

.UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

Impacto de um biopesticida na sobrevivência, perfil químico cuticular e reconhecimento social na abelha *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Sircio Alison dos Santos

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Entomologia

Ribeirão Preto - SP

2023

VERSÃO CORRIGIDA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

Impacto de um biopesticida na sobrevivência, perfil químico cuticular e reconhecimento social na abelha *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Sircio Alison dos Santos

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Santos do Nascimento

Ribeirão Preto - SP

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Santos, Sircio Alison

Impacto de um biopesticida na sobrevivência, perfil químico cuticular e reconhecimento social na abelha *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini), 2023. 40 p.

Dissertação apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação. Área: Entomologia.

Orientador: Nascimento, Fábio Santos.

1. Abelha sem ferrão. 2. *Beauveria bassiana*. 3. Comportamento animal. 4. Fungo entomopatogênico. 5. Inseto social.

Dedico este trabalho a minha
família e amigos que sempre
estiveram ao meu lado.

Agradecimentos

Neste exato momento em que escrevo essas palavras, várias lembranças passam por minha cabeça. Foram alguns anos projetando e executando esse trabalho e sei que sem a ajuda, parceria, apoio e principalmente incentivo de colegas, amigos e familiares nada disso teria acontecido ou seria possível. Sendo assim, deixo em palavras os meus mais sinceros agradecimentos as pessoas que foram muito especiais para mim.

Primeiramente, quero agradecer minha mãe Vera Lucia, que mesmo em meio as dificuldades, sempre cuidou para que meus irmãos e eu tivéssemos as melhores condições para estudar e seguir correndo atrás dos nossos sonhos e hoje posso te dizer com muito carinho, que valeu a pena. Obrigado por tudo, obrigado pelo amor incondicional e por palavras de incentivo.

Agradeço muito ao meu padrasto Dircelio Peterson, que chegou em nossas vidas para mostrar que sempre teremos um lugar em seu coração e sei que foi uma tarefa desafiadora cuidar de nós, mas quero te dizer que sou grato por todos os conselhos e ensinamentos, obrigado por me mostrar que a honestidade e o bom caráter são essências para a vida.

Agradeço também meus irmãos Livia, Laís e Arthur, que fazem da minha vida mais feliz e que são grandes exemplos de perseverança e profissionalismo. Sempre serei grato por todas as mensagens e ligações perguntando se está tudo bem ou se precisava de alguma coisa. E também, muito obrigado por dar-me a oportunidade de ganhar mais um status familiar, o famoso tio. Ter minhas duas sobrinhas Gabriela e Valentina é um enorme prazer.

Agradeço minha maravilhosa namorada Jessica Liberato, que me acompanha e me incentiva diariamente desde 2017. Estar contigo e compartilhar sonhos e conquistas é um

privilégio constante. Com ela vivi e vivo momentos únicos e sei de todo o sacrifício, entrega e dedicação que você proporciona para estarmos juntos. E esse nosso amor que rompeu fronteiras é o que me mantém firme em continuar buscando meu melhor. Obrigado por estar comigo nessa jornada e me ensinar tanto todos os dias, obrigado por ser meu porto seguro nos momentos que mais precisei, que sei que não foram poucos e muito obrigado por sempre acreditar em mim. Você, como eu sempre digo, é incrível.

Agradeço aos meus amigos Héder e Maria que me acompanharam por esse processo, e que me proporcionaram momentos de alegria, descontração e muita risada quando eu mais precisava, e sempre estiveram presentes para apoiar minhas decisões, principalmente com conselhos.

Quero aqui também, agradecer um colega e amigo que nos momentos em que mais me senti perdido academicamente, ele estendeu suas mãos e me ensinou e ainda me ensina, como ser um pesquisador cada vez melhor, obrigado André, por toda paciência, atenção e orientações e principalmente pela amizade e parceria neste e em muitos outros projetos.

Agradeço também, meu orientador Fábio Santos do Nascimento, que me mostrou e me deu a oportunidade de conhecer um mundo novo da ciência e da pesquisa. Obrigado por ter me recebido tão bem em seu laboratório e dar a liberdade para fazer ciência de qualidade. E aproveito para agradecer sua esposa Ivelize, que tive o enorme prazer de conhecer e foi a mediadora desse nosso encontro, iniciando assim, meus primeiros passos na pesquisa.

Aproveito para agradecer a receptividade dos membros do Laboratório de Comportamento e Ecologia de Insetos Sociais, onde tive o prazer de trabalhar e conhecer meus colegas de trabalho. No Labceis, foi onde aprendi que o mundo do conhecimento é

gigantesco, principalmente pelas trocas de ideias entre meus colegas que foram fundamentais. E deixo aqui meus agradecimentos a maravilhosa e paciente Amanda, que tanto me ajudou e me ensinou, agradeço também aos meus colegas Jeff, Jaque, Amalia, Bruno, Mari, Rafa, Luan, que me ajudou muito na etapa final deste trabalho, e João que aliás é meu colega de sala e que teve que me aguentar durante todo esse tempo, muito obrigado por cada conversa, por cada confraternização ou companhia no almoço.

E gostaria de agradecer mais duas pessoas que me ajudaram tanto diretamente como indiretamente, durante meu mestrado. Aqui deixo meu agradecimento especial ao meu amigo Sidnei Mateus, que tive a felicidade de conhecer e principalmente trocar muito conhecimento e boas risadas. E também ao Cristiano Menezes, que nos cedeu de bom grado colônias de abelhas para a realização desta pesquisa.

E por fim, agradeço o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que financiou este trabalho durante minha estadia no Programa de Pós Graduação em Entomologia.

Santos, S. A. “Impacto de um biopesticida na sobrevivência, perfil químico cuticular e reconhecimento social na abelha *Scaptotrigona aff. depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)”. Dissertação – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2023, 40 folhas.

Resumo

A utilização de biopesticidas têm crescido mundialmente como estratégia efetiva e ecologicamente sustentável para o manejo de pragas agrícolas, o que por sua vez aumenta a necessidade de investigar potenciais efeitos prejudiciais em organismos não-alvo. O efeito de formulações comerciais à base de fungos entomopatogênicos em abelhas sociais, principais polinizadores em diferentes culturas, ainda é pouco conhecido. Nós utilizamos exposição controlada, análises químicas (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) e ensaios comportamentais (apresentação de iscas na entrada da colônia) para avaliar o impacto de um micoinseticida (Boveril[®]) na sobrevivência, perfil químico e reconhecimento social em operárias de uma abelha nativa brasileira (*Scaptotrigona aff. depilis*). A exposição tópica ao micoinseticidas causou mortalidade quando aplicado no tórax (TL₅₀ = 30 min) e abdômen (TL₅₀ = 24 h). Além disso, afetou o perfil químico 12 h após a exposição, aumentando a proporção relativa de três alcanos lineares e um alcano metilado. Finalmente, afetou o reconhecimento social, de forma que coespecíficas expostas (companheiras de ninho ou forasteiras) receberam menor tempo de agressão de guardas na entrada da colônia. Nossos resultados sugerem que Boveril[®] é prejudicial para *S. aff. depilis*, causando mortalidade em abelhas diretamente expostas. Além disso, a menor agressão recebida por coespecíficos expostos pode aumentar a probabilidade de

transmissão de patógenos para a colônia. Portanto, a exposição dessas abelhas à este micoinseticida deve ser limitada.

Palavras-chave: Abelhas sem ferrão; *Beauveria bassiana*; Comportamento animal; Fungo entomopatogênico; Inseto social

Abstract

The use of biopesticides has grown worldwide as an effective and ecologically sustainable strategy for the management of agricultural pests, which in turn increases the need to investigate potential harmful effects on non-target organisms. The effect of commercial formulations based on entomopathogenic fungi on social bees, the main pollinators in different cultures, is still little known. We used controlled exposure, chemical analyses (gas chromatography coupled with mass spectrometry) and behavioral assays (presentation of bee dummies at the entrance to the nest) to evaluate the impact of a mycoinsecticide (Boveril®) on survival, chemical profile and social recognition in honeybee workers of a Brazilian native bee (*Scaptotrigona* aff. *depilis*). Topical exposure to mycoinsecticides caused mortality when applied to the thorax (TL₅₀ = 30 min) and abdomen (TL₅₀ = 24 h). Furthermore, it affected the chemical profile 12 h after exposure, increasing the relative proportion of three linear alkanes and one methylated alkane. Finally, it affected social recognition, so that exposed conspecifics (nestmates or foreigners) received less aggression time from guards at the colony entrance. Our results suggest that Boveril® is detrimental to *S. aff. depilis*, causing mortality in directly exposed bees. In addition, the lower aggression received by exposed conspecifics could increase the probability of transmission of pathogens to the colony. Therefore, the exposure of these bees to this mycoinsecticide must be limited.

Keywords: Animal behavior; *Beauveria bassiana*; Entomopathogenic fungus; Stingless

bee

Sumário

1. Introdução	12
2. Material e Métodos	15
2.1 <i>Período, Local de estudo e Abelhas</i>	15
2.2 <i>Biopesticida</i>	16
2.3 <i>Exposição das Abelhas</i>	16
2.4 <i>Ensaio de Sobrevivência</i>	18
2.5 <i>Análise Química</i>	18
2.6 <i>Ensaio Comportamental</i>	19
2.7 <i>Análise Estatística</i>	21
3. Resultados	22
3.1 <i>Ensaio de Sobrevivência</i>	22
3.2 <i>Análises Químicas</i>	24
3.3 <i>Ensaio Comportamentais</i>	27
4. Discussão	28
5. Conclusão	32
6. Referências	33

1. Introdução

A produtividade e a qualidade de muitos sistemas agrícolas, especialmente aqueles em áreas tropicais (Klein *et al.*, 2007), dependem diretamente do serviço de polinização, que é predominantemente realizado por abelhas (Greenleaf e Kremen, 2006; Stanley *et al.*, 2013; Klatt *et al.*, 2014; Woodcock *et al.*, 2019). Tal serviço ecológico de reconhecido valor econômico (Gallai *et al.*, 2009; Calderone, 2012) pode ser comprometido devido ao declínio populacional destes insetos documentado globalmente nas últimas décadas (Aldercotte *et al.*, 2022). Este pode ser causado por uma série de fatores naturais e ações humanas (Grünewald, 2010; Goulson *et al.*, 2015; Nicholson e Egan, 2020; Freitas *et al.*, 2022; Williams e Hemberger, 2023), gerando preocupações conservacionistas e comerciais (Lever *et al.*, 2014; Potts *et al.*, 2016; Ramos-Jiliberto *et al.*, 2020). Por exemplo, a ampla ocorrência de pragas agrícolas (Culliney, 2014) demanda a utilização de métodos de controle, principalmente pesticidas. Muitas pragas são artrópodes, o que é prejudicial para insetos-praga pode também ser para insetos benéficos (Serrão *et al.*, 2022). Logo, inseticidas podem ser tóxicos para as abelhas (Abati *et al.*, 2021).

Estudos demonstram que inseticidas sintéticos, embora eficientes no controle de pragas, são frequentemente prejudiciais para polinizadores, causando efeitos letais e subletais (Sponsler *et al.*, 2019; Aguiar, *et al.*, 2023). O mesmo vale para biopesticidas (derivados de produtos naturais com extratos vegetais, microrganismos e outros) que apesar de serem menos danosos ao ambiente se comparados aos equivalentes sintéticos, também podem ter efeitos prejudiciais (Cappa *et al.*, 2022). Estudar a interação entre polinizadores e pesticidas permite identificar estratégias de controle de pragas compatíveis com polinizadores, conforme preconizado pelo Manejo Integrado de Pragas e Polinizadores (IPPM) (Egan *et al.*, 2020). O uso de biopesticidas microbianos, tais como

aqueles baseados no fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (1912) cresce anualmente. Este fungo generalista ataca insetos de forma percutânea (Mascarin e Jaronski, 2016): esporos hidrofóbicos aderem aos hidrocarbonetos cuticulares (HCs), germinam e penetram na cutícula do inseto, em geral matando o hospedeiro em até alguns dias após a infecção (Lecuona *et al.*, 1991; Shah e Pell, 2003; Zimmermann, 2007). A capacidade de controlar populações de diversas pragas, a degradação relativamente rápida e o preço relativamente baixo das formulações comerciais resultam na ampla utilização deste biopesticida em sistemas agrícolas (Sayed e Behle, 2017; Subbanna *et al.*, 2019). Embora biopesticidas à base de fungos sejam tradicionalmente considerados ambientalmente sustentáveis, a literatura recente sugere efeitos prejudiciais em invertebrados não-alvos (Bordalo *et al.*, 2020; Dornelas *et al.*, 2021; Cappa *et al.*, 2022). A liberação inundativa de esporos, borrifando uma calda diretamente sobre as plantas é o principal modo de aplicação de micoinseticidas em sistemas agrícolas (Castro *et al.*, 2016; Ausique *et al.*, 2017; Wraight *et al.*, 2021). Conseqüentemente, polinizadores podem ter contato direto com altas concentrações destes defensivos.

Micoinseticidas podem afetar a fisiologia, cognição e comportamento de abelhas (Carlesso *et al.*, 2020; Cappa *et al.*, 2022), o que por sua vez pode comprometer sua sobrevivência (Conceição *et al.*, 2014; Leite *et al.*, 2022). Efeitos colaterais incluem alterações no perfil de HCs (Cappa *et al.*, 2019; Almeida *et al.*, 2022), que são importantes pistas químicas envolvidas no reconhecimento social (Blomquist e Bagnères, 2010). Em abelhas melíferas (*Apis mellifera*), forrageiras expostas à *B. bassiana* são mais aceitas por guardas não relacionadas, facilitando a transmissão de patógenos entre colônias (Cappa *et al.*, 2019). Em abelhas sem ferrão (*Tetragonisca angustula*), forrageiras expostas ao mesmo fungo são repelidas por guardas relacionadas, prevenindo seu acesso à colônia

(Almeida *et al.*, 2022) e diminuindo a força de trabalho da colônia. Estudos anteriores (Conceição *et al.*, 2014; Cappa *et al.*, 2019; Almeida *et al.*, 2022; Leite *et al.*, 2022) utilizaram esporos isolados a partir de culturas, a fim de testar precisamente o efeito do fungo. Entretanto, em sistemas agrícolas, as abelhas estarão expostas à formulações comerciais que contém o princípio ativo (fungo) mas também adjuvantes (i.e., aditivos químicos, à priori inertes, que aumentam a eficácia de um ingrediente ativo) (Hazen, 2000), que podem potencializar o efeito dos fungos nos hospedeiros. Contudo, existem evidências de que adjuvantes presentes em pesticidas podem ser por si só prejudiciais para polinizadores (Straw *et al.*, 2021, 2022). Até onde sabemos, os efeitos de formulações comerciais de micoinseticidas na sobrevivência, perfil químico cuticular e reconhecimento social em abelhas ainda não foram investigados.

Neste estudo, realizamos ensaios laboratoriais e de campo, a fim de testar os efeitos da exposição ao biopesticida Boveril[®], uma formulação comercial baseada no fungo *B. bassiana*, na abelha social nativa brasileira *Scaptotrigona aff. depilis*, um eficiente polinizador em sistemas agrícolas (Santos *et al.*, 2008; Roselino *et al.*, 2009). Nós testamos três hipóteses: exposição tópica aguda de forrageiras ao Boveril[®] (1) causa mortalidade, (2) altera o perfil de HCs e (3) afeta a resposta comportamental de guardas durante interações sociais experimentalmente simuladas na entrada da colônia.

2. Material e Métodos

2.1 Período, Local de estudo e Abelhas

Este estudo foi realizado entre junho e agosto de 2022, utilizando um total de 10 colônias racionais estabelecidas na Universidade de São Paulo (USP), campus Ribeirão Preto (21° 09' 47,9" S, 47° 51' 38,8" W) (Figura 1B). Forrageiras foram identificadas pela presença de pólen em suas corbículas, sendo coletadas com aspirador entomológico entre 10:00 e 12:00 h, quando pousaram no tubo de entrada da colônia (Figura 1A). Estas foram imediatamente acondicionadas em tubos plásticos separados por colônia, e imediatamente trazidas ao Laboratório de Comportamento e Ecologia de Insetos Sociais da USP (Figura 1C). Um total de 860 abelhas foram utilizadas, sendo 600 em ensaios de sobrevivência, 100 em análises químicas e 160 foram utilizadas como iscas em ensaios comportamentais. A amostragem foi balanceada entre as colônias (um total de 86 abelhas amostradas por colônia).

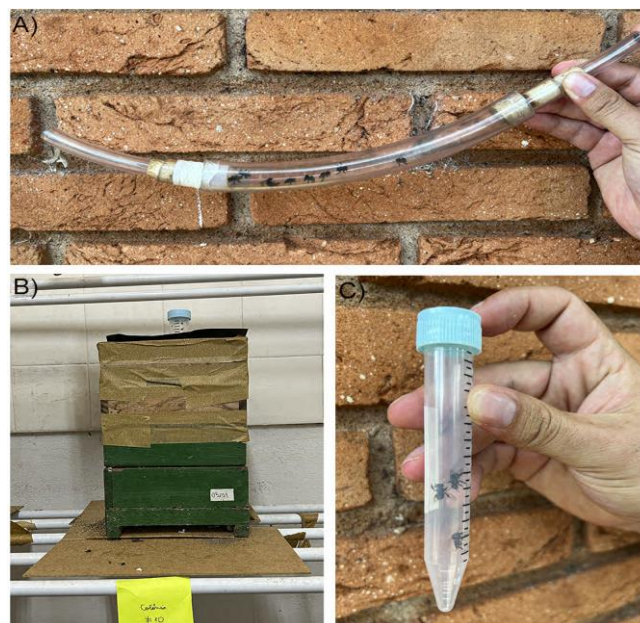


Figura 1. Coleta de abelhas forrageiras de *S. aff. depilis* A) Aspirador entomológico; B) Modelo de caixa racional; C) Tubo plástico utilizado para transporte das abelhas.

2.2 Biopesticida

Boveril[®] foi adquirido da empresa Koppert do Brasil Holding LTDA. Esta formulação comercial é um inseticida microbiológico de ação por contato que tem como princípio ativo o fungo *B. bassiana*, cepa ESALQ PL63 (mínimo de 1×10^8 conídios viáveis/g), correspondendo a 50 g/Kg (5% m/m) (Figura 2). Imediatamente antes de iniciar os experimentos, a viabilidade dos conídios foi estimada em 94%, determinada pela contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFCs) segundo Alves e Moraes (1998).

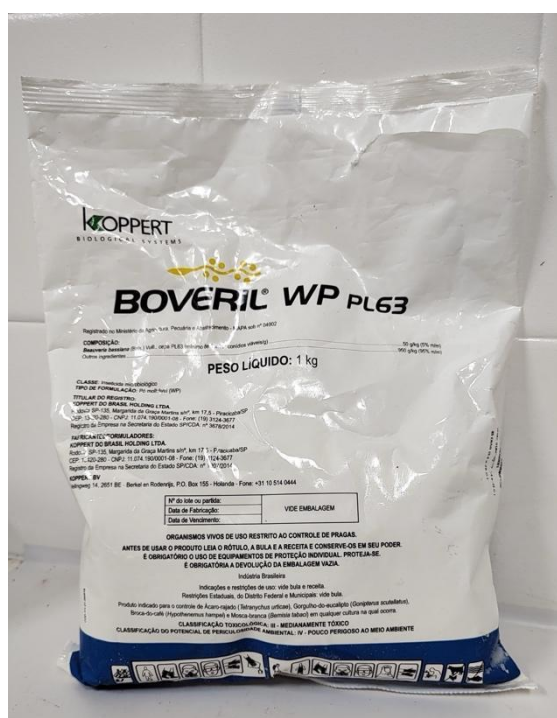


Figura 2. Inseticida microbiológico Boveril[®].

2.3 Exposição das Abelhas

O experimento simulou o pior cenário no qual abelhas, ao forragear, entram em contato com o biopesticida no momento de sua aplicação em uma cultura. No laboratório, cada abelha foi submetida à um de 6 diferentes tratamentos tópicos: 1 μ L de uma solução aquosa de Triton[®] X-100 a 0,01% (v/v) contendo Boveril[®] na concentração recomendada

pelo fabricante ($5 \mu\text{g A.I./}\mu\text{L}$ [1×10^4 conídios viáveis/ μL]) aplicado na porção dorsal do tórax (Boveril[®] tórax) ou na porção ventral do abdômen (Boveril[®] abdômen); $1 \mu\text{L}$ de uma solução aquosa de Triton[®] X-100 a 0,01% (v/v) sem Boveril[®] aplicado no tórax (Triton[®] X-100 tórax) ou no abdômen (Triton[®] X-100 abdômen); ou $1 \mu\text{L}$ de água destilada aplicada no tórax (Água tórax) ou no abdômen (Água abdômen) (Figura 3A). Em seguida, cada abelha foi individualizada em um recipiente plástico de 0,2 L contendo solução açucarada 50% *ad libitum* por até 24h (Figura 3B). As condições do laboratório foram de aproximadamente $28 \text{ }^\circ\text{C}$, 70% de umidade relativa e um ciclo de luz claro/escuro de 12 h.

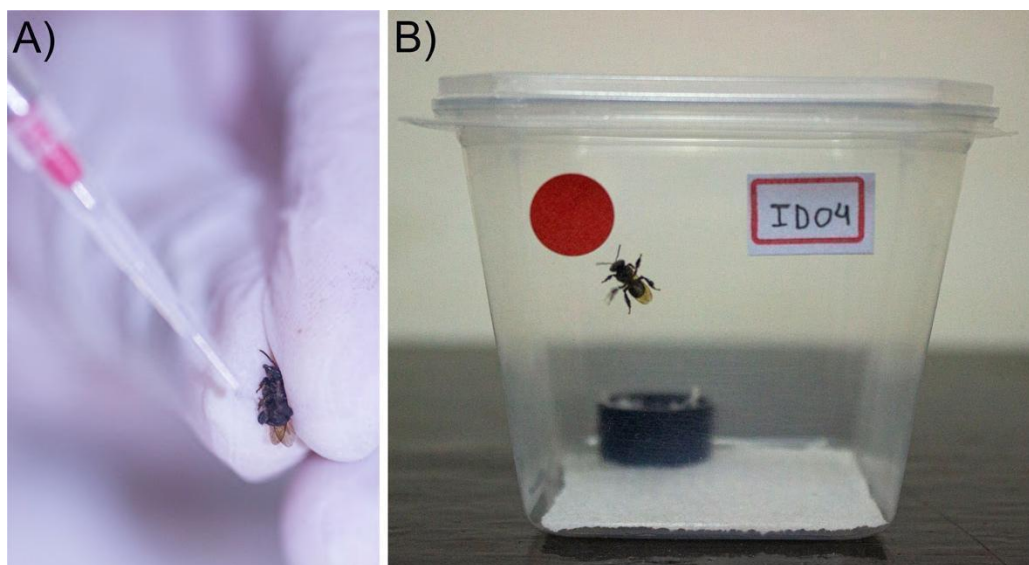


Figura 3. Condições experimentais das forrageiras de *Scaptotrigona* aff. *depilis* em laboratório. A) aplicação tópica de $1 \mu\text{L}$ de solução, correspondendo a um dos seis tratamentos; B) Abelha tratada mantida em recipiente plástico contendo solução açucarada 50% *ad libitum*.

Um conjunto de abelhas tratadas ($N = 600$, 100 de cada um dos 6 tratamentos) foi utilizado para o ensaio de sobrevivência. Um outro conjunto de abelhas tratadas ($N = 260$, sendo metade do tratamento Boveril[®] abdômen, metade Triton[®] X-100 abdômen) foi morto por congelamento 12 h após a exposição e subsequentemente utilizado para

análises químicas (N = 100, sendo 50 do tratamento Boveril® abdômen e 50 Triton® X-100 abdômen) ou como iscas em ensaios comportamentais (N = 160, sendo 80 do tratamento Boveril® abdômen e 80 Triton® X-100 abdômen). Em abelhas *T. angustula*, duas horas foi um período suficiente para *B. bassiana* causar alterações no perfil de HCs (Almeida *et al.*, 2022), potencialmente afetando a resposta comportamental de coespecíficos durante interações sociais.

2.4 Ensaio de Sobrevivência

Imediatamente após a exposição, a sobrevivência das abelhas foi acompanhada por 24 h nos seguintes momentos: 0,5; 1; 2; 4; 6; 12 e 24 horas. Uma abelha foi considerada morta quando não se movia em resposta a um estímulo mecânico (Toledo-Hernández *et al.*, 2016).

2.5 Análise química

Os HCs foram extraídos individualmente durante 1 minuto em um *vial* de vidro de 2 mL (Vetec, HPLC) com solvente hexano (Macron Fine Chemicals, 95% n-Hexano) (Figura 4A). Os vials com os extratos foram secos em câmara de fluxo. Os compostos restantes foram ressuspensos em 100 µL de hexano e analisados injetando 2 µL dessa solução (modo *Splitless*) em um sistema de cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS - Shimadzu, modelo QP2010) equipado com coluna capilar de sílica Rxi-1ms (30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro × 0,25 µm de espessura), com fluxo de gás hélio a uma taxa de 1 mL min⁻¹ (Figura 4B). A temperatura do forno foi iniciada em 100 °C e aumentou 5 °C/min até atingir 290 °C, posteriormente, aumentou 3 °C/min até atingir 310 °C (mantido por 10 min). A temperatura do injetor foi de 280 °C. Os compostos foram determinados com base nos padrões de fragmentação

dos espectros (íon e massa molecular) (Figura 4C) e com o auxílio de uma solução padrão composta por diferentes hidrocarbonetos lineares sintéticos (C21-C40 - Fluka analytical) (Carlson *et al.*, 1998).

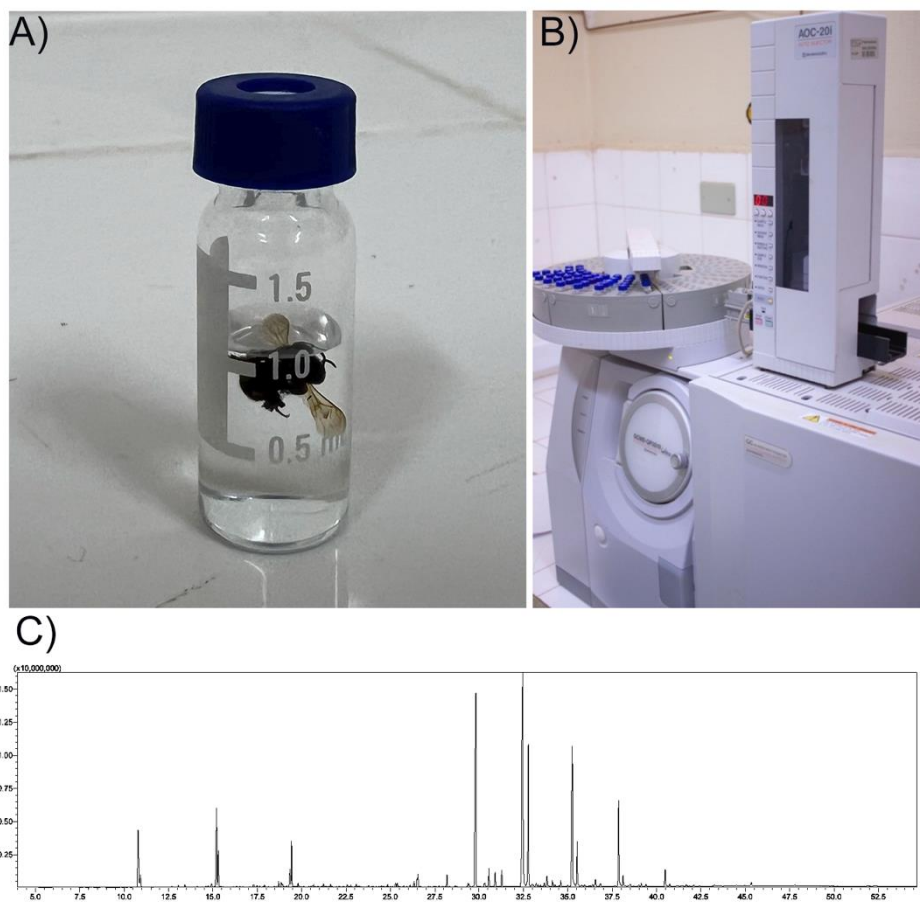


Figura 4. Processo de extração e análise de hidrocarbonetos cuticulares da abelha *Scaptotrigona* aff. *depilis*. A) Abelha submergida em solvente hexano; B) Cromatógrafo Gasoso Acoplado a Espectrômetro de Massas (GC/MS); C) Exemplo de cromatograma utilizado para identificação dos compostos obtidos após análise das amostras.

2.6 Ensaio comportamental

Este ensaio compreendeu a apresentação de iscas (abelhas mortas experimentalmente manipuladas) para colônias coespecíficas em condições de campo (Figura 5A). Tais ensaios têm sido utilizados de forma bem sucedida para demonstrar habilidades de reconhecimento em abelhas e outros insetos sociais (Cappa *et al.*, 2016;

Cappa *et al.*, 2019; de Souza *et al.*, 2022). Abelhas utilizadas como iscas (ver item 2.3) foram descongeladas até a temperatura ambiente cerca de uma hora antes de serem apresentadas às colônias. Assim, uma colônia focal foi apresentada a quatro estímulos consecutivos, separados por intervalos de 15 minutos, em uma sequência aleatória: companheira de colônia exposto ao Boveril[®], companheira de colônia não exposto, forasteira exposta ao Boveril[®], forasteira não exposta.

Em cada apresentação, um dos estímulos foi fixado em um bastão de 30 cm, que foi aproximado lentamente da borda do tubo de entrada da colônia e a duração do primeiro contato físico entre a isca e uma guarda (abelha focal) foi registrada por até 90 segundos a partir do início da interação (Figura 5B). Ao longo de cada apresentação, várias abelhas que passavam pela entrada da colônia (entrando ou saindo) interagiram com a isca, porém, a fim de padronizar as oportunidades de coespecíficos interagirem com a isca e também garantir a acurácia da observação comportamental, optamos por registrar apenas o comportamento da primeira guarda que interagiu com a isca (método animal focal, Altmann, 1974). Todas as apresentações foram realizadas entre 10:00 e 17:00 h. Cada isca foi utilizada uma única vez e foram realizadas um total de 160 apresentações (16 por colônia, 10 colônias). Todos os ensaios foram filmados. O pesquisador responsável por apresentar as iscas e assistir os vídeos para registrar a duração do primeiro contato físico desconhecia a filiação (companheira de colônia ou forasteira) e o status de exposição ao biopesticida (exposta ou não exposta) de cada isca.

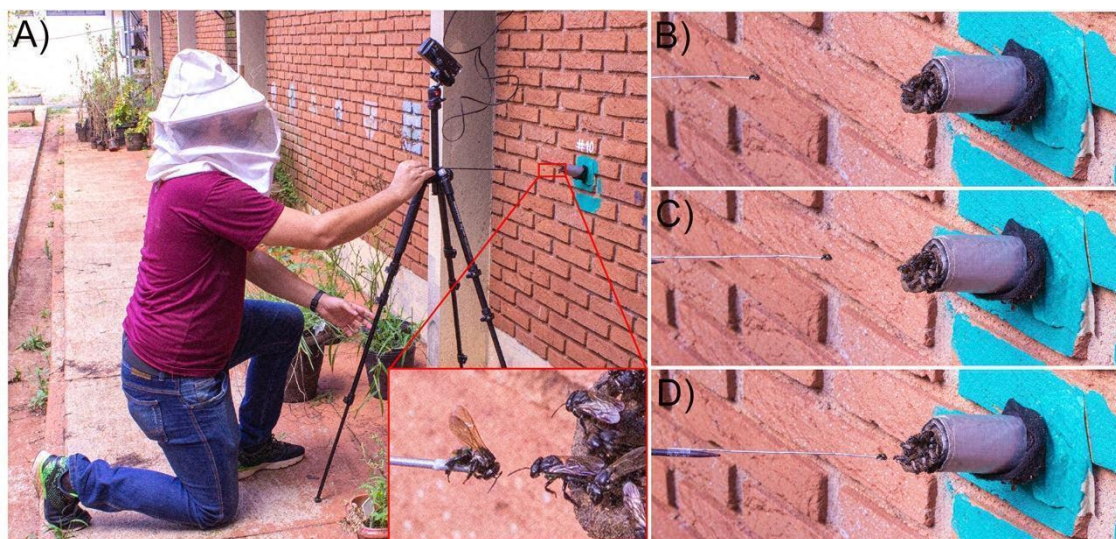


Figura 5. Apresentação de iscas no tubo de entrada de colônia de *S. aff. depilis*. A) Pesquisador apresentando isca no tubo de entrada da colônia (quadro vermelho demonstrando a interação da isca com guarda presente na borda do tubo de entrada); B-D) Aproximação progressiva da isca no tubo de entrada da colônia

2.7 Análise estatística

Para testar se a exposição ao Boveril[®] causa mortalidade de abelhas, curvas de sobrevivência para cada tratamento foram obtidas a partir dos dados usando estimadores de Kaplan-Meier e analisados pelo teste de log-rank. Devido às múltiplas comparações, aplicamos a correção de Bonferroni, a fim de minimizar a ocorrência de diferenças significativas devido à chance (Andrade, 2019).

Para testar se a exposição ao Boveril[®] altera o perfil químico cuticular, a abundância relativa dos diferentes HCs em abelhas submetidas aos tratamentos Boveril[®] abdômen e Triton[®] X-100 abdômen foram comparadas com a análise PERMANOVA (distância Bray-Curtis), seguida pela análise discriminante (SIMPER) com 999 permutações. Na análise SIMPER, também foi aplicada a correção de Bonferroni.

Para testar se as abelhas reconhecem coespecíficos expostos ao Boveril[®], as respostas comportamentais de abelhas focais às iscas apresentadas foram analisadas por meio da construção de um Modelo Linear Misto (LMM). A duração em segundos do primeiro contato físico recebido por cada isca foi incluída como variável resposta, enquanto que a filiação (companheira de colônia ou forasteira), a exposição ao Boveril[®] (exposta ou não exposta) e a interação entre elas foram incluídas como variáveis explicativas. A ordem de apresentação da isca e a colônia focal foram inseridas como efeitos aleatórios.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R 4.2.1 (R Core Team, 2022) v.4.2.1, utilizando-se os pacotes *lme4* (Bates *et al.*, 2015), *car* (Fox *et al.*, 2019), *survival* (Therneau, 2022), *survminer* (Kassambara *et al.*, 2021), *vegan* (Oksanen *et al.*, 2019). O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Ensaio de sobrevivência

A sobrevivência das abelhas foi reduzida em alguns tratamentos (Log-Rank: $\chi^2 = 290,6$; $gl = 5$; $p < 0,0001$, Figura 6, Tabela 1). Abelhas tratadas com Boveril[®] sobreviveram menos que aquelas tratadas com Triton[®] X-100 ou com água, independente da região corporal de exposição. Também, independente da região de exposição, abelhas tratadas com Triton[®] X-100 sobreviveram tanto quanto aquelas tratadas com água. As abelhas cujo tórax foi exposto ao Triton[®] X-100 ou ao Boveril[®] sobreviveram menos que abelhas cujo abdômen foi exposto aos mesmos produtos. A sobrevivência de abelhas expostas à água foi semelhante, independente da região corporal de exposição.

O tempo letal médio (TL₅₀) foi de 24h para abelhas expostas ao Boveril® no abdômen, mas apenas 30 minutos para abelhas expostas ao mesmo produto no tórax. A mortalidade das abelhas submetidas aos demais tratamentos foi menor que 50%.

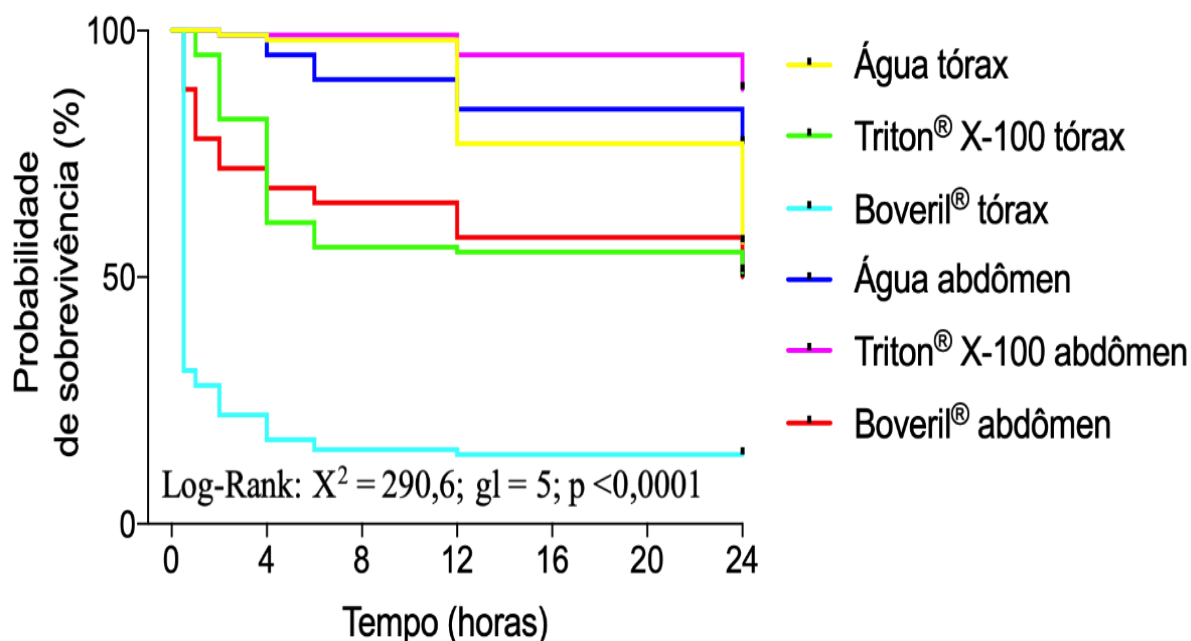


Figura 6. Curvas de sobrevivência de forrageiras da abelha *Scaptotrigona aff. depilis* após exposição tópica à 1 µL de solução aquosa de Triton® X-100 a 0,01% (v/v) contendo Boveril® [5 µg I.A./ µL (1×10^4 conídios viáveis/ µL)], ou solução aquosa de Triton® X-100 a 0,01% (v/v), ou água, aplicados no tórax ou abdômen, em condições de laboratório. Para cada tratamento foram utilizadas 100 abelhas provenientes de 10 colônias (10 abelhas por colônia).

Tabela 1. Comparações entre curvas de sobrevivência (teste Log-rank) em forrageiras da abelha *Scaptotrigona aff. depilis* após exposição tópica à 1 µL de solução aquosa de Triton® X-100 à 0,01% (v/v) contendo Boveril® [5 µg I.A./ µL (1×10^4 conídios viáveis/ µL)], ou solução aquosa de Triton® X-100 à 0,01% (v/v), ou água, aplicados no tórax ou abdômen, em condições de laboratório. Para cada tratamento foram utilizadas 100 abelhas provenientes de 10 colônias (10 abelhas por colônia). Nessas análises, o nível de significância foi ajustado ($\alpha = 0,006$ após correção de Bonferroni). Em negrito estão as comparações que diferiram significativamente.

Comparações pareadas	χ^2	gl	p
Água tórax x Triton® X-100 tórax	4,88	1	0,0272
Água tórax x Boveril® tórax	96,11	1	<0,0001
Triton® X-100 Tórax x Boveril® tórax	65,57	1	<0,0001
Água abdômen x Triton® X-100 abdômen	4,654	1	0,31
Água abdômen x Boveril® abdômen	19,24	1	<0,0001
Triton® X-100 abdômen x Boveril® abdômen	38,18	1	<0,0001
Água tórax x Água abdômen	6,913	1	0,0086
Triton® X-100 tórax x Triton® X-100 abdômen	36,5	1	<0,0001
Boveril® tórax x Boveril® abdômen	51,36	1	<0,0001

3.2 *Análises químicas*

Foram identificados 40 picos de hidrocarbonetos com comprimentos de cadeia entre 16 a 33 carbonos (Tabela 2). Esses compostos são pertencentes às classes de alcano linear (45%), alcano metilado (30%), alceno (22,5%) e desconhecido (2,5%). A exposição ao Boveril® causou uma alteração significativa no perfil de HCs (PERMANOVA: $F_{1,98} = 2,80$, $p = 0,039$). Quatro compostos aumentaram significativamente em função da

exposição ao Boveril[®], de acordo com a análise discriminante SIMPER: n-C₁₈ (p = 0,0001); n-C₂₀ (p = 0,0001); 5MeC₂₅ (p = 0,0010); n-C₂₇ (p = 0,0008) foram aumentados.

Tabela 2. Lista de hidrocarbonetos identificados, incluindo o tempo de retenção e quantidade relativa (média e desvio padrão (dp)) referente ao perfil de hidrocarbonetos cuticulares de abelhas *Scaptotrigona aff. depilis* previamente tratadas no abdômen com 1µL de solução aquosa de Triton[®] X-100 a 0,01% (v/v) contendo Boveril[®] [5 µg I.A./ µL (1 x 10⁴ conídios viáveis/ µL)] (Boveril[®] abdômen) ou solução aquosa de Triton[®] X-100 a 0,01% (v/v) (Triton[®] X-100 abdômen), dos grupos controle e tratamento. Os valores de p referem-se à análise discriminante SIMPER. Nessas análises, o nível de significância foi ajustado ($\alpha = 0,0013$ após correção de Bonferroni). Em negrito estão os compostos que diferiram significativamente entre as classes.

Compostos	Tempo de retenção (min)	Triton [®] X-100 abdômen	Boveril [®] abdômen	Valor de p
n-C ₁₆	13,076	0,107±0,031	0,132±0,038	0,0018
n-C ₁₇	15,225	7,746±7,826	5,917±8,098	0,1329
Desconhecido	15,349	2,66±3,061	2,407±3,164	0,4703
n-C₁₈	17,313	0,171±0,052	0,276±0,321	0,0001
n-C ₁₉	19,322	1,716±1,660	1,355±1,603	0,2000
n-C₂₀	21,25	0,159±0,046	0,238±0,205	0,0001
n-C ₂₁	23,097	0,164±0,051	0,185±0,053	0,0581
n-C ₂₂	24,868	0,15±0,039	0,172±0,058	0,0795
n-C ₂₃	26,572	1,486±1,022	1,044±0,919	0,0128
5MeC ₂₃	27,767	0,216±0,098	0,23±0,461	0,0110
n-C ₂₄	28,209	0,796±0,292	0,757±0,27	0,8494
z-C ₂₅	29,394	0,878±0,954	0,731±0,808	0,6299
n-C ₂₅	29,811	19,025±5,182	17,984±5,799	0,6853

13-;11MeC ₂₅	30,312	0,417±0,131	0,921±3,355	0,2733
9MeC ₂₅	30,35	0,336±0,137	0,357±0,107	0,1465
7MeC ₂₅	30,425	0,108±0,049	0,11±0,085	0,7811
5MeC₂₅	30,564	1,32±0,362	1,595±0,497	0,0010
z-C ₂₆	30,932	1,457±0,352	1,419±0,301	0,2254
n-C ₂₆	31,301	1,117±0,347	1,17±0,365	0,6735
z-C ₂₇	32,469	26,649±5,992	25,72±6,001	0,6806
n-C₂₇	32,772	9,262±6,81	13,37±5,333	0,0008
13-;11-;9MeC ₂₇	33,238	0,377±0,137	0,387±0,133	0,7739
7MeC ₂₇	33,354	0,162±0,07	0,155±0,08	0,3500
5MeC ₂₇	33,479	0,137±0,051	0,154±0,048	0,1121
z-C ₂₈	33,852	0,757±0,229	0,68±0,256	0,1235
n-C ₂₈	34,172	0,689±0,484	0,733±0,385	0,4463
z-C ₂₉	35,25	9,677±2,254	9,012±2,651	0,3080
n-C ₂₉	35,54	5,665±3,965	6,128±3,21	0,2690
15-;13-;11MeC ₂₉	35,96	0,159±0,038	0,187±0,267	0,1971
5MeC ₂₉	36,215	0,109±0,173	0,065±0,029	0,0337
3MeC ₂₉	36,52	0,14±0,088	0,143±0,081	0,8523
z-C ₃₀	36,578	0,326±0,129	0,297±0,158	0,2616
n-C ₃₀	36,858	0,249±0,091	0,278±0,095	0,2509
z-C ₃₁	37,88	3,687±1,393	3,525±1,948	0,2055
n-C ₃₁	38,136	0,744±0,242	0,884±0,575	0,0821
11MeC ₃₁	38,527	0,195±0,061	0,198±0,095	0,4977
z-C ₃₂	39,166	0,105±0,053	0,115±0,082	0,3434
n-C ₃₂	39,427	0,132±0,058	0,142±0,053	0,3425
z-C ₃₃	40,507	0,633±0,347	0,681±0,532	0,2918
n-C ₃₃	40,766	0,116±0,045	0,146±0,101	0,0571

3.3 *Ensaaios comportamentais*

Em todos os ensaios, a guarda subiu na isca e persistentemente a mordeu, portanto, daqui em diante, o primeiro contato físico foi classificado como agressivo. O LMM apontou que o tempo da interação agressiva da guarda com a isca foi influenciado pela exposição ao Boveril[®] ($p = 0,001$; $\chi^2 = 10,13$), mas não pela filiação ($p = 0,37$; $\chi^2 = 0,8$), além disso, não houve interação entre a exposição ao biopesticida e a filiação ($p = 0,32$; $\chi^2 = 0,97$) (Tabela 3). Ou seja, independente da filiação, abelhas expostas ao Boveril[®] recebem menor tempo de agressão de coespecíficos durante interações com guardas na borda de entrada da colônia (Figura 7).

Tabela 3. Resultados do modelo linear misto (LMM) aplicado à duração (segundos) do primeiro contato físico de uma abelha *Scaptotrigona* aff. *depilis* com uma isca (coespecífico morto apresentado em um bastão na entrada da colônia) previamente tratada no abdômen com 1 μ L de solução aquosa de Triton[®] X-100 à 0,01% (v/v) contendo Boveril[®] [5 μ g I.A./ μ L (1×10^4 conídios viáveis/ μ L)] (Boveril[®] abdômen) ou solução aquosa de Triton[®] X-100 à 0,01% (v/v) (Triton[®] X-100 abdômen), apresentadas à sua própria colônia de origem ou a uma colônia diferente. A variável que diferiu significativamente está destacada em negrito.

Variável	Estimativa	Erro padrão	χ^2	p
Filiação	0,459	7,178	0,8	0,37
Exposição	-11,162	7,178	10,139	0,001
Filiação*Exposição	-10	10,151	0,97	0,32

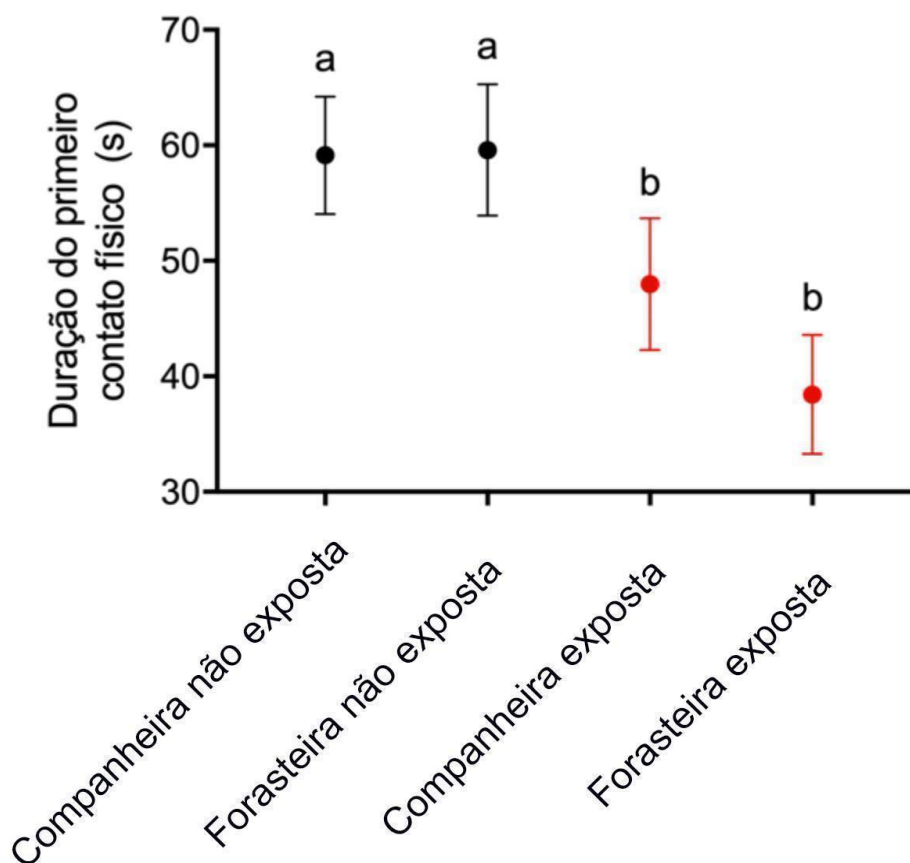


Figura 7. Duração (s) do primeiro contato físico (Média \pm erro padrão da média) de uma abelha *Scaptotrigona aff. depilis* com uma isca (coespecífico morto apresentado em um bastão na entrada da colônia) previamente tratada no abdômen com 1 μ L de solução aquosa de Triton[®] X-100 à 0,01% (v/v) contendo Boveril[®] [5 μ g I.A./ μ L (1×10^4 conídios viáveis/ μ L)] (Boveril[®] abdômen, em vermelho) ou solução aquosa de Triton[®] X-100 à 0,01% (v/v) (Triton[®] X-100 abdômen, em preto), apresentadas à sua própria colônia (companheira) de origem ou a uma colônia diferente (forasteira). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as classes.

4. Discussão

A hipótese de que um biopesticida comercial à base de fungo é prejudicial para polinizadores foi confirmada uma vez que em condições de laboratório, a exposição tópica aguda a uma concentração realista de Boveril[®] mata forrageadoras. Recentemente,

Leite *et al.* (2022) realizaram um ensaio laboratorial de sobrevivência no qual operárias de *S. aff. depilis* foram expostas topicamente no tórax à esporos da mesma cepa de *B. bassiana* presente na formulação comercial Boveril[®], diluídos em solução aquosa contendo Tween 80. Esses autores demonstraram que concentrações de esporos entre 5×10^2 e 5×10^4 conídios/ μL causam alta mortalidade, sendo que o tempo letal médio (TL₅₀) variou entre 4 e 5 dias, dependendo da concentração. Assim, não é surpresa que a exposição dessas abelhas à formulação comercial Boveril[®], que contém alta concentração de esporos (1×10^4 conídios/ μL) e também adjuvantes, causa letalidade muito mais intensa, evidenciada pela TL₅₀ de apenas 30 min quando Boveril[®] foi aplicado no tórax, ou 24h quando aplicado no abdômen.

A mortalidade de abelhas expostas ao Boveril[®] foi alta, mas variou dramaticamente de acordo com a parte corporal exposta. Nesse ponto, os dados permitem apenas especular sobre possíveis mecanismos pelos quais o biopesticida causa a mortalidade das abelhas. Uma vez que a germinação dos esporos de *B. bassiana* leva ao menos 10 h (Zimmermann, 2007), é improvável que a mortalidade a curto-prazo observada nas abelhas expostas pelo tórax (TL₅₀= 30 min) se deva à germinação dos esporos. Uma possível explicação é o comprometimento das trocas gasosas devido ao efeito obstrutivo imediato que adjuvantes presentes em pesticidas podem ter sobre os espiráculos dos insetos. Esse efeito foi recentemente proposto para explicar a rápida letalidade de abelhas causada pela exposição tópica a adjuvantes de um herbicida sintético (Straw *et al.*, 2021). Já o tempo letal médio (TL₅₀) para as abelhas expostas pelo abdômen foi de 24 h. Nesse caso, a mortalidade pode ter sido causada pela germinação do fungo.

Potenciais efeitos de substâncias adjuvantes presentes em pesticidas e suas caldas de aplicação têm sido amplamente negligenciados (Chen *et al.*, 2018; Mesnage e

Antoniou, 2018; Straw *et al.*, 2022), mas a literatura tem demonstrado efeitos prejudiciais em abelhas (Ciarlo *et al.*, 2012; Mullin, 2015; Mullin *et al.*, 2016; Straw *et al.*, 2021; Cox e Zeiss, 2022). Os tratamentos experimentais desse estudo permitem testar explicitamente os efeitos do Triton[®] X-100, um surfactante que em conjunto com a água e o Boveril[®] compõe a calda do biopesticida. A mortalidade nos tratamentos com Triton[®] X-100 foi baixa e semelhante àquela dos tratamentos com apenas água, sugerindo que este produto, ao menos na concentração e dose aplicada neste estudo (1 μ L de solução aquosa de Triton[®] X-100 à 0,01% (v/v) no tórax ou abdômen), seja inerte e seguro para as abelhas. Além disso, a mortalidade nos tratamentos com Boveril[®] foi maior que aquela nos tratamentos com Triton[®] X-100 e nos tratamentos com apenas água. Logo, o Boveril[®] é o componente chave mediando a mortalidade das abelhas.

O tempo letal médio em abelhas expostas ao Boveril[®] no abdômen indica que estas sobrevivem tempo suficiente para retornarem às suas colônias e potencialmente contaminar companheiras com esporos do fungo. A transmissão horizontal de esporos de *B. bassiana* durante interações sociais tem sido demonstrada em vários insetos (Harris *et al.*, 2000; García-Munguia *et al.*, 2011; Toledo *et al.*, 2014). Dessa forma, o efeito prejudicial reportado aqui para a exposição tópica direta ao biopesticida, bem como o efeito reportado previamente para a exposição direta aos esporos (Leite *et al.*, 2022) podem potencialmente ser amplificados à nível colonial. Além disso, a exposição ao Boveril[®] afetou o reconhecimento social das abelhas. Ao serem aproximadas das colônias, iscas foram agressivamente interceptadas por guardas, mas a duração da agressão foi menor nas iscas expostas, independentemente de sua filiação (companheira de colônia ou forasteira). Resultados semelhantes foram reportados para *A. mellifera* (Cappa *et al.*, 2019) na qual forrageiras expostas à *B. bassiana* foram menos agredidas por guardas, independente da filiação. A agressão reduzida a coespecíficos expostos

(companheiras de colônia e forasteiras) pode facilitar sua entrada na colônia, conseqüentemente potencializando a transmissão horizontal de esporos de *B. bassiana* e vários outros patógenos entre colônias (Cappa *et al.*, 2019).

A habilidade de reconhecer companheiros de ninho e rejeitar forasteiros é bastante comum entre insetos sociais (van Zweden e d'Ettorre, 2010). Contudo, em nosso experimento, iscas forasteiras e companheiras de colônia não foram discriminadas por guardas presentes na borda do tubo de entrada da colônia. Até onde sabemos, o reconhecimento de companheira de colônia não foi previamente investigado em *S. aff. depilis*, mas um estudo experimental (Jungnickel *et al.*, 2004) com a abelha congênica *Scaptotrigona bipunctata* demonstrou que guardas presentes na borda do tubo de entrada da colônia permitem a entrada de forasteiras, e que o reconhecimento de companheira é realizado por guardas presentes na parte mais interna do tubo, após alguns minutos de interação. Logo, a posição das abelhas focais (borda do tubo) e a duração da apresentação das iscas (90 segundos) podem potencialmente explicar a falta de reconhecimento de companheira de colônia, embora mais experimentos são necessários para testar essas hipóteses. Apesar disso, demonstramos que guardas de *S. aff. depilis* presentes na borda do tubo de entrada da colônia discriminam coespecíficos expostos ao biopesticida.

A discriminação de coespecíficos expostos ao biopesticida provavelmente se deve à diferenciação no perfil químico cuticular. Abelhas expostas têm um perfil de HCs distinto, caracterizado pelo aumento da abundância relativa de quatro compostos (três alcanos lineares e um alcano metilado). Os alcanos têm reconhecido papel no reconhecimento social em meliponíneos (Buchwald e Breed, 2005), logo, a alteração dessas pistas químicas pode afetar interações sociais. Em adição, substâncias derivadas do parasita (por exemplo, ergosterol presente na parede celular de fungos), que ocorrem

apenas nos hospedeiros expostos, podem mediar respostas comportamentais de coespecíficos, conforme recentemente demonstrado em formigas (Stock *et al.*, 2023). A alteração no perfil químico cuticular e no reconhecimento social foi previamente demonstrada em *A. mellifera* (Cappa *et al.*, 2019) e *T. angustula* (Almeida *et al.*, 2022) expostas à *B. bassiana*, sugerindo a generalidade destes efeitos colaterais em abelhas sociais.

5. Conclusão

A exposição tópica ao Boveril[®], na concentração recomendada pelo fabricante para a aplicação em campo, compromete a sobrevivência de forrageiras em *S. aff. depilis*, altera seu perfil de HCs e as torna mais toleradas na entrada da colônia. Potencialmente, esses efeitos (letais e colaterais) podem resultar em queda na força de trabalho e transmissão de patógenos entre as colônias. Portanto, a exposição dessas abelhas ao biopesticida deve ser limitada.

6. Referências

- Abati, R., Sampaio, A. R., Maciel, R. M. A., Colombo, F. C., Libardoni, G., Battisti, L., Lozano, E. R., Ghisi, N.C., Costa-Maia, F. M., Potrich, M. (2021). Bees and pesticides: The research impact and scientometrics relations. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(25), 32282-32298.
- Aguiar, J.M.R.B.V., Nocelli, R.C.F., Giurfa, M., Nascimento, F.S. (2023). Neonicotinoid effects on tropical bees: Imidacloprid impairs innate appetitive responsiveness, learning and memory in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Science of The Total Environment*, In Press, 162859.
- Aldercotte, A. H., Simpson, D. T., & Winfree, R. (2022). Crop visitation by wild bees declines over an 8-year time series: A dramatic trend, or just dramatic between-year variation?. *Insect Conservation and Diversity*, 15, 522-533.
- Almeida, F. C. R., Magalhães, D. M., Favaris, A. P., Rodríguez, J., Azevedo, K. E. X., Bento, J. M. S., & Alves, D. A. (2022). Side effects of a fungus-based biopesticide on stingless bee guarding behaviour. *Chemosphere*, 287, 132147.
- Altmann, J. (1974). Observational study of behavior: sampling methods. *Behaviour*, 49, 227-266.
- Alves, S.B., Moraes, S.A. (1998). Quantificação de inóculo de patógenos de insetos, in: Alves, S.B. (Ed.), *Controle microbiano de insetos*. FEALQ, Piracicaba, pp.765-777.
- Andrade, C. (2019). Multiple testing and protection against a type 1 (false positive) error using the Bonferroni and Hochberg corrections. *Indian Journal of Psychological Medicine*, 41(1), 99-100.
- Ausique, J. J.S., D'Alessandro, C. P., Conceschi, M. R., Mascarin, G. M. Delalibera Júnior, I. (2017). Efficacy of entomopathogenic fungi against adult *Diaphorina citri* from laboratory to field applications. *Journal of Pest Science*, 90, 947-960.

- Bates, D., Kliegl, R., Vasishth, S., & Baayen, H. (2015). Parsimonious mixed models. arXiv preprint arXiv:1506.04967.
- Blomquist, G. J., & Bagnères, A. G. (Eds.). (2010). Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology. Cambridge University Press.
- Bordalo, M. D., Gravato, C., Beleza, S., Campos, D., Lopes, I., & Pestana, J. L. T. (2020). Lethal and sublethal toxicity assessment of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Beauveria bassiana* based bioinsecticides to the aquatic insect *Chironomus riparius*. *Science of The Total Environment*, 698, 134155.
- Buchwald, R., & Breed, M. D. (2005). Nestmate recognition cues in a stingless bee, *Trigona fulviventris*. *Animal Behaviour*, 70, 1331-1337.
- Calderone, N. W. (2012). Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: trend analysis of aggregate data for the period 1992–2009. *PloS one*, 7, e37235.
- Cappa, F., Baracchi, D., & Cervo, R. (2022). Biopesticides and insect pollinators: Detrimental effects, outdated guidelines, and future directions. *Science of The Total Environment*, 155714.
- Cappa, F., Bruschini, C., Protti, I., Turillazzi, S., & Cervo, R. (2016). Bee guards detect foreign foragers with cuticular chemical profiles altered by phoretic varroa mites. *Journal of Apicultural Research*, 55, 268-277.
- 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, 1-10.
- Carlesso, D., Smargiassi, S., Sassoli, L., Cappa, F., Cervo, R., & Baracchi, D. (2020). Exposure to a biopesticide interferes with sucrose responsiveness and learning in honey bees. *Scientific Reports*, 10, 1-12.
- Carlson, D. A., Bernier, U. R., & Sutton, B. D. (1998). Elution patterns from capillary GC for methyl-branched alkanes. *Journal of Chemical Ecology*, 24, 1845-1865.

- Castro, T., Mayerhofer, J., Enkerli, J., Eilenberg, J., Meyling, N. V., de Andrade Moral, R., Demétrio, C. G. B., Delalibera Jr, I. (2016). Persistence of Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. robertsii* in strawberry crop soil after soil drench application. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 233, 361-369.
- Chen, J., Fine, J. D., & Mullin, C. A. (2018). Are organosilicon surfactants safe for bees or humans?. *Science of The Total Environment*, 612, 415-421.
- Ciarlo, T. J., Mullin, C. A., Frazier, J. L., & Schmehl, D. R. (2012). Learning impairment in honey bees caused by agricultural spray adjuvants. *PLoS One*, 7, e40848.
- Conceição, P. de J., Neves, C. M. de L., Sodr e, G. da S., de Carvalho, C. A. L., Souza, A. V., Ribeiro, G. S., Pereira, R. de C. (2014). Susceptibility of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) worker bees to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Sociobiology*, 61, 184-188.
- Cox, C., & Zeiss, M. (2022). Health, pesticide adjuvants, and inert ingredients: California case study illustrates need for data access. *Environmental Health Perspectives*, 130, 085001.
- Culliney, T. W. (2014). Crop losses to arthropods. *Integrated Pest Management: Pesticide Problems*, Vol. 3, 201-225.
- de Souza, A. R., Franca, W., Prato, A., & Nascimento, F. S. D. (2022). Sex recognition does not modulate aggression toward nest intruders in a paper wasp. *Current Zoology*.
- Dornelas, A. S., Sarmiento, R. A., Saraiva, A. S., Barbosa, R. S., Vieira, M. M., Gravato, C., & Soares, A. M. (2021). Effects of two biopesticides and salt on behaviour, regeneration and sexual reproduction of the freshwater planarian *Girardia tigrina*. *Journal of Hazardous Materials*, 404, 124089.
- Egan, P. A., Dicks, L. V., Hokkanen, H. M., & Stenberg, J. A. (2020). Delivering integrated pest and pollinator management (IPPM). *Trends in Plant Science*, 25, 577-589.

- Fox, J., Weisberg, S., Price, B., Adler, D., Bates, D., Baud-Bovy, G., & Bolker, B. (2019). *car*: Companion to Applied Regression. R package version 3.0-2. Website <https://CRAN.R-project.org/package=car> [accessed 17 March 2020].
- Freitas, C., Oki, Y., Resende, F. M., Zamudio, F., Simone de Freitas, G., Moreira de Rezende, K., Souza, F. A., De Jong, D., Quesada, M., Carvalho, A. S., Pires, C. S. S., Fernandes, G. W. (2022). Impacts of pests and diseases on the decline of managed bees in Brazil: a beekeeper perspective. *Journal of Apicultural Research*, 1-14.
- Gallai, N., Salles, J. M., Settele, J., & Vaissière, B. E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68, 810-821.
- García-Munguía, A. M., Garza-Hernández, J. A., Rebollar-Tellez, E. A., Rodríguez-Pérez, M. A., & Reyes-Villanueva, F. (2011). Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites & Vectors*, 4, 1-6.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347, 1255957.
- Greenleaf, S. S., & Kremen, C. (2006). Wild bees enhance honey bees' pollination of hybrid sunflower. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 13890-13895.
- Grünewald, B. (2010). Is pollination at risk? Current threats to and conservation of bees. *GAIA-Ecological Perspectives for Science and Society*, 19, 61-67.
- Harris, R. J., Harcourt, S. J., Glare, T. R., Rose, E. A. F., & Nelson, T. J. (2000). Susceptibility of *Vespula vulgaris* (Hymenoptera: Vespidae) to generalist entomopathogenic fungi and their potential for wasp control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 75, 251-258.

- Hazen, J. L. (2000). Adjuvants—terminology, classification, and chemistry. *Weed Technology*, 14, 773-784.
- Jungnickel, H., Da Costa, A. J. S., Tentschert, J., Patricio, E. F. L., 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, 761-766.
- Kassambara, A., Kosinski, M., Biecek, P., & Fabian, S. (2021). *Survminer: Drawing Survival Curves Using 'Ggplot2'; R Package Version 0.4. 8.* 2020.
- Klatt, B. K., Holzschuh, A., Westphal, C., Clough, Y., Smit, I., Pawelzik, E., Tschardt, T. (2014). Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281, 20132440.
- Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tschardt, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the royal society B: Biological Sciences*, 274, 303-313.
- 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, 10-18.
- Leite, M. O., Alves, D. A., Lecocq, A., Malaquias, J. B., Delalibera Jr, I., & Jensen, A. B. (2022). Laboratory Risk Assessment of Three Entomopathogenic Fungi Used for Pest Control toward Social Bee Pollinators. *Microorganisms*, 10, 1800.
- Lever, J. J., van Nes, E. H., Scheffer, M., & Bascompte, J. (2014). The sudden collapse of pollinator communities. *Ecology Letters*, 17, 350-359.
- Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-26.
- Mesnager, R., & Antoniou, M. N. (2018). Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticides. *Frontiers in Public Health*, 5, 361.

- Mullin, C. A. (2015). Effects of 'inactive' ingredients on bees. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 194-200.
- Mullin, C. A., Fine, J. D., Reynolds, R. D., & Frazier, M. T. (2016). Toxicological risks of agrochemical spray adjuvants: organosilicone surfactants may not be safe. *Frontiers in Public Health*, 4, 92.
- Nicholson, C. C., & Egan, P. A. (2020). Natural hazard threats to pollinators and pollination. *Global Change Biology*, 26, 380-391.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., Wagner, H. (2019) *vegan: Community ecology package*. R package version 2.5-4.
- Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V., 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.
- R Core Team, R.(2022). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Ramos-Jiliberto, R., Moisset de Espanés, P., & Vázquez, D. P. (2020). Pollinator declines and the stability of plant–pollinator networks. *Ecosphere*, 11, e03069.
- Roselino, A. C., Santos, S. B., Hrnčir, M., & Bego, L. R. (2009). Differences between the quality of strawberries (*Fragaria x ananassa*) pollinated by the stingless bees *Scaptotrigona* aff. *depilis* and *Nannotrigona testaceicornis*. *Genetics and Molecular Research*, 8, 539-545.
- Santos, S. A., Roselino, A. C., & Bego, L. R. (2008). Pollination of cucumber, *Cucumis sativus* L. (Cucurbitales: Cucurbitaceae), by the stingless bees *Scaptotrigona* aff. *depilis* Moure and *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier (Hymenoptera: Meliponini) in greenhouses. *Neotropical Entomology*, 37, 506-512.

- Sayed, A. M., & Behle, R. W. (2017). Evaluating a dual microbial agent biopesticide with *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and *Beauveria bassiana* blastospores. *Biocontrol Science and Technology*, 27, 461-474.
- Serrão, J. E., Plata-Rueda, A., Martínez, L. C., & Zanuncio, J. C. (2022). Side-effects of pesticides on non-target insects in agriculture: A mini-review. *The Science of Nature*, 109, 17.
- Shah, P. A., & Pell, J. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 413-423.
- Sponsler, D. B., Grozinger, C. M., Hitaj, C., Rundlöf, M., Botías, C., Code, A., ... & Douglas, M. R. (2019). Pesticides and pollinators: A socioecological synthesis. *Science of the Total Environment*, 662, 1012-1027.
- Stanley, D. A., Gunning, D., & Stout, J. C. (2013). Pollinators and pollination of oilseed rape crops (*Brassica napus* L.) in Ireland: Ecological and economic incentives for pollinator conservation. *Journal of Insect Conservation*, 17, 1181-1189.
- Stock, M., Milutinović, B., Hoenigsberger, M., Grasse, A. V., Wiesenhofer, F., Kamleitner, N., Narasimhan, M., Schmitt, T., Cremer, S. (2023). Pathogen evasion of social immunity. *Nature Ecology & Evolution*, 1-11.
- Straw, E. A., Carpentier, E. N., & Brown, M. J. (2021). Roundup causes high levels of mortality following contact exposure in bumble bees. *Journal of Applied Ecology*, 58, 1167-1176.
- Straw, E. A., Thompson, L. J., Leadbeater, E., & Brown, M. J. (2022). 'Inert' ingredients are understudied, potentially dangerous to bees and deserve more research attention. *Proceedings of the Royal Society B*, 289, 20212353.
- Subbanna, A. R. N. S., Stanley, J., Venkateswarlu, V., Chinna Babu Naik, V., & Khan, M. S. (2019). Toxicological prospects on joint action of microbial insecticides and chemical pesticides. *Microbes for Sustainable Insect Pest Management*, 317-340.
- Therneau, T. (2022). A Package for Survival Analysis in R. R package version 3.4-0, <https://CRAN.R-project.org/package=survival>.

- Toledo, J., Campos, S. E., Flores, S., Liedo, P., Barrera, J. F., Villaseñor, A., & Montoya, P. (2014). Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. *Journal of Economic Entomology*, 100, 291-297.
- 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, 1015-1019.
- van Zweden, J. S., & d'Ettorre, P. (2010). Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons. *Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology*, 11, 222-243.
- Williams, N. M., & Hemberger, J. (2023). Climate, pesticides, and landcover drive declines of the western bumble bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120, e2221692120.
- Woodcock, B. A., Garratt, M. P. D., Powney, G. D., Shaw, R. F., Osborne, J. L., Soroka, J., Lindström, S. A. M., Stanley, Ouvrard, P., Edwards, M. E., Jauker, F., McCracken, M. E., Zou, Y., Potts, S. G., Rundlöf, M., Noriega, J. A., Greenop, A., Smith, H. G., Bommarco, R., van der Werf, Stout, W., Steffan-Dewenter, J. C., I., Morandin, L., Bullock, J. M., Pywell, R. F. (2019). Meta-analysis reveals that pollinator functional diversity and abundance enhance crop pollination and yield. *Nature Communications*, 10, 1481.
- Wraight, S. P., Galaini-Wraight, S., Howes, R. L., Castrillo, L. A., Griggs, M. H., Carruthers, R. I., Smith, R. H., Matsumoto, T. K., Keith, L. M. (2021). Efficacy of *Beauveria bassiana* strain GHA spray applications against coffee berry borer *Hypothenemus hampei* on Hawaii Island. *Biological Control*, 161, 104587.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17, 553-596