se tratar de um controle biológico mais sustentável, o mercado de entomopatógenos cresceu bastante nos últimos anos (Santos *et al.*, 2012; Mascarin *et al.*, 2019; Ong *et al.*, 2019). Dentre as diversas espécies sendo produzidas para o comércio mundial, *M. anisopliae* e *B. bassiana* são aplicados em diversas culturas agrícolas polinizadas por insetos (Faria & Wraight, 2007). Desse modo, possivelmente, os esporos fúngicos desses microrganismos podem se aderir aos corpos

das forrageiras de abelhas sociais durante as visitas nas flores destas culturas (Zimmermann, 2007). Em *A. mellifera*, aparentemente, esses fungos não representam grande ameaça às colônias, em razão de seus comportamentos higiênico e termorregulatório (Kevan *et al.*, 2003), tanto que essa espécie tem sido utilizada para a disseminação de esporos para controle de populações de pragas em culturas agrícolas (Meikle *et al.*, 2008).

No entanto, assim como doses subletais de pesticidas são capazes de alterar características comportamentais, como a capacidade de orientação de organismos não-alvo (Fischer *et al.*, 2014), a mesma atenção deve ser dada aos potenciais efeitos dos fungos entomopatogênicos. Após a infecção e a ativação do sistema imune, ocorre a alteração no perfil cuticular das abelhas e, por conseguinte, há interferência na sua capacidade de reconhecimento de companheiras (Richard *et al.*, 2008). Diante disso, estudos que avaliem o uso de fungos entomopatogênicos tornam-se relevantes, visto que, embora supostamente seguros, o controle microbiano pode ter efeito na sobrevivência da colônia (Toledo-Hernández *et al.*, 2016). Recentemente, Cappa *et al.* (2019) demonstraram que *B. bassiana* altera a capacidade de reconhecimento de companheiras e não-companheiras por guardas de *A. mellifera*, o que favorece a propagação de doenças nas colônias. Considerando ainda que forrageiras estão constantemente sujeitas às contaminações do meio ambiente, comportamentos relacionados à imunidade social são vitais para reduzir a carga de patógenos, assegurando a saúde e sobrevivência da colônia (Hölldobler & Wilson, 1990).

2.4. Imunidade social em abelhas

Os insetos sociais são bem conhecidos por seu alto grau de cooperação, que confere muitos benefícios às relações hierárquicas, estratégias reprodutivas, termorregulação, obtenção de alimento, defesa do ninho contra predadores e combate a doenças e parasitas (Beekman & Ratnieks, 2003). Embora viver em grupo aumente a probabilidade de transmissão de patógenos e parasitas entre seus membros, a cooperação e assistência provida por todos os membros do grupo evitam, controlam ou eliminam coletivamente infecções parasitárias (Schmid-Hempel & Loosli, 1998). Essa imunidade social é análoga ao sistema imunológico de organismos multicelulares conferindo proteção antiparasitária em nível colonial (Liu *et al.*, 2019). Além do comportamento higiênico, comunicação de alarme e defesas fisiológicas, a organização

espacial e regulação da frequência de contatos físicos entre os indivíduos são fatores decisivos para a proteção colonial (Cremer *et al.*, 2018).

Em *A. mellifera*, o comportamento higiênico não apenas confere às abelhas a capacidade de detectar e remover a prole adoecida, mas também é um mecanismo de resistência e defesa contra doenças e parasitas (Spivak & Downey, 1998). Justamente pelos hábitos higiênicos das operárias, os indivíduos doentes e/ou mortos são rapidamente removidos antes do agente patogênico tornar-se infeccioso para toda a colônia (Arathi *et al.*, 2000). Operárias de *Melipona beecheii* Bennett, *M. scutellaris* Latreille, *Plebeia remota* (Holmberg), *Scaptotrigona depilis* Moure, *S. pectoralis* (Dalla Torre) e *T. angustula* também removem das células a cria morta e/ou infectada, que é descartada no lixo que será removido do ninho (Nunes-Silva *et al.*, 2009; Medina & Ratnieks, 2014; Al Toufailia *et al.*, 2016).

Aliada a esses mecanismos de imunidade social, forrageiras de Apini e Meliponini coletam resinas vegetais e as transportam para seus ninhos em suas corbículas (Michener, 1974). A própolis, estocada e utilizada para diversas finalidades, atua contra vários patógenos bacterianos, virais e fúngicos (Ghisalberti, 1979), aprimorando a resistência colonial. Essa mistura de exsudatos de plantas, secreções salivares das abelhas, que formam a própolis, aparentemente atua na proteção da colmeia contra microrganismos (Marcucci, 1995; Torres *et al.*, 2008).

Além disso, de modo semelhante ao que ocorre com organismos multicelulares, as colônias podem tolerar perdas de indivíduos desde que sua funcionalidade seja mantida (Wilson & Sober, 1989). Para tal, além dos mecanismos mencionados anteriormente, há outros que conferem resistência diante de doenças individuais ou sociais. Por exemplo, quando algum agente patogênico infecta alguns membros de *A. mellifera*, há um aumento da temperatura da colônia para reduzir efetivamente a carga de patogênica (Starks *et al.*, 2000). Vale ressaltar que, de modo geral, o *grooming* é a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores (Zhukovskaya *et al.*, 2013), com direta influência na saúde da colônia (Konrad *et al.*, 2012), sabendo-se que operárias contaminadas recebem mais interações de limpeza (*allogrooming*) (Hölldobler & Wilson, 1990; Novak & Cremer, 2015).

2.5. *Tetragonisca angustula* como modelo de estudo

As abelhas sem ferrão possuem ampla distribuição nos trópicos, com mais de 500 espécies descritas (Ascher & Pickering, 2020) e, destas, cerca de 250 espécies ocorrem no Brasil (Pedro, 2014). Assim, as abelhas sem ferrão representam o grupo mais

diversificado comportamental e morfológicamente entre as abelhas eussociais (Michener, 2007).

Providas de um ferrão vestigial e não-funcional, essas abelhas apresentam outras estratégias de defesa contra seus inimigos (Wittmann, 1985). Dentre elas estão as entradas camufladas, a deposição de ácido fórmico que provoca queimaduras, ou mesmo os comportamentos de mordiscar, enrolar ou depositar resinas nos pelos do predador (Halcroft *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2014; Shackleton *et al.*, 2015).

De um modo geral, os comportamentos defensivos são realizados por um grupo de operárias, as guardas (Wilson, 1971). Em Meliponini, assim como em Apini, ocorre o polietismo etário – a divisão de trabalho entre as operárias é dependente da idade – no qual as operárias mais jovens realizam atividades no interior do ninho e se afastem deste à medida em que envelhecem, tornando-se guardas e depois forrageiras (Michener, 1974; Wille, 1983). Apesar disso, essas tarefas nem sempre são rigidamente estabelecidas e, dependendo das condições e necessidades da colônia, as operárias podem ser realocadas para outras tarefas (Michener, 1974).

Tetragonisca angustula apresenta um sofisticado sistema de guarda de ninhos, que consiste em dois grupos: o que fica em voo pairado próximo à entrada, hábil no reconhecimento visual dos indivíduos e pronto para atacar possíveis ameaças que se aproximem do ninho (Grüter *et al.*, 2012); o que permanece parado no tubo de entrada, que distingue as companheiras de ninho das demais por contatos antenais (Kärcher & Ratnieks, 2009). Ambos os tipos de guardas se complementam e aumentam o poder defensivo da colônia (Wittmann, 1985; Shackleton *et al.*, 2018). Somado a este poderio defensivo, as morfo-especializações das guardas tornam essa espécie um interessante modelo para estudos sobre evolução do comportamento de defesa de animais sociais.

Com distribuição desde o sul do México até o sul do Brasil, *T. angustula* ocorre com frequência em áreas antropizadas e estabelecem suas colônias em ocos de árvores, mas também em cavidades de praticamente qualquer edificação (Michener, 2007). Seus ninhos são compostos por favos de cria horizontais (Fig. 1a), envoltos por muitas lamelas de cerume, e potes ovalados de mel e pólen, sendo comum encontrar depósitos de própolis (Nogueira-Neto, 1997). Esta combinada com a cera produzida pelas operárias formam o cerume, que é utilizado como material de construção de praticamente todas as estruturas arquitetônicas dos ninhos (Roubik, 1983), inclusive do tubo de entrada do ninho (Fig. 1c) bastante característico para a espécie. As colônias de *T. angustula* são compostas por uma rainha-mãe (Fig. 1b) e até 10 mil operárias (van Veen & Sommeijer, 2000). Enquanto as guardas (Fig. 1d) reconhecem e atacam os invasores inter- e

intraespecíficos, com suas mandíbulas, as forrageiras (Fig. 1e) são as responsáveis pela busca dos recursos alimentares nas flores. Além da importância ecológica como polinizadora e da sua própolis com atividade antibacteriana (Sgariglia *et al.*, 2010), *T. angustula* produz um mel de sabor bastante apreciado, sendo este mais lucrativo quando comparado ao de *A. mellifera* (Imperatriz-Fonseca *et al.*, 1984; Vit *et al.*, 2013).

Fig. 1. a) Interior do ninho da abelha, *Tetragonisca angustula* com favos de cria sobrepostos no centro, envoltos por lamelas de cerume e potes de pólen (à esquerda). b) Rainha fisogástrica ovipositando com corte de operárias. c) Guardas paradas sobre o tubo de entrada do ninho. d) Guarda (esquerda) e forrageira (direita). e) Forrageira com carga de pólen na corbícula em flor de lichia (Fonte: Fototeca Cristiano Menezes).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado com dez ninhos de *T. angustula* mantidos no meliponário do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior em Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP, Piracicaba, Estado de São Paulo). Destes, cinco estavam alojados em colmeias confeccionadas com madeira, três estavam alojadas em ocos de paredes de alvenaria e duas em tubulações. Os experimentos foram conduzidos em na época seca (precipitação média de $18,57 \pm 8,42$ mm; temperatura média de $19,8 \pm 6,12^{\circ}\text{C}$; entre o final de abril e início de julho de 2019) e chuvosa (precipitação média de $103,14 \pm 60,67$ mm; temperatura média de $25,3 \pm 5,12^{\circ}\text{C}$; de dezembro de 2019 a fevereiro de 2020).

3.1. Preparo dos isolados fúngicos

O isolado de *B. bassiana* ESALQ-PL63 foi obtido do banco de fungos entomopatogênicos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, ESALQ/USP. Para as amostras de conídios puros, com auxílio da alça de Drigalsky, realizou-se a repicagem fúngica, espalhando-os em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio de cultura BDA (Difco®). Tanto as placas de Petri e outras vidrarias quanto o meio foram previamente autoclavados e todo o processo foi realizado em câmara de fluxo laminar. Após inoculadas com os fungos, as placas foram incubadas em câmara B.O.D. a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12h por 10 dias, para ocorrência da esporulação (Fig. 2a).

Para o preparo das suspensões fúngicas, os conídios produzidos no meio BDA foram raspados com espátula metálica esterilizada. Para ajustar a concentração em 10^6 conídios/mL, margem compatível ao valor dos conídios viáveis encontrados por grama nos produtos comerciais, realizou-se diluição seriada e sua contagem em câmara de Neubauer. A suspensão fúngica foi misturada com espalhante adesivo Tween80 (Oxiten®[®], Brasil) e cada tubo contendo 10mL desta suspensão foi submetido a agitador elétrico.

Fig. 2. a) Fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, em placa de Petri com meio de cultura BDA. b) Guardas da abelha, *Tetragonisca angustula* sobre a entrada do ninho enquanto forrageira com carga polínica se aproxima (Fonte: Fototeca Cristiano Menezes).

3.2. Aplicação dos inóculos fúngicos

Todos os ensaios comportamentais foram realizados com forrageiras de *T. angustula*, carregando cargas de pólen em suas corbículas (Fig. 2b). Estas abelhas foram coletadas na entrada do ninho, com o auxílio de aspirador entomológico, no momento em que retornavam às suas respectivas colônias. Esses indivíduos foram levados ao laboratório, identificados quanto ao ninho de origem e separados em grupos quanto à inoculação tópica ou não da solução fúngica. Por fim, todas as abelhas foram mantidas em câmara climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) até a realização dos bioensaios.

De cada ninho, para cada experimento de 2 e de 24h de exposição ao fungo, foram coletadas cerca de 40 forrageiras. Posteriormente, dez destes indivíduos foram utilizados como companheiras de ninho expostas ao fungo, e outros dez como companheiras de ninho não-expostas ao fungo. As demais forrageiras, foram separadas em expostas e não-expostas ao fungo, sendo apresentadas aleatoriamente, após sorteio, para guardas de outras colônias como não-companheiras.

Todas as forrageiras foram previamente colocadas em freezer a -4°C , por cerca de 2min, apenas para imobilizá-las temporariamente. Em câmara de fluxo laminar, 1 μL de solução 0,05% de Tween80, com cerca de 10^6 conídios/mL de *B. bassiana*, foi aplicado topicamente no tórax das forrageiras expostas a este fungo. O tempo de permanência foi de 2 ou 24h de acordo com os ensaios comportamentais. As forrageiras não-expostas ao fungo também receberam 1 μL de solução 0,05% de Tween80 na região torácica, porém sem os conídios.

3.3. Ensaios comportamentais

Os grupos tratamento e controle contendo 10 forrageiras foram mantidos em placa de Petri de 9 cm de diâmetro em câmara de criação de insetos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12h de fotofase. Essas abelhas foram mantidas nessas condições até a realização dos bioensaios, ficando assim expostas ao fungo por 2 ou 24h. Foram cerca de 800 forrageiras, divididas em cada tratamento, usadas tanto para a estação seca (de abril a julho de 2019) quanto para a estação chuvosa (de dezembro de 2019 a fevereiro de 2020). Vale ainda ressaltar que os ensaios para cada tempo não aconteceram de modo simultâneo.

A cada tempo de exposição (2 ou 24h), 10 forrageiras de cada colônia foram alocadas nos seguintes grupos: i) companheiras de ninho não-expostas ao fungo; ii)

companheiras de ninho expostas ao fungo; iii) não-companheiras de ninho não-expostas ao fungo, e; iv) não-companheiras de ninho expostas ao fungo. Através de sorteio (www.tirardado.com) foram definidos a origem das 20 forrageiras não-companheiras (10 expostas; 10 não-expostas ao fungo) a serem apresentadas para cada colônia do ensaio em questão.

A partir deste ponto, outra pessoa que não o apresentador dos bioensaios, transferia individualmente cada abelha, de grupos previamente codificados, para frascos de vidro de 8cm. Estes frascos estavam marcados com códigos tabulados referentes à colônia de origem e exposição ou não ao fungo. Forrageiras mortas durante o processo foram removidas e substituídas por novos indivíduos.

Para realização dos bioensaios, os tubos de vidro contendo as forrageiras permaneceram em caixa de isopor com gelo, imobilizando-as temporariamente até momento do experimento. Em seguida, as abelhas eram retiradas dos frascos e permitidas se aquecerem em temperatura ambiente, porém de forma que não voassem. Cada forrageira retirada do tubo de vidro, com o auxílio de uma pinça entomológica flexível, era colocada na entrada do ninho e observada por até 2min, contabilizados a partir do momento de apresentação. As apresentações foram registradas em vídeo-câmera posicionada a 1m de distância da entrada do ninho. Um intervalo de 5min era dado entre cada apresentação, permitindo que a colônia se reestabelecesse.

A interação entre guarda e forrageira foi definida como: (i) rejeição, quando a forrageira apresentada era atacada pelas guardas (morder, agarrar e arrastar) e impedida de entrar no ninho; (ii) aceitação, quando a forrageira era lambida ou fazia contatos antenais com as guardas, entrando livremente no ninho. Passados 2 min, caso não ocorresse rejeição pelas guardas, a observação era encerrada. Se a forrageira voasse, esta era substituída por outra forrageira submetida às mesmas condições. Todos os bioensaios foram realizados por um único observador entre às 10:00 e 16:00h.

3.4. Análises químicas

Das dez colônias de *T. angustula* utilizadas para os ensaios comportamentais, outras 60 forrageiras foram coletadas e identificadas, como descrito anteriormente. Esses indivíduos foram divididos em três grupos: i) controle; ii) exposição por 2h a *B. bassiana*; iii) exposição por 24h a *B. bassiana*. Em seguida, para extração e análise dos compostos cuticulares, as abelhas foram levadas ao Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos da ESALQ/USP. Elas foram submetidas à lavagem cuticular,

sendo que para cada 0,2mL de hexano eram imersos dois indivíduos em um vial de 1mL por 2min (modificado de Balbuena *et al.*, 2018). Posteriormente, o solvente era evaporado em fluxo contínuo de nitrogênio e ressuspendido a 0,1mL de hexano, com a adição e subsequente agitação de 10µL de octadecano ($C_{18}H_{38}$), definido como padrão interno.

A separação e análise dos compostos foram realizadas tanto por cromatografia gasosa com detector por ionização da chama (GC-FID, Shimadzu 2010), quanto por cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa (GC-MS, QP Shimadzu 2010 Ultra). Esses operaram com fluxo contínuo de 1mL/min (He) com temperatura inicialmente ajustada para 150°C (mantida por 1min), aumentando 3°C/min até atingir 300°C (mantida por 35min). Em ambos os cromatógrafos, equipados com coluna Rtx-1ms (30m x 0,25mm x 0,25µm), injetava-se 1µL da amostra (modificado de Balbuena *et al.*, 2018). Cada composto foi identificado pelo seu espectro de massas e o índice de retenção linear (IRL). Para isso, foram consultadas as bibliotecas do *National Institute of Standards and Technologies*, *Mass Spectra Libraries* (NIST) e *PubChem*.

3.5. Análises estatísticas

Os dados de cada época foram analisados separadamente, assim como para os tempos de exposição ao fungo por 2 e 24 horas. Para a avaliação dos dados comportamentais das guardas em relação às forrageiras expostas por 2h, utilizou-se modelo linear generalizado com distribuição binomial e função de ligação *logit* para análise dos efeitos dos tratamentos na rejeição das forrageiras. Já para os dados da avaliação de 24h, os dados foram melhor ajustados aos modelos lineares, sendo estes os utilizados para análise.

Inicialmente foram considerados os efeitos de tratamentos e colônias no modelo a fim de se comparar todos os tratamentos entre si. Posteriormente, analisou-se como delineamento em fatorial 2 (companheiras e não-companheiras) x 2 (expostas e não-expostas ao fungo) e o efeito das colônias. Foram realizadas análise de variância e a razão de verossimilhança dos modelos para a escolha daquele mais adequado. Para o ajuste dos modelos foi utilizado o método do Half-Normal-Plots com pacotes de simulação (Moral *et al.*, 2017) para os modelos lineares generalizados e o teste de Shapiro-Wilk ($P = 0,05$) para os modelos lineares.

Foi utilizado One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey ($P \leq 0,05$) para comparação das médias dos tratamentos e do desdobramento da interação entre os dois fatores quando analisados segundo o fatorial 2x2. Além disso, o teste de Tukey foi usado

para comparar as médias em relação ao tempo despendido até a rejeição das forrageiras pelas guardas. Foram considerados os grupos em que ao menos 30% das forrageiras apresentadas foram rejeitadas. Todas as análises foram realizadas no software R Core Team® (v. 3.5.3).

Em relação às análises dos dados químicos, somente áreas de pico superiores a 0,1% do cromatograma foram consideradas, incluindo apenas os compostos quantificados em pelo menos 30% das amostras de cada grupo (Cappa *et al.*, 2019). Tanto para comparar as médias entre cada composto quanto para a concentração total de compostos entre os tratamentos, realizou-se o One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey. Para verificar se houve alteração no agrupamento das colônias submetidas aos tratamentos, foi realizada análise discriminante LDA com o software R Core Team® (v. 3.5.3).

4. RESULTADOS

4.1. Ensaios comportamentais

As guardas de *T. angustula* foram capazes de discriminar boa parte de suas companheiras de ninho (forrageiras) quando expostas ou não ao fungo, *B. bassiana*, independentemente do tempo de exposição ao fungo e da época do ano. Na época seca, as guardas rejeitaram 71% de suas companheiras de ninho que foram expostas ao fungo por 2h em comparação a 1,0% das não-expostas ($F=3,184$, $P=0,004$; Fig. 3A). Na época chuvosa, resultados semelhantes foram observados, com 69% e 2,0% de rejeição das expostas e não-expostas ao fungo, respectivamente ($F=2,165$; $P=0,001$; Fig. 3B). Nas situações em que as forrageiras foram expostas ao fungo por 24h na época seca, 78% das companheiras de ninho foram hostilizadas pelas guardas, contra 4,0% das não-expostas ($F=258,154$, $P<0,001$; Fig. 4A). Na época chuvosa, outras 75% das companheiras de ninho expostas ao fungo foram rejeitadas, em detrimento de 1,0% das não-expostas ($F=2,760$; $P=0,011$; Fig. 4B).

Por outro lado, quando consideramos as visitas por forrageiras não-companheiras de ninho, as guardas rejeitaram a quase totalidade destas abelhas, independentemente de terem sido expostas ou não ao fungo, *B. bassiana* e da época do ano. Na época seca, não houve diferença significativa na rejeição pelas guardas para as não-companheiras expostas ou não-expostas ao fungo por 2h, sendo ambas rejeitas com 89 e 92%, respectivamente ($F=0,520$, $P=0,472$; Fig. 3A). Na época chuvosa, o mesmo padrão foi observado, sendo hostilizadas 90 e 92%, das não-companheiras expostas ou não expostas ao fungo por 2h ($F=0,596$, $P=0,557$; Fig. 3B). Resultados semelhantes foram observados para as não-companheiras de ninho tanto na época seca quanto chuvosa para uma exposição ou não ao fungo por 24h. A rejeição na época seca foi de 95% e 93%, quando expostas ou não ao fungo ($F = 0,352$, $P=0,554$; Fig. 4A), e na época chuvosa de 91% e 98%, respectivamente ($F=1,342$; $P=0,193$; Fig. 4B).

Dessa forma, para a estação seca, houve efeito significativo de tratamento para 2h (deviance = 269,4020, g.l.=3, $P<0,0001$) quanto para 24h ($F=140,2837$, g.l.=3, $P<0,0001$), assim como para a época chuvosa, tanto para 2h (deviance = 261,891, g.l.=3, $P<0,0001$) e 24h ($F = 310,2330$, g.l.=3, $P<0,0001$). Quando analisados como fatorial duplo, houve efeito da interação dos dois fatores (origem das forrageiras e exposição ao fungo) para 2h (deviance = 37,9020, g.l. = 1, $P<0,0001$) e 24h ($F=109,5169$, g.l.=1, $P<0,0001$) na época seca; quanto para os dados de 2h (deviance = 43,055, gl=1, $P<0,0001$) e 24h ($F=115,5060$, g.l.=1, $P<0,0001$), na época chuvosa, respectivamente.

Fig. 3. Porcentagem média ($\pm$ desvio-padrão) de forrageiras companheiras e não-companheiras de ninho, expostas ou não ao fungo, *Beauveria bassiana* por 2h e rejeitadas por guardas de *Tetragonisca angustula*, nas épocas seca (A) e chuvosa (B). Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, $P < 0,05$).

Fig. 4. Porcentagem média ($\pm$ desvio-padrão) de forrageiras companheiras e não-companheiras de ninho, expostas ou não ao fungo, *Beauveria bassiana* por 24h e rejeitadas por guardas de *Tetragonisca angustula*, nas épocas seca (A) e chuvosa (B). Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, $P < 0,05$).

O tempo que as guardas de *T. angustula* levaram para rejeitar as forrageiras companheiras ou não-companheiras de ninho variou em razão do tempo de exposição ao fungo, *B. bassiana*, bem como à época do ano. Na época seca, quando as companheiras de ninho foram expostas ao fungo, estas foram rejeitadas em média com 12,6s após serem apresentadas às guardas, diferindo das não-companheiras de ninho, expostas ou não ao fungo, que foram rejeitadas mais rapidamente, em menos de 10s ($F=2,567$; $P=0,048$; Fig. 5A). Já, na época chuvosa, para mesmas 2h de exposição ao fungo, o início da agressão das guardas não diferiu entre as companheiras expostas ao fungo, bem como as não-companheiras expostas ou não ao fungo ($F=1,953$; $P=0,158$; Fig. 5B).

Para o tratamento de 24h de exposição ao fungo, os resultados para início de rejeição das forrageiras pelas guardas foram similares aos obtidos para o tratamento 2h. Na época seca, as companheiras de ninho expostas ao fungo foram rejeitadas após 11,3s, diferindo das não-companheiras expostas ou não ao fungo, com 7,6s e 8,0s, respectivamente ($F=3,641$; $P=0,038$; Fig. 6A). Na época chuvosa, não houve diferença no tempo de início da rejeição pelas guardas, tanto para as companheiras expostas ao fungo, quanto para as não-companheiras expostas ou não ao fungo, variando entre 11,5s e 12,5s ($F=1,223$; $P=0,683$; Fig. 6B).

Fig. 5. Tempo médio ($\pm$ desvio-padrão) para o início da rejeição de forrageiras companheiras ou não-companheiras de ninho, expostas ou não ao fungo, *Beauveria bassiana* por 2h, pelas guardas da abelha, *Tetragonisca angustula*, nas épocas seca (A) e chuvosa (B). Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, $P < 0,05$); *Devido ao baixo número de companheiras não-expostas rejeitadas, elas foram excluídas desta análise.

Fig. 6. Tempo médio ($\pm$ desvio-padrão) para o início da rejeição de forrageiras companheiras ou não-companheiras de ninho, expostas ou não ao fungo, *Beauveria bassiana* por 24h, pelas guardas da abelha, *Tetragonisca angustula*, nas épocas seca (A) e chuvosa (B). Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, $P < 0,05$); *Devido ao baixo número de companheiras não-expostas rejeitados, elas foram excluídas desta análise.

4.2. Hidrocarbonetos cuticulares

As forrageiras da abelha, *T. angustula* na ausência de exposição aos conídios de *B. bassiana*, apresentaram de modo significativo, uma maior quantidade de compostos químicos cuticulares em relação as forrageiras expostas ao fungo (Fig. 7). Para cada forrageira não-exposta, foi encontrado 7,9ng de hidrocarbonetos cuticulares, contra 4,5ng e 3,6ng, das forrageiras expostas ao fungo por 2h e 24h, respectivamente ($F=12,327$; $P<0,001$; Fig. 7). Por outro lado, comparado-se o perfil cuticular das forrageiras tratadas, não houve diferença na quantidade relativa em função do tempo de exposição ao fungo ($F=2,267$; $P=0,134$; Fig. 7).

Fig. 7. Média ($\pm$ desvio-padrão) da quantidade relativa de compostos cuticulares presentes nas forrageiras da abelha, *Tetragonisca angustula*, expostas ou não ao fungo, *Beauveria bassiana* por 2 e 24h, respectivamente. Letras diferentes acima das barras indicam diferença estatística significativa (One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey, $P<0,05$).

Dentre os 18 compostos químicos identificados na cutícula das forrageiras de *T. angustula* não-expostas ao fungo, dois deles – Metilhexacosano e Triaconteno – não foram detectados nas forrageiras expostas ao fungo, *B. bassiana*, por 2h ou 24h (Tabela 1). Outros dois compostos – X-Metiloctacosano e 1-Tritriaconteno – também estavam ausentes nas forrageiras expostas ao fungo por 2h. Ademais, cinco outros compostos – Hentriacontano, X,Y-Dimetilhentriacontano, Tritriacontano, X,Y-Dimetiltritriacontano e X-Metiltritriacontano – foram encontrados em quantidades significativamente menores na cutícula daquelas forrageiras expostas ao fungo por 2h e 24h, em comparação às não-expostas.

Em suma, a ausência e a menor quantidade de muito destes compostos químicos cuticulares nas forrageiras, expostas ao fungo por 2h ou 24h, refletiram numa menor concentração total de hidrocarbonetos cuticulares nestes indivíduos, em relação às não-expostas ao fungo (Tabela 1).

Tabela 1. Quantidade de hidrocarbonetos cuticulares (média ± desvio-padrão) nos corpos de forrageiras de *Tetragonisca angustula*, expostas ou não ao fungo *Beauveria bassiana* por 2 e 24h.

Compostos	Tempo de retenção (min)	Forrageiras				F	P ^a
		Não-expostas (ng/μL)	Expostas 2h (ng/μL)	Expostas 24h (ng/μL)			
A Hexacosano (C26)	30,174	0,362 ± 0,076	0,293 ± 0,036	0,198 ± 0,054	2,082	0,147	
B Metilhexacosano	33,346	0,107 ± 0,047	n.d. ^b	n.d.			
C 1-Octacoseno	34,816	0,598 ± 0,147	0,303 ± 0,052	0,497 ± 0,149	1,442	0,263	
D Octacosano (C28)	35,023	0,446 ± 0,063	0,272 ± 0,050	0,227 ± 0,049	3,632	0,058	
E X-Metiloctacosano	36,882	0,086 ± 0,196	n.d.	0,054 ± 0,161	1,488	0,262	
F Nonacosano (C29)	39,548	0,205 ± 0,038 ^a	0,172 ± 0,026 ^{ab}	0,090 ± 0,020 ^b	4,441	0,022	
G Triacoteno	40,170	0,089 ± 0,023	n.d.	n.d.			
H Triacotano (C30)	40,925	0,127 ± 0,018 ^a	0,102 ± 0,015 ^{ab}	0,052 ± 0,011 ^b	7,410	0,004	
I Hentriacotano (C31)	43,238	0,377 ± 0,102 ^a	0,176 ± 0,029 ^b	0,106 ± 0,039 ^b	6,085	0,010	
J X,Y-Dimetilhentriacotano	43,808	0,229 ± 0,050 ^a	0,089 ± 0,012 ^b	0,054 ± 0,014 ^b	7,045	0,009	
K Dotriaconteno	46,638	0,276 ± 0,047	0,457 ± 0,093	0,265 ± 0,072	1,995	0,161	
L 1-Dotriaconteno	46,842	0,148 ± 0,032 ^{ab}	0,216 ± 0,029 ^a	0,090 ± 0,026 ^b	5,055	0,024	
M Dotriacontano (C32)	47,160	0,291 ± 0,053	0,263 ± 0,030	0,224 ± 0,056	0,474	0,629	
N Tritriaconteno	47,375	1,067 ± 0,235 ^a	0,786 ± 0,148 ^{ab}	0,441 ± 0,110 ^b	4,025	0,030	
O 1-Tritriaconteno	47,677	0,478 ± 0,164	n.d.	0,271 ± 0,086	1,343	0,267	
P Tritriacontano (C33)	47,934	1,727 ± 0,417 ^a	0,619 ± 0,084 ^b	0,544 ± 0,161 ^b	7,389	0,003	
Q X,Y-Dimetiltritriacontano	48,146	0,170 ± 0,030 ^a	0,078 ± 0,009 ^b	0,072 ± 0,017 ^b	6,299	0,007	
R X-Metiltritriacontano	48,406	0,519 ± 0,084 ^a	0,242 ± 0,041 ^b	0,259 ± 0,063 ^b	5,665	0,009	
Concentração total (ng/μL)		7,262 ± 1,822 ^a	4,068 ± 0,679 ^b	3,444 ± 1,088 ^b	12,327	<0,001	

^a Indica diferença estatística pelo One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey (*P*<0,05, em negrito)
^b n.d.: não detectado

A análise discriminante, por sua vez, revelou três grupos distintos de forrageiras, sendo a mais distante delas, o grupo das expostas ao fungo por 2h (Fig. 8). O Metilhexacosano (*representado pela letra 'B' na figura*) foi o composto que mais acentuou a diferenciação das forrageiras expostas ao fungo por 2h, em relação às demais. Contudo, esse composto esteve ausente em ambos os grupos-tratamento (Tabela 1), e não teria sido o único a acarretar essa diferenciação do tratamento de 2h.

Fig. 8. Análise discriminante linear (LDA) dos perfis de hidrocarbonetos cuticulares dos grupos de forrageiras da abelha, *Tetragonisca angustula*, não-expostas e expostas ao fungo, *Beauveria bassiana* por 2 e 24h. Letras de A a R representam os compostos apresentados na Tabela 1.

5. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, demonstrou-se que o fungo entomopatogênico *B. bassiana* altera o reconhecimento das companheiras de ninho pelas guardas de *T. angustula*. Como esperado, as guardas na entrada do ninho distinguiram eficientemente companheiras de não-companheiras de ninho. Para ambos tratamentos (2 e 24h de exposição ao fungo), a rejeição dos indivíduos não-expostos pertencentes à mesma colônia foi inferior a 10%, isto é, a aceitação de companheiros saudáveis ocorreu como esperado.

Por outro lado, a rejeição às não-companheiras não-expostas ao fungo foi, em média, superior a 90%, corroborando com o que já se sabe sobre a eficiência de reconhecimento de companheiras de ninho em *T. angustula* (Kärcher & Ratnieks, 2009; Jones *et al.*, 2012). As guardas que permanecem paradas sobre a entrada dos ninhos são as responsáveis pelo reconhecimento intraespecífico rejeitando cerca de 90% das não-companheiras e, no máximo, 1% das companheiras de ninho (Kärcher & Ratnieks, 2009), resultados muito similares ao deste estudo. Ademais, é descartada a hipótese de que a precisão do reconhecimento de companheiras em *T. angustula* seja baseada no cerume que forma os tubos de entrada dos ninhos, que serviria como fonte de odor (Jones *et al.*, 2012).

As taxas de erros de reconhecimento para *T. angustula* são relativamente baixas quando comparadas à *A. mellifera* (Downs & Ratnieks, 2000) ou *Trigona fulviventris* (Buchwald & Breed, 2005). Estudos de reconhecimento em contextos naturais são importantes visto que remover os guardas de seus locais de origem pode implicar diretamente em sua agressividade. Em geral, a agressividade diminui, aumentando a aceitação, porque atacar um indivíduo hostil é custoso e, se não há nada a ser protegido, há um gasto energético pelo qual não vale a pena o dispêndio (Couvillon *et al.*, 2013).

Sob esta mesma visão, também podem ser justificados os resultados encontrados quanto às diferenças entre as épocas de bioensaios. Apesar da porcentagem de ataques ter sido semelhante – companheiras expostas ao fungo sendo mais rejeitadas que as companheiras não-expostas, porém menos rejeitadas que as não-companheiras – para as duas épocas avaliadas, o tempo para início deste comportamento diferiu. Na época seca, os ataques referentes à rejeição das forrageiras apresentadas foram relativamente mais rápidos quando comparados aos da época chuvosa.

A velocidade na resposta defensiva pode estar diretamente relacionada com o custo da defesa que, por sua vez, é influenciada por diversas variáveis como os fatores

climáticos, por exemplo (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 1998). A defesa colonial é primordial para sua sobrevivência, uma vez que seu ninho contém recursos atrativos para organismos oportunistas, como prole e alimento (Breed *et al.*, 2004). Considerando que a época seca ocorre maior escassez alimentar em relação a épocas mais quentes e úmidas, as guardas devem discriminar suas companheiras de ninho das não-companheira mais rapidamente, afim de proteger os recursos alimentares estocados no ninho de eventuais saques.

Por outro lado, em uma época na qual se tem a situação contrária, isto é, com abundância de recursos, é possível que haja maior permissividade por parte das guardas. Apesar deste estudo ter somente detectado diferenças no tempo de reação entre as épocas, este pode ser um indicativo de que na época chuvosa, as guardas tendem a um comportamento menos hostil, explicado no fato de que com maior disponibilidade de recursos alimentares no ambiente, há menor alocação energética para o comportamento defensivo. Esta situação foi observada em e *A. mellifera*, em que forrageiras não-companheiras foram mais aceitas quando havia aumento na disponibilidade de néctar (Downs & Ratnieks, 2000).

Isso acontece porque com o aumento da temperatura ambiente há maior produção primária vegetal refletindo favoravelmente sobre as respostas funcionais da comunidade biótica (Humphries *et al.*, 2017). Estabelece-se assim uma relação entre a disponibilidade de recursos e a defesa, o que poderia explicar as diferenças encontradas nos resultados quanto ao tempo para início do comportamento defensivo nos períodos dos bioensaios. Soma-se a isto, o fato de que a defesa observada na maioria dos insetos sociais tropicais é uma adaptação em resposta à abundância de recursos alimentares (Schneider *et al.*, 2004).

Apesar de haver semelhança na agressão média das forrageiras apresentadas às guardas, principalmente não-companheiras de ninhos, o início da rejeição da época seca (abril – julho) foi em média mais rápido que quando comparada à chuvosa (dezembro – fevereiro), sendo 9,6 e de 11,6s, respectivamente. Deste modo, e considerando que há maior abundância de alimentos em épocas quentes e úmidas quando comparadas aquelas mais frias e secas, esse pode ter sido o fator de influência nos resultados. Com maior disponibilidade de recursos tróficos nos meses de dezembro a fevereiro, a rejeição de indivíduos torna-se menos custosa às guardas quando comparado com o gasto energético para os meses de abril a julho.

Durante o reconhecimento das companheiras de ninho, a antenação foi a primeira interação a ocorrer entre guardas e forrageiras. Após este primeiro contato, as

companheiras expostas ao fungo eram rejeitadas tal como visto para com as não-companheiras, sendo mordidas, empurradas e arrastadas para longe da entrada do ninho. Entende-se assim que as forrageiras de *T. angustula* eram reconhecidas como uma ameaça para a colônia, seja por questões da exposição ao fungo ou pela possibilidade de saque de recursos alimentares no ninho. Este resultado difere do encontrado para *A. mellifera*, em que as operárias expostas a *B. bassiana* não foram reconhecidas pelas guardas e com facilidade adentravam livremente nos ninhos (Cappa *et al.*, 2019).

A diferença comportamental entre as duas espécies de abelhas pode ser devida à origem independente das formas de defesa colonial (Cardinal & Danforth, 2011). Em *A. mellifera*, a atividade de guarda é definida pela idade das operárias (Breed & Rogers, 1991). Embora para abelhas sem ferrão esse polietismo etário também seja o padrão, em *T. angustula*, as guardas constituem uma subcasta morfológicamente distinta, 30% mais pesadas e com diferentes proporções nas medidas morfométrica, quando comparadas às forrageiras (Grüter *et al.*, 2012).

Essa diferenciação morfológica de subcastas com distintas funções nas colônias de abelhas sem ferrão também ocorrem *T. fiebrigi* (Schwarz) (Grüter *et al.*, 2017). Essas diferenças são de alto valor para os repertórios comportamentais, uma vez que ocorrem adaptações que permitem desempenho mais eficaz da função (Grüter *et al.*, 2012, 2017). Como as guardas em *Tetragonisca* são relativamente maiores que as demais operárias, suas antenas são também maiores e contêm maior número de sensilas (Grüter *et al.*, 2017), com diversas especializações como, por exemplo, quimiorrecepção (Euzébio *et al.*, 2013). De modo geral, a variedade de sensilas é bastante diferente entre as espécies de abelhas sem ferrão, que podem possuir desde sete até treze tipos (Ravaiano *et al.*, 2014). Para *T. angustula* há onze tipos de sensilas nos flagelômeros antenais (Dohanik *et al.*, 2016) e, dentre estas, tem-se a sensila basicônica (Fialho *et al.*, 2014), especialmente sensível aos hidrocarbonetos cuticulares (Hashimoto, 1990). É possível então que subcastas morfológicamente distintas, como são as guardas em *T. angustula*, sejam melhores em reconhecer invasores intraespecíficos do que aquelas temporalmente definidos, como em *A. mellifera* e na maioria dos gêneros de abelhas sem ferrão.

Diante desse eficaz sistema de reconhecimento, em campo observou-se que as guarda detectaram a alteração no perfil químico das companheiras de ninho expostas ao fungo. Para que possam penetrar no interior da cutícula de seus hospedeiros, os fungos entomopatogênicos quebram os hidrocarbonetos e os utilizam para obtenção de energia (Clarkson & Charnley, 1996; Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013).

Os nossos resultados mostram uma redução tanto na quantidade total quanto em valores individuais de diversos dos compostos cuticulares, ou seja, cutículas expostas ao fungo apresentam menos hidrocarbonetos do que aquelas não-expostas. Neste estudo, foram identificados dezoito hidrocarbonetos cuticulares nas forrageiras sem exposição ao fungo, enquanto Balbuena *et al.* (2018) encontraram dezenove picos de hidrocarbonetos cuticulares em forrageiras de *T. angustula*, com comprimentos de cadeia variando de 23 (n-tricosano) a 31 (n-hentriacontano) átomos de carbono. Apesar da similaridade entre alguns compostos encontrados nos dois estudos, neste, o menor hidrocarboneto linear foi o n-hexacosano (C26) e o de maior cadeia foi o n-tritriacontano (C33). Tal variação já era esperada, visto que as duas avaliações foram conduzidas com populações distintas. Além da contribuição genética, a dieta, a disponibilidade de recursos alimentares e as características abióticas do meio ambiente afetam diretamente o perfil cuticular dos indivíduos (Buczowski *et al.*, 2005; Menzel *et al.*, 2017).

Apesar de alguns hidrocarbonetos cuticulares não estarem relacionados ao reconhecimento de parentesco, a falta de um único composto é suficiente para acarretar comportamentos agressivos (Châline *et al.*, 2005). Em nosso experimento, quatro hidrocarbonetos não foram detectados nas forrageiras expostas ao fungo por 2h e outros quatro foram encontrados em quantidades significativamente baixas. Já para a cutícula das forrageiras após 24h de exposição ao fungo, foram 11 hidrocarbonetos que apresentaram diferenças estatísticas significativas, sendo que destes, dois não apareceram nas amostras. Apesar da ausência de diferenças no comportamento das guardas quanto à agressividade e ao tempo de exposição ao fungo, há uma evidente diferença nos perfis químicos cuticulares das forrageiras. Isso porque *B. bassiana* é capaz de degradar uma variedade de estruturas de hidrocarbonetos e de convertê-los em diferentes lipídios fúngicos para produção de energia (Napolitano & Juarez, 1997). Por exemplo, 24h após a exposição à *B. bassiana*, a cutícula de larvas do coleóptero *Melolontha melolontha* (L.) apresentou redução de quase 60% dos hidrocarbonetos (Lecuona *et al.*, 1991).

Dentre os alcanos lineares comumente encontrados na cutícula de quase todos os insetos, geralmente estes estão na faixa de comprimento de cadeia 21 a 35 átomos de carbono (Gibbs *et al.*, 1991). Há uma prevalência acentuada de cadeias de número ímpar (Baker *et al.*, 1978) e *B. bassiana* é capaz de crescer na maioria desses alcanos, usando-os como fonte de carbono (Napolitano & Juarez, 1997). Apesar dos sete alcanos lineares encontrados em nosso estudo, a degradação causada pelo fungo não se limitou somente a esse tipo de hidrocarboneto. Além da expressiva redução na quantidade de alcanos,

metilados ou não, os alcenos também foram afetados. Tanto o triaconteno (C30:1) quanto o dotriaconteno (C32:1) e o tritriaconteno (C33:1) foram alcenos que apresentaram diferenças quantitativas. A diminuição nos valores destes hidrocarbonetos insaturados nas abelhas é interessante, visto que eles desempenham um papel crucial no reconhecimento de companheiras de ninho (Châline *et al.*, 2005; Kather & Martin, 2015).

Essa mesma situação ocorreu em *A. mellifera*, na qual seis alcenos de operárias expostas à *B. bassiana* foram encontrados em quantidades significativamente menores quando comparadas às operárias não-infectadas, interferindo assim no reconhecimento de parentesco pelas guardas (Cappa *et al.*, 2019). Presentes na cutícula dos insetos os compostos antimicrobianos e os próprios hidrocarbonetos de cadeia longa são importantes na defesa contra patógenos (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013). Além disso, a ativação do sistema imunológico devido à exposição fúngica pode acarretar na alteração do perfil cuticular (Richard *et al.*, 2012), para dificultar a degradação pelos microrganismos, podendo inibir diretamente o crescimento de bactérias e fungos (Baracchi *et al.*, 2012).

Nesse aspecto, nossos resultados indicam significativas diferenças nas quantidades de hidrocarbonetos encontradas após as infecções por 2 e 24 horas (Tabela 1). A hemolinfa de operárias de *A. mellifera*, com tamanho corporal de cerca de 12mm, foi atingida por *B. bassiana* em apenas três dias (Cappa *et al.*, 2019). É possível que para *T. angustula*, medindo cerca de 4mm, 24 horas sejam suficientes para desencadear uma resposta imune e modificação na composição cuticular. Tais respostas fisiológicas são substancialmente importantes, visto que com o desencadear de alterações na sinalização química ocorre mudanças comportamentais associadas à imunidade social (Richard *et al.*, 2012), como as altas taxas de rejeição às companheiras de ninho infectadas por fungo observadas neste estudo.

Portanto, este estudo demonstra que avaliações adicionais sobre os impactos de fungos entomopatogênicos sobre organismos não-alvo, como as abelhas sem ferrão, são necessários. Em países tropicais, como o Brasil, é primordial avaliar as respostas desses organismos em campo, visto sua importância ecológica e econômica como polinizadores.

6. CONCLUSÕES

- A presença do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* na cutícula de forrageiras de *Tetragonisca angustula* reduz a capacidade de reconhecimento das guardas para suas companheiras de ninho;
- A semelhança nas taxas de rejeição de companheiras de ninho, expostas ao fungo *B. bassiana*, independentemente da época do ano (seca ou chuvosa), indica que as variações climáticas não exercem influência sobre os padrões de reconhecimento;
- A ausência e a menor quantidade de hidrocarbonetos cuticulares nas forrageiras, expostas ao fungo *B. bassiana*, por 2 ou 24 horas, em comparação às não-expostas, podem estar associadas a uma alteração desses compostos, e consequentemente, afetar a capacidade de reconhecimento dos indivíduos contaminados pelas guardas de *T. angustula*.

REFERÊNCIAS

- Abdalla, F. C.; Jones, G. R.; Morgan, E. D. & Cruz-Landim, C., (2003). Comparative study of the cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. **Genetics and Molecular Research**, 2(2): 191-199.
- Al Toufailya, H.; Alves, D. A.; Bento, J. M. S.; Marchini, L. C. & Ratnieks, F. L. W. (2016). Hygienic behaviour in Brazilian stingless bees. **Biology Open**, 5(11): 1712-1718.
- Alaux, C.; Masonnasse, A. & Le Conte, Y. (2010). Pheromones in a superorganism: from gene to social regulation. **Vitamins and Hormones Pheromones**, 83: 401-423.
- Alves, S. B. (1998). **Controle Microbiano De Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ.
- Aoki, S. (1980). Life cycles of two *Colophina* aphids (Homoptera, Pemphigidae) producing soldiers. **Kontyû**, 48: 464-476.
- Arathi, H. S.; Burns, I. & Spivak, M. (2000). Ethology of hygienic behaviour in the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): Behavioural repertoire of Hygienic bees. **Ethology**, 106(4): 365-379.
- Arnold, G.; Quenet, B. & Masson, C. (2000). Influence of social environment on genetically based subfamily signature in the honeybee. **Journal of Chemical Ecology**, 26: 2321-2333.
- Ascher, J. S. & Pickering, J. (2020). **Discover life: bee species guide and world checklist**. <https://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species> Acessado 12 Abril, 2020.
- Baker, J. E.; Sukkestad, D. R.; Woo, S. M. & Nelson, D. R. (1978). Cuticular hydrocarbons of *Tribolium castaneum*: Effects of the food additive tricalcium phosphate. **Insect Biochemistry**, 8(3): 159-167.
- Balbuena, M. S.; González, A. & Farina, W. M. (2018). Characterization of cuticular hydrocarbons according to colony duties in the stingless bee *Tetragonisca angustula*. **Apidologie**, 49: 185-195.
- Baracchi, D.; Fadda, A. & Turillazzi, S. (2012). Evidence for antiseptic behaviour towards sick adult bees in honey bee colonies. **Journal of Insect Physiology**, 58(12): 1589-1596.
- Barrett, C. B. (2010). Measuring Food Insecurity. **Science**, 327(5967): 825-828.
- Beekman, M. & Ratnieks, F. L. W. (2003). Power over reproduction in social Hymenoptera. **Philosophical Transactions: Biological Sciences**, 358(1438): 1741-1753.
- Bierdemann, P. H. W. (2014). Evolution of cooperation in Ambrosia beetles. **Mitt. der Dtsch. Ges. für Allg. und Angew. Ent.**, 19: 191-202.
- Blackweel, M. (2010). Fungal evolution and taxonomy. **Biocontrol, Dordrecht**, 55: 7-16.
- Blomquist, G. J. & Bagnères, A. G. (2010). **Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology**. New York : Cambridge University Press.
- Blomquist, G. J. (2010). Structure and analysis of insect hydrocarbons. In: Blomquist, G. J. & Bagnères, A. G. **Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology**. New York: Cambridge University Press.

- Breed, M. D. & Rogers, K. B. (1991). The behavioral genetics of colony defense in honeybees: Genetic variability for guarding behavior. **Behavior Genetics**, 21(3): 295-303.
- Breed, M. D. (1983). Nestmate in honey bees. **Animal Behaviour**, 31: 86-91.
- Breed, M. D.; Guzmán-Novoa, E. & Hunt, G. J. (2004). Defensive behavior of honey bees: Organization, genetics, and comparisons with other bees. **Annual Review of Entomology**, 49(1): 271-298.
- Breed, M. D.; Leger, E. A.; Pearce, A. N. & Wang, Y. J. (1998). Comb wax effects on the ontogeny of honey bee nestmate recognition. **Animal Behaviour**, 55(1): 13-20.
- Breed, M. D.; Perry, S. & Bjostad, L. B. (2004). Testing the blank slate hypothesis: why honey bee colonies accept young bees? **Insectes Sociaux**, 51: 12-16.
- Brittain, C. & Potts, S.G. (2011). The potential impacts of insecticides on the lifehistory traits of bees and the consequences for pollination. **Basic and Applied Ecology**, 12(4): 321-331.
- Buchwald, R. & Breed, M. D. (2005). Nestmate recognition cues in a stingless bee, *Trigona fulviventris*. **Animal Behaviour**, 70(6): 1331-1337.
- Buczkowski, G.; Kumar, R.; Suib, S. L. & Silverman, J. (2005). Diet-related modification of cuticular hydrocarbon profiles of the argentine ant, *Linepithema humile*, diminishes intercolony aggression. **Journal of Chemical Ecology**, 31(4): 829-843.
- Cappa, F.; Petrocelli, I.; Dani, F. R.; Dapporto, L.; Giovannini, M.; Silva-Castellari, J.; Turillazzi, S. & Cervo, R. (2019). Natural biocide disrupts nestmate recognition in honeybees. **Scientific Reports**, 9: 3171.
- Cardinal, S. & Danforth, B. N. (2011). The antiquity and evolutionary history of social behavior in bees. **PLoS ONE**, 6(6): e21086
- Châline, N.; Sandoz, J.; Martin, S. J.; Ratnieks, F. L. W. & Jones, G. R. (2005). Learning and discrimination of individual cuticular hydrocarbons by honeybees (*Apis mellifera*). **Chemical Senses**, 30(4): 327-335.
- Challa, G. K.; Firake, D. M. & Behere, G. T. (2019). Bio-pesticide applications may impair the pollination services and survival of foragers of honey bee, *Apis cerana* Fabricius in oilseed brassica. **Environmental Pollution**, 249: 598-609.
- Clarkson, J. M. & Charnley, A. K. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**, 4(5): 197-203.
- Couvillon, M. J.; Segers, F. H. I. D.; Cooper-Bowman, R.; Truslove, G.; Nascimento, D. L.; Nascimento, F. S. & Ratnieks, F. L. W. (2013). Context affects nestmate recognition errors in honey bees and stingless bees. **Journal of Experimental Biology**, 216(16): 3055-3061.
- Cremer, S.; Pull, C. D. & Fürst, M. A. (2018). Social immunity: Emergence and evolution of colony-level disease protection. **Annual Review of Entomology**, 63(1): 105-123.
- Crenna, E.; Jolliet, O.; Collina, E.; Sala, S. & Fantke, P. (2020). Characterizing honey bee exposure and effects from pesticides for chemical prioritization and life cycle assessment. **Environment International**, 138: 105642.

- Crespi, B. J. (1992). Eusociality in Australian gall thrips. **Nature**, 359: 724-726.
- Csata, E.; Timus, N.; Witek, M.; Casacci, L. P.; Lucas, C.; Bagnères, A.; Sztencel-Jabtonka, A.; Barbero, F.; Bonelli, S.; Rákósy, L. & Markó, B. (2017). Lock-picks: fungal infection facilitates the intrusion of strangers into ant colonies. **Scientific Reports**, 7(1): 46323.
- Danforth, B. N.; Cardinal, S.; Praz, C.; Almeida, E. A. B. & Michez, D. (2013). The impact of molecular data on our understanding of bee phylogeny and evolution. **Annual Review of Entomology**, 58: 57-78.
- Dani, F. R.; Jones, G. R.; Corsi, S.; Beard, R.; Pradella, D. & Turillazzi, S. (2005). Nestmate recognition cues in the honey bee: Differential importance of cuticular alkanes and alkenes. **Chemical Senses**, 30(6): 477-489.
- DeGrandi-Hoffman, G.; Collins, A.; Martin, J. H.; Schmidt, J. O. & Spangler, H. G. (1998). Nest defense behavior in colonies from crosses between Africanized and European honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Insect Behavior**, 11(1): 37-45.
- Dohanik, V. T.; Souza, E. A.; Lisboa, L. C. O.; Zanuncio, J. C. & Serrão, J. E. (2016). Development of antennal sensilla of *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Meliponini) during pupation. **Brazilian Journal of Biology**, 77(2): 284-288.
- Downs, S. G. & Ratnieks, F. L. W. (2000). Adaptive shifts in honey bee (*Apis mellifera* L.) guarding behavior support predictions of the acceptance threshold model. **Behavioral Ecology**, 11(3): 326-333.
- Euzébio, D.; Martins, G. & Fernandes-Salomão, T. (2013). Morphological and morphometric studies of the antennal sensilla from two populations of *Atta robusta* (Borgmeier 1939) (Hymenoptera: Formicidae). **Brazilian Journal of Biology**, 73(3): 663-668.
- Faria, M. R. & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, 43(3), 237–256.
- Fairbrother, A.; Purdy, J.; Anderson, T. & Fell, R. (2014). Risks of neonicotinoid insecticides to honey bees. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 33(4): 719-731.
- Ferreira-Calliman, M. J.; Zucchi, R. & Nascimento, F. (2012). Cuticular hydrocarbons discriminate distinct colonies of *Melipona marginata* (Hymenoptera, Apinae, Meliponini)., **Sociobiology** 59(3): 783-793.
- Fialho, M. C. Q.; Guss-Matiello, C. P.; Zanuncio, J. C.; Campos, L. A. O. & Serrão, J. E. (2014). A comparative study of the antennal sensilla in corbiculate bees. **Journal of Apicultural Research**, 53(3): 392-403
- Fischer, J.; Müller, T.; Spatz, A.-K.; Greggers, U.; Grünewald, B. & Menzel, R. (2014). Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. **PLoS ONE**, 9(3): e91364.
- Gallai, N.; Salles, J.M.; Settele, J. & Vaissière, B. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, 68: 810-821.
- Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: A review. **Bee World**, 60(2): 59-84.

- Gibbs, A. G. (1998). The role of lipid physical properties in lipid barriers. **American Zoologist**, 38(2): 268-279.
- Gibbs, A.; Mousseau, T. A. & Crowe, J. H. (1991). Genetic and acclimatory variation in biophysical properties of insect cuticle lipids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 88(16): 7257-7260.
- Gołębiowski, M.; Maliński, E.; Boguś, M. I.; Kumirska, J. & Stepnowski, P. (2008). The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 38(6): 619-627.
- Goulson, D.; Stout, J. C.; Langley, J. & Hughes, W. O. H. (2000). The identity and function of scent marks deposited by foraging bumblebees. **Journal of Chemical Ecology**, 26: 2897-2911.
- Grüter, C.; Menezes, C.; Imperatriz-Fonseca, V. L. & Ratnieks, F. L. W. (2012). A morphologically specialized soldier caste improves colony defense in a neotropical eusocial bee. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 109(4): 1182-1186.
- Grüter, C.; Segers, F. H. I. D.; Santos, L. L. G.; Hammel, B.; Zimmermann, U. & Nascimento, F. S. (2017). Enemy recognition is linked to soldier size in a polymorphic stingless bee. **Biology Letters**, 13(10): 20170511.
- Halcroft, M.; Spooner-Hart, R. & Neumann, P. (2010). Behavioral defense strategies of the stingless bee, *Austroplebeia australis*, against the small hive beetle, *Aethina tumida*. **Insectes Sociaux**, 58(2): 245-253.
- Hammel, B.; Vollet-Neto, A.; Menezes, C.; Nascimento, F. S.; Engels, W. & Grüter, C. soldiers in a stingless bee: work rate and task repertoire suggest they are an elite force. (2016). **American Naturalist**, 187(1): 120-129.
- Hashimoto, Y. (1990). Unique features of sensilla on the antennae of Formicidae (Hymenoptera). **Applied Entomology and Zoology**, 25(4): 491-501.
- Hesketh, H.; Roy, H. E.; Eilenberg, J.; Pell, J. K. & Hails, R. S. (2010). Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populations of insects. **BioControl**, 55: 55-73.
- Hölldobler, B. & Wilson, E. O. (1990). **The Ants**. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge.
- Huber, F. (1988). Insect communication, intraspecific. In: Wolfe, J. M. **Sensory Systems: II: Senses Other than Vision. Readings from the Encyclopedia of neuroscience**, Basel: Birkhäuser: 34-35.
- Humber, R. A. (2012). Identificação de fungos entomopatogênicos. In: Lacey, L. A. **Manual de Técnicas em Patologia de Invertebrados**. Londres: Academic Press. 151-187.
- Humphries, M. M.; Studd, E. K.; Menzies, A. K. & Boutin, S. (2017). To everything there is a season: Summer-to-Winter food webs and the functional traits of keystone species. **Integrative and Comparative Biology**, 57(5): 961-976.

- Imperatriz-Fonseca, V. L.; Kleinert-Giovannini, A.; Cortopassi-Laurino, M. & Ramalho, M. (1984). Hábitos de coleta de *Tetragonisca angustula angustula* Latreille. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Boletim Zoológico de São Paulo**, 8(8): 115-131.
- Jayne, T. S.; Snapp, S.; Place, F. & Sitko, N. (2019). Sustainable agricultural intensification in an era of rural transformation in Africa. **Global Food Security**, 20: 105-113.
- Jones, S. M.; van Zweden, J. S.; Grüter, C.; Menezes, C.; Alves, D. A.; Nunes-Silva, P.; ... & Ratnieks, F. L. W. (2012). The role of wax and resin in the nestmate recognition system of a stingless bee, *Tetragonisca angustula*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 66(1): 1-12.
- Jungnickel, H.; Costa, A.; Tentschert, J.; Patricio, E. F. L. R. A.; Imperatriz-Fonseca, V. L.; Drijfhout, F. & Morgan, E. D. (2004). Chemical basis for inter-colonial aggression in the stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Insect Physiology**, 50(8): 761-766.
- Kärcher, M. H. & Ratnieks, F. L. W. (2009). Standing and hovering guards of the stingless bee *Tetragonisca angustula* complement each other in entrance guarding and intruder recognition. **Journal of Apicultural Research**, 48(3): 209-214.
- Kather, R. & Martin, S. J. (2015). Evolution of cuticular hydrocarbons in the Hymenoptera: A meta-analysis. **Journal of Chemical Ecology**, 41(10): 871-883.
- Kather, R.; Drijfhout, F. P. & Martin, S. J. (2011). Task group differences in cuticular lipids in the honey bee *Apis mellifera*. **Journal of Chemical Ecology**, 37(2): 205-212.
- Kevan, P.; Al-mazra'awi, M.; Sutton, J.; Tam, L.; Boland, G.; Broadbent, B.; Thomson, S. & Brewer, G. (2003). Using pollinators to deliver biological control agents against crop pests. In: Downer, R.; Mueninghoff, J. & Volgas, G. **Pesticide Formulations and Delivery Systems: Meeting the Challenges of the Current Crop Protection Industry**: 148-153.
- Koedam, D.; Aponte, O. I. C. & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2007). Egg laying and oophagy by reproductive workers in the polygynous stingless bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Meliponini). **Apidologie**, 38(1): 55-66.
- Koeniger, G.; Koeniger, N.; Pechhackerm H.; Ruttner, F. & Berg, S. (1989). Assortative mating in a mixed population of European honeybees, *Apis mellifera ligustica* and *Apis mellifera carnica*. **Apidologie**, 20: 413-418.
- Konrad, M.; Vyleta, M. L.; Theis, F. J.; Stock, M.; Tragust, S.; Klatt, M.; ... & Cremer, S. (2012). Social transfer of pathogenic fungus promotes active immunisation in ant colonies. **PLoS Biology**, 10(4): e1001300.
- Le Conte, Y. L. & Hefetz, A. (2008). Primer pheromones in social Hymenoptera. **Annual Review of Entomology**, 53(1): 523-542.
- Lecuona, R.; Riba, G.; Cassier, P. & Clement, J. L. (1991). Alterations of insect epicuticular hydrocarbons during infection with *Beauveria bassiana* or *B. brongniartii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 58(1): 10-18.
- Leonhardt, S. D.; Menzel, F.; Nehring, V. & Schmitt, T. (2016). Ecology and evolution of communication in social insects. **Cell**, 164(6): 1277-1287.

- Liu, L.; Zhao, X.-Y.; Tang, Q.-B.; Lei, C.-L. & Huang, Q.-Y. (2019). The mechanisms of social immunity against fungal infections in eusocial insects. **Toxins**, 11(5): 244.
- MacLeod, A.; Pautasso, M.; Jeger, M. J. & Haines-Young, R. (2010). Evolution of the international regulation of plant pests and challenges for future plant health. **Food Security**, 2(1): 49-70.
- Marcucci, M. C. (1995). Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, 26(2): 83-99.
- Martin, S. & Drijfhout, F. (2009). A review of ant cuticular hydrocarbons. **Journal of Chemical Ecology**, 35(10): 1151-1161.
- Mascarin, G. M.; Lopes, R. B.; Delalibera, I., Jr.; Fernandes, E. K. K.; Luz, C. & Faria, M. (2019). Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, 165: 46-53.
- Medina, L. A. M. & Ratnieks, F. L. W. (2014). Waste management in the stingless bee *Melipona beecheii* Bennett (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, 61(4): 435-440.
- Meikle, W. G.; Mercadier, G.; Holst, N. & Girod, V. (2008). Impact of two treatments of a formulation of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) conidia on *Varroa* mites (Acari: Varroidae) and on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health. **Experimental and Applied Acarology**, 46(1-4): 105-117.
- Menzel, F.; Schmitt, T. & Blaimer, B. B. (2017). The evolution of a complex trait: cuticular hydrocarbons in ants evolve independent from phylogenetic constraints. **Journal of Evolutionary Biology**, 30(7): 1372-1385.
- Michener, C. D. (1974). **The social behavior of the bees: a comparative study**. Massachusetts: Belknap Press of Harvard University Press.-.
- Michener, C. D. (2007). **The Bees of The World**. (Second.) Baltimore: The John Hopkins University Press.
- Migdał, P.; Roman, A.; Popiela-Pleban, E.; Kowalska-Górska, M. & Opaliński, S. (2018). The impact of selected pesticides on honey bees. **Polish Journal of Environmental Studies**, 27(2): 787-792.
- Moral, R. A.; Hinde, J. & Demétrio, C. G. B. (2017). Half-Normal plots and overdispersed models in R: The hnp package. **Journal of Statistical Software**, 81(10): 1-23.
- Moser, J. C.; Brownlee, R. C. & Silverstein, R. (1968). Alarm pheromones of the ant *Atta texana*. **Journal of Insect Physiology**, 14: 529-535.
- Napolitano, R. & Juárez, M. P. (1997). Entomopathogenous fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 344(1): 208-214.
- Nascimento, D. & Nascimento, F. (2012). Acceptance threshold hypothesis is supported by chemical similarity of cuticular hydrocarbons in a stingless bee, *Melipona asilvai*. **Journal of Chemical Ecology**, 38(11): 1432-1440.
- Nogueira-Neto, P. (1997). **Vida e Criação de Abelhas sem Ferrão**. Editora Nogueirapis. São Paulo, SP. 445 P.

- Noonan, K. C. (1986). Recognition of queen larvae by worker honey bees (*Apis mellifera*). **Ethology**, 73: 295–306.
- Novak, S. & Cremer, S. (2015). Fungal disease dynamics in insect societies: Optimal killing rates and the ambivalent effect of high social interaction rates. **Journal of Theoretical Biology**, 372: 54-64.
- Nunes, T. M.; Turatti, I. C. C.; Mateus, S.; Nascimento, F. S.; Lopes, N. P. & Zucchi, R. (2009). Cuticular hydrocarbons in the stingless bee *Schwarziana quadripunctata* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): differences between colonies, castes and age. **Genetics and Molecular Research**, 8(2): 589-595.
- Nunes, T. M.; von Zuben, L. G.; Costa, L. & Venturieri, G. C. (2014). Defensive repertoire of the stingless bee *Melipona flavolineata* Friese (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, 61(4): 541-546.
- Nunes-Silva, P.; Imperatriz-Fonseca, V. L. & Gonçalves, L. S. (2009). Hygienic behavior of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). **Genetics and molecular research**, 8(2): 649-654.
- Ong, S. Q.; Ahmad, H.; Majid, A. H. & Jaal, Z. (2019). Conservation of agricultural soil using entomopathogenic fungi: An agent with insecticides degradation potential. **IOP Conference Series Earth and Environmental Science**, 380: 012014.
- Ortiz-Urquiza, A. & Keyhani, N. O. (2013). Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. **Insects**, 4(3): 357-374.
- Parra, J.R.P. (2014). Biological Control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola**, 71(5): 420-429.
- Page, R. E. & Breed, M. D. (1987). Kin recognition in social bees. **Trends in Ecology & Evolution**, 2(9): 272-275.
- Pedrini, N.; Ortiz-Urquiza, A.; Huarte-Bonnet, C.; Zhang, S. & Keyhani, N. O. (2013). Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of a host-pathogen interaction. **Frontiers in Microbiology**, 4: 24.
- Pedro, S. R. M. (2014). The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, 61(4): 348-354.
- Pickett, J. A.; Williams, I. H.; Smith, M. C. & Martin, A. P. (1980). Nasonov pheromone of the honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). **Journal of Chemical Ecology**, 7(3): 543-554.
- Poiani, K. A.; Richter, B. D.; Anderson, M. G.; Richterm H. E. (2000). Biodiversity conservation at multiple scales: functional sites, landscapes, and networks. **BioScience**, 50(2): 133-146.
- Potts, S. G.; Imperatriz-Fonseca, V. L.; Ngo, H. T.; Aizen, M. A.; Biesmeijer, J. C.; Breeze, T. D.; Dicks, L. V.; Garibaldi, L. A.; Hill, R.; Settele, J. & Vanbergen, A. J. (2016). Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, 540: 220-229.

- Ravaiano, S. V.; Ferreira, R. de P.; Campos, L. A. O. & Martins, G. F. (2014). The antennal sensilla of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): A study of different sexes and castes. **Naturwissenschaften**, 101(8): 603-611.
- Richard, F.-J. & Hunt, J. H. (2013). Intracolony chemical communication in social insects. **Insectes Sociaux**, 60(3): 275-291.
- Richard, F.-J.; Aubert, A. & Grozinger, C. (2008). Modulation of social interactions by immune stimulation in honey bee, *Apis mellifera*, workers. **BMC Biology**, 6(1): 50.
- Richard, F.-J.; Holt, H. L. & Grozinger, C. M. (2012). Effects of immunostimulation on social behavior, chemical communication and genome-wide gene expression in honey bee workers (*Apis mellifera*). **BMC Genomics**, 13(1): 558.
- Robinson, G. E. & Ben-Shahar, Y. (2002). Social behavior and comparative genomics: new genes or new gene regulation? **Genes, Brain and Behavior**, 1(4): 197-203.
- Roubik, D. W. (2006). Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, 37(2): 124-143.
- Sanchez-Bayo, F. & Goka, K. (2014). Pesticide residues and bees – A risk assessment. **PLoS ONE**, 9(4): e94482.
- Santos, P.; Silva, M. A. Q.; Monteiro, A. & Gava, C. (2012). Selection of surfactant compounds to enhance the dispersion of *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, 22(3): 281-292.
- Schmid-Hempel, P. & Loosli, R. (1998). A contribution to the knowledge of *Nosema* infections in bumble bees, *Bombus* spp. **Apidologie**, 29(6): 525-535.
- Schneider, S. S. & Lewis, L. A. (2004). The vibration signal, modulatory communication and the organization of labor in honey bees, *Apis mellifera*. **Apidologie**, 35: 117-131.
- Schneider, S. S.; Deeby, T.; Gilley, D. C. & DeGrandi-Hoffman, G. (2004). Seasonal nest usurpation of European colonies by African swarms in Arizona, USA. **Insectes Sociaux**, 51(4): 359-364.
- Sgariglia, M. A.; Vattuone, M. A.; Sampietro Vattuone, M. M.; Soberón, J. R. & Sampietro, D. A. (2010). Properties of honey from *Tetragonisca angustula fiebrigi* and *Plebeia wittmanni* of Argentina. **Apidologie**, 41(6): 667-675.
- Shackleton, K.; Al Toufailia, H.; Balfour, N. J.; Nascimento, F. S.; Alves, D. A. & Ratnieks, F. L. W. (2015). Appetite for self-destruction: suicidal biting as a nest defense strategy in *Trigona stingless* bees. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 69(2): 273-281.
- Shackleton, K., Alves, D. A. & Ratnieks, F. L. W. (2018). Organization enhances collective vigilance in the hovering guards of *Tetragonisca angustula* bees. **Behavioral Ecology, International Society for Behavioral Ecology**, 29(5): 1105-1112.
- Shah, P. A. & Pell, J. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 61(5-6): 413-423.
- Smith, A. A.; Millar, J. G.; Hanks, L. W. & Suarez, A. V. Experimental evidence that workers recognize reproductives through cuticular hydrocarbons in the ant *Odontomachus brunneus*. (2012). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 66(9): 1267-1276.

- Southgate, D. (2009). Population growth increases in agricultural production and trends in food prices. **The Electronic Journal of Sustainable Development**, 1(3): 3.
- Spivak, M. & Downey, D. L. (1998). Field assays for hygienic behavior in honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, 91(1): 64-70.
- Starks, P. T.; Blackie, C. A. & Seeley, T. D. (2000). Fever in honeybee colonies. **Naturwissenschaften**, 87(5): 229-231.
- Thorne, B. L. (1997). Evolution of eusociality in térmites. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 28: 27-54.
- Tilman, D.; Balzer, C.; Hill, J. & Befort, B. L. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 108(50): 20260-20264.
- Toledo-Hernández, R. A.; Ruíz-Toledo, J.; Toledo, J. & Sánchez, D. (2016). Effect of three entomopathogenic fungi on three species of stingless bees (Hymenoptera: Apidae) under laboratory conditions. **Journal of Economic Entomology**, 109(3): 1015-1019.
- Torres, R. N. S.; Lopes, J. A. D.; Moita Neto, J. M. & Citó, A. M. G. L. (2008). Constituintes voláteis de própolis piauiense. **Química Nova**, 31(3): 479-485.
- van Lenteren, J.C. & Woets, J. (1988). Biological and integrated pest control in greenhouses. **Annual Review of Entomology**, 33: 239–269.
- van Veen, J. W. & Sommeijer, M. J. (2000). Observations on gynes and drones around nuptial flights in the stingless bees *Tetragonisca angustula* and *Melipona beecheii* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Apidologie**, 31: 47-54.
- van Zweden, J. S. & d'Ettorre, P. (2010). Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons. In Blomquist, G. J. & Bagnères, A. G.: **Insect Hydrocarbons**, 222-243.
- Vandenberg, J. D. (1990). Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, 83(3): 755-759.
- Vit, P.; Pedro, S. R.; Roubik, D. (2013). **Pot-Honey: A legacy of stingless bees**. New York: Springer Science.
- 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.
- 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.
- Wille, A. (1983). Biology of stingless bees. **Annual Review Entomology**, 24: 123-147.
- Wilson, D. S. & Sober, E. (1989). Reviving the superorganism. **Journal of Theoretical Biology**, 136(3): 337-356.
- Wilson, E. O. (1971). **The Insect Societies**. Cambridge: Harvard University Press.
- Wittmann, D. (1985). Aerial defense of the nest by workers of the stingless bee *Trigona* (*Tetragonisca*) *angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 16(2): 111-114.

- Xiao, G.; Ying, S.; Peng, Z.; Wang, Z.; Zhang, S.; Xie, X.; Shang, Y.; Leger, R. J.; Zhao, G.; Wang, C. & Feng, M. (2012). Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. **Scientific Reports**, 2(483): 483.
- Zhukovskaya, M.; Yanagawa, A. & Forschler, B. (2013). Grooming behavior as a mechanism of insect disease defense. **Insects**, 4(4): 609-630.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, 17(9): 879-920.