

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS**

AMANDA ROBERTA SAMPAIO

**ANÁLISE DE AGROTÓXICOS E ACIBENZOLAR-S-METÍLICO (ASM)
EM *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) E A AÇÃO DE ASM
NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM SOJA**

DISSERTAÇÃO

**DOIS VIZINHOS
2020**

AMANDA ROBERTA SAMPAIO

**ANÁLISE DE AGROTÓXICOS E ACIBENZOLAR-S-METÍLICO (ASM)
EM *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) E A AÇÃO DE ASM
NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM SOJA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Dois Vizinhos, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias - Área de Concentração: Genética, uso e conservação da biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Cintra Maniglia.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Nédia de Castilhos Ghisi

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Michele Potrich

DOIS VIZINHOS

2020

S192a

Sampaio, Amanda Roberta

Análise de agrotóxicos e Acibenzolar-S-Metílico (ASM) em *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) e a ação de ASM na indução de resistência em soja – Dois Vizinhos: [s.n], 2020.
73 f. :il.

Orientador: Dr Thiago Cintra Maniglia.

Coorientadora: Dr^a Nédia de Castilhos Ghisi.

Coorientadora: Dr^a Michele Potrich.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. Dois Vizinhos, 2020.

Bibliografia p. 61-73

1. Abelhas africanizadas. 2. Soja - Cultura. 3. Fungicidas. 4. Produtos químicos agrícolas. I. Maniglia, Thiago Cintra, orient. II. Ghisi, Nédia de Castilhos, coorient. III. Potrich, Michele, coorient. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos. V. Título

CDD:630



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 40

Análise de agrotóxicos e Acibenzolar-S-Metílico (ASM) em *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) e a ação de ASM na indução de resistência em soja

Amanda Roberta Sampaio

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

Banca examinadora:

Dr. Thiago Cintra Maniglia
UTFPR - TD

Dra. Fabiana Martins Costa Maia
UTFPR - DV

Dr. Edson Bertoldo
UNISEP-DV

Coordenador(a) do PPGSIS
Assinatura e carimbo

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se arquivado no Departamento de Registros Acadêmicos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Fábio e Marta Sampaio, e minha irmã, Barbara Roberta Sampaio, vocês são minha base. Inúmeros são os motivos para agradecer, mas aqui, agradeço pelo amor incondicional e por nunca medirem esforços para me verem bem e feliz. Nunca conseguirei recompensar tudo que fizeram e fazem por mim. Serei sempre grata por tanto. À vocês, todo meu amor!

À Deus por me dar saúde física, psicológica e mental para chegar até aqui. Por escutar minhas preces e meus choros quando só Ele estava lá.

Ao meu namorado, Marcos Luis Molinete, que mesmo longe nunca deixou de me apoiar, sempre esteve presente e me ajudou como pôde para que este dia chegasse. Essa distância está no fim e você sabe que me inspira a ser cada dia um pouquinho melhor! Te amo.

À minha família toda, avós, avô, madrinhas, padrinhos, tios, tias e primos, por cada “Mas vai dar tudo certo!”, por todos os momentos de descontração, risos e amor, e por cada oração que recebi. Amo vocês!

Ao meu orientador Dr. Thiago Maniglia pelo acompanhamento.

Às minhas professoras, Dr^a Michele Potrich e Dr^a Nédia Ghisi que nunca deixaram o prefixo “co” pesar na palavra “coorientadoras”. Vocês são minha inspiração, não só como profissionais, mas como pessoas. Obrigada por todos os ensinamentos e também pela amizade, vocês são demais!

Aos meus amigos, companheiros e fiéis confidentes, Fernanda Colombo, Gabriela Libardoni, Raiza Abati e Rodrigo Maciel, que mais que seus corações, abriram suas casas para mim e me acolheram como membro de suas famílias. Obrigada pelas risadas compartilhadas, pela parceria em todos os experimentos, pela ajuda sem igual e, principalmente, por tornarem essa trajetória muito mais doce. Quem me dera ter conhecido (como eu conheço hoje) vocês ainda na graduação. Que pessoas iluminadas... Sem palavras, amo vocês!

Ao professor Dr. Sergio Mazaro pelo apoio nos experimentos com a cultura da soja, que nunca foi minha área, pela mediação junto à Embrapa para desenvolver meu treinamento e pelo acompanhamento.

A minha amiga de infância Suellen Pagno que, mesmo sem ser da área me fez explicar pelo menos dez vezes o que eu estava fazendo para poder somar e me

incentivar. Obrigada por torcer por mim, ouvir minhas reclamações, dar conselhos e por me permitir compartilhar mais essa fase contigo, te amo!

Aos colegas do laboratório de Controle Biológico que ajudaram nos experimentos e nas avaliações. Ao colega Dr. Edson Bertoldo pela ajuda na implantação, acompanhamento e coleta do experimento na etapa de campo com a cultura da soja.

A Embrapa Soja por me ceder o treinamento na área de Biotecnologia e me permitir utilizar seus equipamentos. Às pessoas de lá, principalmente ao Rafael Guayato, Suellen Hishinuma, Adriana Bombrini dos Santos e a pesquisadora Dr^a Francismar Marcelino Guimarães que me acompanharam e me ensinaram tanto.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná por ceder toda a infraestrutura necessária para realização dos experimentos. Sete anos neste lugar, e cada dia mais orgulhosa da minha formação.

Enfim, a todos que fizeram parte da realização deste trabalho, professores, colegas, amigos e família, meu muito obrigada!

RESUMO

SAMPAIO, Amanda Roberta. Análise de agrotóxicos e Acibenzolar-S-Metílico (ASM) em *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) e a ação de ASM na indução de resistência em soja. 78 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas (Área de Concentração: Genética, uso e conservação da biodiversidade), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Dois Vizinhos, 2020.

Abelhas são importantes polinizadores, com destaque a *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), porém, o uso excessivo de agrotóxicos tem sido uma adversidade a estes organismos. Por este motivo, o cultivo da soja é uma das ameaças para esta espécie. A indução de resistência busca reduzir a utilização de agrotóxicos, nesta e em outras culturas, ativando a defesa da própria planta. Acibenzolar-S-metílico (ASM) é um indutor de resistência sem recomendação para soja e desconhecido quanto a sua toxicidade às abelhas. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a relação entre o uso de agrotóxicos e a mortalidade de *A. mellifera*, utilizando de uma revisão meta-analítica, avaliar os efeitos de acibenzolar-S-metílico na sobrevivência e no voo de forrageiras de *A. mellifera* africanizada e na expressão do gene β -1,3-glucanase em soja. Pela meta-análise com 154 conjuntos de dados de 1951 a 2019 foi possível confirmar a relação entre a mortalidade de *A. mellifera* e o uso de agrotóxicos. O modo de aplicação e a classe dos inseticidas de maior impacto na sobrevivência desses insetos, respectivamente, é a pulverização direta e os inseticidas. O ASM foi testado quanto a seletividade à forrageiras de *A. mellifera* (alimentação, pulverização e contato), em cinco concentrações (20, 40, 60, 80 e 100% da dose de campo), além da testemunha (água destilada autoclavada). Além disso, 30 abelhas que permaneceram duas horas em contato com a dose de campo e foram avaliadas quanto a capacidade de voo depois de 48 horas. As abelhas alimentadas e as abelhas que entraram em contato com as doses de campo de ASM não tiveram sua sobrevivência reduzida quando comparadas à testemunha. A sobrevivência das abelhas foi reduzida significativamente desde a dose mais baixa (20%) quando ASM foi pulverizado sobre as abelhas. A capacidade de voo das forrageiras não foi alterada. ASM também foi testado como indutor de resistência de soja, para a expressão do gene SGlu5 de soja, responsável pela produção de β -1,3-glucanase. Para isso, foi realizado um experimento em casa de vegetação, oito vasos com solo autoclavado receberam 60 sementes de soja cada. Apenas as plantas mais vigorosas foram mantidas e, quando o ciclo da cultura atingiu V2-V3, procedeu-se a aplicação do ASM (considerado tempo zero) em metade das plantas/vasos. Após 24 horas inoculou-se o fungo *Phakopsora pachyrhizi* e durante nove dias foram realizadas coletas de material vegetal. Este material foi levado ao laboratório, extraído RNA, transformado em cDNA e posteriormente, avaliado a expressão gênica por RT-qPCR. Verificou-se que ASM não é eficiente para a expressão do gene SGlu5, mas *P. pachyrhizi* ativou e aumentou a expressão desse gene. Agrotóxicos exercem efeitos negativos sobre *A. mellifera*, tendo relação com a mortalidade deste inseto. A utilização de ASM em dose de campo reduz a sobrevivência de *A. mellifera* quando pulverizado diretamente, porém quando as forrageiras africanizadas entram em contato ou se alimentam de dieta contendo o ASM não há efeito negativo, tampouco no voo destas. Além disso, ASM não exerce efeito sobre a expressão do gene SGlu5 em soja.

Palavras-chave: Meta-análise. Toxicidade. Expressão gênica.

ABSTRACT

SAMPAIO, Amanda Roberta. Analysis of pesticides and Acibenzolar-S-Methyl (ASM) in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) and the action of ASM in the induction of resistance in soybean. 78 f. Dissertation (Masters in Agrarian Sciences) Graduate Program in Agroecosystems (Area of concentration: Agroecosystems) - Federal University of Technology - Paraná (UTFPR). Dois Vizinhos, 2020.

Bees are the most important pollinators, especially *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), however, the excessive use of pesticides has been an adversity to these organisms. For this reason, soybean cultivation is one of the threats to this species. Resistance induction seeks to reduce the use of pesticides, in this crop and others, by activating the defense of the plant. Acibenzolar-S-methyl (ASM) is a resistance inducer with no recommendation for soybeans and unknown as to its toxicity to bees. Thus, this study aimed to evaluate the relationship between the use of pesticides and the mortality of *A. mellifera* using a meta-analytical review, to evaluate the effects of acibenzolar-S-methyl on the survival and flight of Africanized *A. mellifera* forages and for the expression of the β -1,3-glucanase gene in soybeans. By a meta-analysis with 154 data sets from 1951 to 2019 it was possible to confirm the relationship between *A. mellifera* mortality and the use of pesticides. The method of application and the class of insecticides with the greatest impact on the survival of these insects, respectively, is direct spraying, and insecticides. ASM was tested for selectivity to *A. mellifera* forage bees (feeding, spraying and contact), in five concentration (20, 40, 60, 80 and 100% of the field dose), in addition to the control (autoclaved distilled water). In addition, 30 bees that remained in contact with the field dose for two hours were evaluated for flight capacity after 48 hours. Honeybees fed and which came into contact with field doses of ASM did not have their survival reduced when compared to the control. Honeybee survival was significantly reduced from the lowest dose (20%) when ASM was sprayed on the honeybees. Flight capacity has not been changed. ASM has also been tested as a soy resistance inducer, for the expression of the soybean SGlu5 gene, responsible for β -1,3-glucanase production. For this, an experiment was carried out in a greenhouse, eight pots with autoclaved soil received 60 soybean seeds each. Only the most vigorous plants were maintained and, when the crop cycle reached V2-V3, ASM (considered zero time) was applied in half of plants/ pots. After 24 hours, the fungus *Phakopsora pachyrhizi* was inoculated and, for nine days, collections of plant material were performed. This material was taken to the laboratory, extracted RNA, transformed into cDNA and later, evaluated for gene expression by RT-qPCR. It was found that ASM is not efficient for the expression of the SGlu5 gene, but *P. pachyrhizi* activated and increased the expression of this gene. Pesticides have negative effects on *A. mellifera*, related to this insect mortality. The use of ASM in a field dose reduces the survival of *A. mellifera* when direct spray, however, when the Africanized honeybees come into contact or feeding diet with ASM, there are no negative effects, neither in of these insects. Moreover, ASM doesn't have effect on the expression of the SGlu5 gene in soybean.

Keywords: Meta-analysis. Toxicity. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Forest plot de estudos avaliando a influência de pesticidas na sobrevivência de <i>Apis mellifera</i> , organizados pelo tamanho dos efeitos. Nota: o estimador da Odds Ratio (tamanho dos efeitos = OR) e o intervalo de confiança (IC) de 95% de cada experimento incluído na meta-análise são apresentados. O número próximo às barras representa o número de referência de cada experimento, conforme mostrado na Tabela 1. A Grande Média é o tamanho médio geral dos efeitos de todos os estudos.....	24
Figura 2 - Forest plot de estudos avaliando a influência de pesticidas na sobrevivência de <i>Apis mellifera</i> , organizados por tamanho de efeito e agrupados pela metodologia utilizada.....	32
Figura 3 - Forest plot de estudos avaliando a influência de pesticidas na sobrevivência de <i>Apis mellifera</i> , organizados por tamanho de efeito e agrupados por estágio de vida em que as abelhas foram submetidas a tratamento.....	33
Figura 4 - Forest plot de estudos que avaliam a influência de pesticidas na sobrevivência de <i>Apis mellifera</i> , organizados por tamanho de efeito e agrupados por grupo químico do ingrediente ativo testado.....	34
Figura 5 - Forest plot de estudos avaliando a influência de pesticidas na sobrevivência de <i>Apis mellifera</i> , organizados por tamanho de efeito e agrupados por função agrícola.....	34
Figura 6 - Gráfico de funil para análise de viés de publicação, com tamanho de efeito no eixo X e tamanho ou variação da amostra no eixo Y.....	35
Figura 7 - Ilustração da torre de voo e classificação dos estratos de acordo com o comportamento das abelhas nos testes de queda e voo.	44

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1 - Gaiolas de PVC, contendo 20 abelhas forrageiras de <i>A. mellifera</i> africanizada disposta em sala de criação ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12h).....	42
Fotografia 2 - Pulverização de 290 μL da calda diretamente sobre as abelhas separadas em grupos de dez em cada caixa gerbox.	43
Fotografia 3 - Abelhas forrageiras em contato com o tratamento pulverizado em superfície vítrea por duas horas.	43
Fotografia 4- a) Inoculação de <i>P. pachyrhizi</i> com o uso de borrifador; b) simulação de câmara úmida utilizando saco plástico para favorecer a infecção do patógeno na planta.	53
Fotografia 5 - Pulverização de amostra vegetal em gral com uso de nitrogênio líquido.....	54
Fotografia 6 - Aplicação de 1 μL de RNA total em NanoDrop para quantificação.	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Sobrevivência de forrageiras de <i>Apis mellifera</i> africanizada alimentadas com pasta Cândi incorporada com doses de Acibenzolar-S-metílico, por Kaplan-Meier ajustada aos tempos (horas). Onde: T1-0% (controle), T2-20%, T3-40%, T4-60%, T5-80%, T6-100% da dose recomendada. Temperatura de 27 ± 2 °C, U. R. de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12/12h C/E. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2019.	46
Gráfico 2 - Sobrevivência de forrageiras de <i>Apis mellifera</i> africanizada quando em contato com superfície vítrea pulverizada com diferentes doses de Acibenzolar-S-metílico, por Kaplan-Meier ajustada aos tempos (horas). Onde: T1-0% (controle), T2-20%, T3-40%, T4-60%, T5-80%, T6-100% da dose recomendada. Temperatura de 27 ± 2 °C, U. R. de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12/12h C/E. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2019.	46
Gráfico 3 - Sobrevivência de forrageiras de <i>Apis mellifera</i> africanizada após pulverização direta de diferentes doses de Acibenzolar-S-metílico por Kaplan-Meier ajustada aos tempos (horas). Onde: T1-0% (controle), T2-20%, T3-40%, T4-60%, T5-80%, T6-100% da dose recomendada. Temperatura de 27 ± 2 °C, U. R. de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12/12h C/E. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2019.	47
Gráfico 4 - Número de forrageiras de <i>Apis mellifera</i> africanizada que retomaram o voo após entrar em contato com diferentes concentrações de ASM.	49
Gráfico 5 - Deslocamento de forrageiras de <i>A. mellifera</i> africanizada após entrar em contato por duas horas com ASM.	50
Gráfico 6 - Quantificação relativa da expressão do gene SGlu5 em diferentes tempos com diferentes tratamentos.	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	OS AGROECOSSISTEMAS E AS ABELHAS	10
2.2	<i>Apis mellifera</i> L. (Hymenoptera:Apidae).....	10
2.3	<i>Apis mellifera</i> E OS AGROTÓXICOS	12
2.4	SOJA E <i>Apis mellifera</i>	14
2.5	SOJA.....	15
2.6	INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	16
2.7	β -1,3-GLUCANASE.....	17
2.8	PCR TEMPO REAL.....	19
3	UMA PREOCUPAÇÃO GLOBAL: A MORTALIDADE DE <i>Apis mellifera</i> L. (HYMENOPTERA:APIDAE) E SUA RELAÇÃO COM PESTICIDAS	21
3.1	INTRODUÇÃO	21
3.2	METODOLOGIA.....	22
3.2.1	Critérios de pesquisa, seleção e extração de dados.....	22
3.2.2	Análise de dados	23
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.4	CONCLUSÃO	38
4	INFLUÊNCIA DE ACIBENZOLAR-S-METÍLICO NA SOBREVIVÊNCIA E CAPACIDADE DE VOO DE FORRAGEIRAS DE <i>Apis mellifera</i> L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA	39
4.1	INTRODUÇÃO	39
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.2.1	Produto químico e <i>Apis mellifera</i>	40
4.2.2	Bioensaio 1: Acibenzolar-S-metílico incorporado a pasta Cândi	41
4.2.3	Bioensaio 2: Contato com superfície vítrea pulverizada com ASM	42
4.2.4	Bioensaio 3: Pulverização direta de Acibenzolar-S-metílico sobre <i>Apis mellifera</i>	43
4.2.5	Análise de capacidade de voo	44
4.2.6	Análises Estatísticas	45
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.4	CONCLUSÃO	50
5	UTILIZAÇÃO DE ACIBENZOLAR-S-METÍLICO PARA EXPRESSÃO DO GENE β-1,3-GLUCANASE EM SOJA	51
5.1	INTRODUÇÃO	51
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
5.2.1	Material vegetal: Soja	52
5.2.2	Extração de RNA e síntese de cDNA	53
5.2.3	RT-qPCR	56
5.2.4	Análises Estatísticas	57
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.4	CONCLUSÃO	59
6	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

Os polinizadores prestam um serviço ecossistêmico considerado imensurável, porém essencial para a manutenção da biodiversidade (BERINGER; MACIEL; TRAMONTINA, 2019), além de aumentar a produção de cultivos agrícolas (BLETTLER; FAGÚNDEZ; CAVIGLIA, 2018). Dentre estes, as abelhas são os principais polinizadores, com destaque *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) (PANDEY; GURR, 2019).

Com a intensificação da agricultura desde o século XIX, a utilização de agrotóxicos também foi aumentada e uma das consequências tem sido a diminuição da população e a mortalidade de abelhas (NOCELLI et al., 2012; SÁNCHEZ-BAYO; WYCKHUYS, 2019). A redução do número destes indivíduos tem ocasionado perdas ecológicas e econômicas (BERINGER; MACIEL; TRAMONTINA, 2019).

No Brasil, a intoxicação de colônias por agrotóxicos tem causado a elevada mortalidade de abelhas. O diagnóstico é de melgueira, ninhos e larvas normais, sem sinais visíveis de doenças e pragas, abelhas adultas mortas, aparentemente subitamente, dentro e fora das caixas e abelhas sobreviventes atordoadas e moribundas (KAHLOW et al., 2016).

Além da mortalidade, ainda há o sumiço de abelhas, que é conhecido como Desordem do Colapso de Colônias (DCC). O fenômeno é causado pelo uso de agrotóxicos e também pela falta de alimento, pragas apícolas, ondas eletromagnéticas e alterações climáticas (CAIRES; BARCELOS, 2017; GOULSON et al., 2015; ZORAN et al., 2019), dentre outros, porém sem uma causa específica ainda não determinada.

Os agrotóxicos ganham destaques nas pesquisas de efeitos sobre as abelhas e, além de estudos avaliando a sobrevivência destas, efeitos subletais também estão sendo avaliados (NOCELLI et al., 2012). Os inseticidas são a classe mais estudada, mas mesmo fungicidas (NEAL et al., 2019), herbicidas (MOTTA; RAYMANN; MORAN, 2018) e indutores de resistência (SILVA-NETO et al., 2018) podem causar efeitos adversos sobre estes organismos.

O uso de agrotóxicos além de trazer problemas ao ambiente e a organismos não-alvo, também põe em risco a saúde pública (CASSAL et al., 2014; MARCELINO; WACHTEL; GHISI, 2019). Com isso, a busca por meios de redução do uso de agrotóxicos é constante (MÜLLER, 2015).

No cultivo da soja utiliza-se grande quantidade de agrotóxicos e com isso tem forte influência no desequilíbrio de colônias (FREITAS; PINHEIRO, 2012). Quando há extensas áreas de monoculturas de soja, por exemplo, não há diversidade de espécies de flores (GAZZONI, 2017) e com isso, é comum encontrar forrageiras de *A. mellifera* nesta cultura sendo a espécie de maior abundância (PANDEY; GURR, 2019). Inclusive, provou-se que as abelhas na soja aumentam a produção e, quando mortas causam também perdas econômicas (CHIARI et al., 2008).

Uma das estratégias para redução do uso de agrotóxicos na soja, é a utilização de indutores de resistência a doenças e pragas. Utilizando um elicitor, é desencadeada a síntese de proteínas relacionadas a patogênese (FELIPINI; PIERO, 2013). Uma das formas de defesa envolvendo essas proteínas é o emprego de β -1,3 glucanases, as quais hidrolisam os β glucanos presentes na parede celular dos fungos, inclusive fitopatogênicos (FELIPINI; PIERO, 2013) reduzindo o uso de fungicidas.

Acibenzolar-S-metílico (ASM) é comumente utilizado como ativador, sendo recomendado para a cultura do feijão (AGROFIT, 2019). Seus efeitos em soja ainda são poucos estudados apesar de trabalhos recentes demonstrarem diminuição dos sintomas da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*). É necessário que a pesquisa na área seja aprofundada para entender quais rotas são ativadas e poder haver recomendações até para essa cultura, reduzindo o uso de fungicidas.

A redução do uso de fungicidas seria um fator a mais na contribuição para a sobrevivência de *A. mellifera*, porém, ainda não há estudos analisando os efeitos do Acibenzolar-S-metílico sobre essa espécie. É necessário que análises de sobrevivência, capacidade de voo, danos moleculares e fisiológicos sejam feitas a fim de evitar a mortalidade desta espécie ou uma possível desordem na colmeia.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos de agrotóxicos e Acibenzolar-S-metílico (ASM) em *A. mellifera* e a ação de ASM na indução de resistência em soja.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OS AGROECOSSISTEMAS E AS ABELHAS

Agroecossistemas são denominados como sendo ecossistemas naturais que foram modificados por intervenções humanas, mudando sua estrutura e funcionamento no objetivo de aumentar a produção agrícola (BIANCHI et al., 2006). Estes sistemas são compostos por processos energéticos e bioquímicos e estabelecem ciclos de energia, reestruturando os processos naturais e incorporando os recursos locais (NETO, 2011).

Os agroecossistemas dependem de polinizadores para aumentar a variabilidade genética de plantas fanerógamas, além de trazer benefícios para os produtores, aumentando o rendimento e a qualidade dos cultivos (BERINGER; MACIEL; TRAMONTINA, 2019; NOCELLI et al., 2012). As abelhas prestam esse serviço, sendo as principais e mais eficientes polinizadoras (HUNG et al., 2018; PANDEY; GURR, 2019).

Em áreas de cultivos agrícolas as abelhas em busca de alimento, involuntariamente auxiliam na produção de algodão, café, canola, cebola, citros girassol, maçã e soja (WITTER et al., 2014). A produtividade da canola aumenta em 50%, além de melhorar sua qualidade e conseqüentemente seu valor (BOMMARCO; MARINI; VAISSIÈRE, 2012).

A produtividade da cultura da soja pode aumentar em 18% na presença de abelhas (BLETTLER; FAGÚNDEZ; CAVIGLIA, 2018; CHIARI et al., 2008), já na maçã, o aumento da produtividade chega a 90% (KUTLU; ÖZDEMİR; GÜL, 2019). Mesmo assim, no Brasil, esse reconhecimento ainda não é dado a estes insetos, sendo mais conhecidas como produtoras de mel, do que como polinizadoras (WITTER et al., 2014).

2.2 *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)

A abelha *Apis mellifera* L. pertence a Classe Insecta, logo, possuem exoesqueleto e o corpo dividido em abdome, tórax e cabeça. Sua ordem é

Hymenoptera, isto é, possuem dois pares de asas membranosas, sendo as anteriores maiores que as posteriores (CHAPMAN, 2013; TAUTZ, 2010).

A cabeça possui um par de antenas, três olhos simples e dois compostos, e o aparelho bucal, do tipo lambedor. No tórax se encontram os dois pares de asas e três pares de pernas que, nas operárias, são adaptadas para o transporte de pólen e resinas (COUTO; COUTO, 2006; PEREIRA et al., 2003).

No abdome segmentar encontram-se órgãos do aparelho digestivo, circulatório, reprodutor, excretor, órgãos de defesa (ferrão) e glândulas produtoras de cera. Possuem metamorfose completa e são insetos sociais, vivendo em colônias formadas por uma rainha, operárias e zangões (LANDIM, 2009; PEREIRA et al., 2003).

As operárias são as mais numerosas, sendo responsáveis por todo o trabalho e manutenção da colmeia. As atividades das operárias são definidas através da necessidade da colônia, idade e desenvolvimento de glândulas responsáveis por cada etapa nas abelhas (COUTO; COUTO, 2006; WITTER et al., 2014). O forrageamento, busca por pólen e néctar no campo, é realizado por elas e, com isso, entram em contato com produtos no ambiente sendo, geralmente, estas encontradas mortas (NOCELLI et al., 2012; SILVINA et al., 2017; ZHU et al., 2015).

Os zangões são os indivíduos machos da colônia, estão presentes na colônia para o acasalamento e, após a cópula, morrem. Além disso, o número de zangões presentes na colônia é dependente da quantidade de alimento disponível (TAUTZ, 2010).

A rainha é a única reprodutora da colônia, responsável pela ordem social por meio da liberação de feromônios e pela oviposição após o voo nupcial (cópula entre a rainha e os zangões). A saúde e qualidade desta é de suma importância para a sobrevivência, crescimento, produtividade e organização da colônia (AMIRI et al., 2017; COUTO; COUTO, 2006; PEREIRA et al., 2003).

Apis mellifera é a abelha mais conhecida, sendo produtora de mel, pólen, geleia real, própolis e cera, além da polinização, sendo este seu serviço de maior valor econômico (CALDERONE, 2012; WITTER et al., 2014). Seu corpo, coberto de pêlos, é o responsável pela fixação e transporte dos grãos de pólen entre as flores (PEREIRA et al., 2003).

Cada subespécie de *A. mellifera* se adapta a sua região, desenvolvendo características próprias de resistência aquele meio (MALERBO-SOUZA;

NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2002). Essa espécie de abelha é generalista, visitando um grande número de flores de diferentes espécies vegetais. Possui ampla distribuição geográfica e, mesmo não sendo nativa americana, após sua introdução, se adaptou ao continente (WITTER et al., 2014).

A disseminação de *A. mellifera* na América foi rápida (MALERBO-SOUZA; NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2002), sendo que na América do Sul, as abelhas desta espécie são africanizadas. Isto ocorreu quando, em 1956 o pesquisador Dr. Kerr, trouxe enxames mais resistentes a doenças da África que, cruzaram com subespécies já existentes no Brasil, porém, bastante suscetíveis, originando as *A. mellifera* africanizadas (RAMOS; CARVALHO, 2007).

2.3 *Apis mellifera* E OS AGROTÓXICOS

Após a Segunda Guerra Mundial, a produção agrícola foi intensificada e, com a ação antrópica, os ecossistemas tem ficado cada vez mais comprometidos, frágeis, desequilibrados e artificiais (BIANCHI et al., 2006; MARTINEZ et al., 2017; NETO, 2011). Com isso, o manejo atual dos agroecossistemas põe em risco tanto a qualidade do ambiente como a capacidade produtiva do mesmo (SARANDÓN; FLORES, 2014).

A mortalidade e o desaparecimento das abelhas é uma das consequências dessa intensificação, tendo como principal causa o uso desenfreado de agrotóxicos. A pulverização destes produtos contaminam flores de áreas cultivadas e, consequentemente néctar e pólen coletados pelas abelhas durante o forrageamento (NOCELLI et al., 2012).

A contaminação do pólen ocorre até mesmo em áreas não agrícolas. Long e Krupke (2016), nos Estados Unidos identificaram 29 agrotóxicos em pólen coletado por abelhas em área onde não há interferência humana.

Após poucas horas de exposição aos agrotóxicos já é possível identificar mortalidade das abelhas (PEREIRA et al., 2019). Abelhas mortas dentro e fora da caixa, combinado com ausência de doenças e pragas visíveis são sintomas de mortalidade ocasionada por agrotóxicos e estão preocupando apicultores (KAHLOW et al., 2016).

Dessa forma, o declínio populacional das abelhas é crescente e perceptível

há anos (BERINGER; MACIEL; TRAMONTINA, 2019; NOCELLI et al., 2012). Alguns autores acreditam que os agrotóxicos são os principais causadores da Desordem do Colapso de Colônias (DCC), nome dado para o desaparecimento/declínio de colônias (RAVICHANDRA, 2018; SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014). Além dos agrotóxicos, há também outros fatores envolvidos como falta de alimento de qualidade, infecções parasitárias, fúngicas e bacterianas, manejo do apiário e alterações climáticas (CAIRES; BARCELOS, 2017; GOULSON et al., 2015; ZORAN et al., 2019).

O fenômeno de DCC foi relatado pela primeira vez em 2006, com relatos de declínios de até 50% (RAVICHANDRA, 2018). Desde então suas causas e efeitos ganharam destaques em várias pesquisas em muitos lugares do mundo (CAIRES; BARCELOS, 2017; COX-FOSTER et al., 2007; HENDRIKSMA; HARTEL; STEFFAN-DEWENTER, 2011; NOCELLI et al., 2012; PIRES et al., 2016; TAVARES et al., 2017; THANY et al., 2015).

Os agrotóxicos são classificados em inseticidas, herbicidas e fungicidas (FARIA; FASSA; FACCHINI, 2007). Dentre os inseticidas destacam-se organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, neonicotinoides e fenilpirazóis na causa de desaparecimento de abelhas (ELLIS, 2010) e também na mortalidade destas (IMRAN et al., 2018; WADE et al., 2019).

Neonicotinoides combinados com os outros fatores estão envolvidos com a DCC (FREITAS; PINHEIRO, 2012) e com a mortalidade das abelhas. Estes recebem destaques nas pesquisas sendo seus efeitos conhecidos por afetar o sistema nervoso central dos insetos, incluindo as abelhas. Nas abelhas, este grupo de inseticida afeta o olfato e a memória e, quando não causa mortalidade, provoca desorientação nas mesmas, e dificuldade no retorno a sua colmeia (RAVICHANDRA, 2018).

Organofosforados, são o segundo maior grupo de produtos químicos sintéticos, sendo usado em várias culturas agrícolas (MULLA et al., 2019). Este atua na transmissão sináptica como inibidores de acetilcolinesterase no sistema nervoso central e periférico, causando hiperexcitação e levando o inseto a morte (LANG et al., 2016).

Lambda-cialotrina, abamectina, spinosade, clorpirifós e benzoato de emamectina são alguns inseticidas utilizados na cultura do algodão. Todos, testados em *A. mellifera*, além de aumentar a mortalidade de operárias, diminuíram as

atividades de forrageamento das abelhas (ABDEL RAZIK, 2019).

Avaliando a mortalidade de *A. mellifera* para 42 agrotóxicos, Zhu et al. (2015) observaram mortalidade superior a 99% em 26 dos agrotóxicos pulverizados sobre estas abelhas. Apenas três deles causaram mortalidade inferior a 1%, mostrando o quão preocupante é a utilização de agrotóxicos em fase de floração.

Fungicidas (NEAL et al., 2019), herbicidas (MOTTA; RAYMANN; MORAN, 2018) e indutores de resistência (SILVA-NETO et al., 2018) podem causar a mortalidade de abelhas ou mesmo efeitos subletais.

Além do desaparecimento e da mortalidade, outras consequências ocasionadas pelos agrotóxicos aos insetos estão sendo estudadas, como estresse, doenças, comprometimento da fisiologia, e alterações do comportamento e estrutura social das abelhas. Neste caso, os agrotóxicos podem afetar todo o funcionamento das colônias e suas atividades ecossistêmicas e agrícolas (BERINGER; MACIEL; TRAMONTINA, 2019; NOCELLI et al., 2012).

A utilização de um novo inseticida, flupiradifurona, por exemplo, provocaram deficiências motoras em abelhas. A perturbação do comportamento motor exercem influências negativas no forrageamento e outras atividades que exigem voo (HESSELBACH; SCHEINER, 2019).

Pelo elevado uso de agrotóxicos, culturas como soja e milho tem forte influência no desequilíbrio de colmeias, em especial sobre *Apis mellifera* (FREITAS; PINHEIRO, 2012). Para evitar esses problemas, cita-se a modificação da forma de utilização, redução do uso dos agrotóxicos (BERINGER; MACIEL; TRAMONTINA, 2019) e estudos utilizando doses subletais para entender a reação de organismos não-alvo, sua biologia e adaptação em ecossistemas impactados e agroecossistemas (NOCELLI et al., 2012).

2.4 SOJA E *Apis mellifera*

A soja é uma planta cleistogâmica (polinizada e fecundada antes da abertura floral), mas, nem por isso a visita de polinizadores, incluindo abelhas, é impedida. As abelhas mediam a polinização cruzada quando visitam as flores buscando pólen e néctar para alimentar a colônia (GAZZONI, 2017). Assim, a presença desses insetos resulta no aumento do rendimento da produção (BLETTLER; FAGÚNDEZ;

CAVIGLIA, 2018; CHIARI et al., 2008; LAUTENBACH et al., 2012; MONASTEROLO et al., 2015), provavelmente decorrente da transferência de pólen de flores férteis para flores que ficam mais afastadas ou rebaixadas, que não possuem pólen viável (BLETTLER; FAGÚNDEZ; CAVIGLIA, 2018).

As abelhas buscam alimento na soja devido as grandes áreas de monocultura e falta de plantas melíferas com floração coincidente a desta cultura (GAZZONI, 2017). *Apis mellifera* é a espécie de abelha mais abundante encontrada na soja (MONASTEROLO et al., 2015; PANDEY; GURR, 2019) e o declínio populacional desse inseto acarreta perdas ecológicas e econômicas (BERINGER; MACIEL; TRAMONTINA, 2019).

A influência desses polinizadores na soja não é reconhecida pelos agricultores (FREITAS; PINHEIRO, 2012), porém, o incremento na produtividade seria verificado se os agrotóxicos não impedissem o estabelecimento de populações (WITTER et al., 2014). Estudos apontam que a presença de polinizadores pode aumentar em 37% a produtividade de soja, além de aumentar a qualidade dos grãos (BLETTLER; FAGÚNDEZ; CAVIGLIA, 2018; CHIARI et al., 2008; MONASTEROLO et al., 2015).

2.5 SOJA

A soja, *Glycine max* (L.) Merrill, é uma espécie de planta herbácea, incluída na classe Magnoliopsida (Dicotiledônea), ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, gênero *Glycine*. O provável progenitor da espécie é a *Glycine ussuriensis* (COSTA, 1996).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja com uma produção superior a 115 milhões de toneladas na safra 2018/2019 (CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019). Essa alta produção gera empregos, não se restringindo apenas aos produtores. Pessoas ligadas a cadeia produtiva, direta ou indiretamente, saem lucrando além de haver geração de renda antes, durante e após a sua produção (CASTRO; MIRANDA; LIMA, 2015).

Porém, a intensificação da produção agrícola trouxe com ela, entre outros, o avanço das monoculturas e o uso de agrotóxicos, o que acabou acelerando a degradação ambiental (NICODEMO et al., 2008). Logo, isso acabou diminuindo a

biodiversidade e simplificando os ecossistemas, que se tornaram desequilibrados (MARTINEZ et al., 2017). Com esse desequilíbrio, o surto de doenças e pragas se tornou constante, e para isso o uso de agrotóxicos tornou-se cada vez maior.

Este é um dos fatores que colocou o Brasil entre os maiores consumidores de agrotóxicos do mundo. Além de afetar o meio-ambiente e organismos não-alvo, os agrotóxicos também trazem danos a saúde pública quando usados erroneamente, podendo trazer efeitos agudos ou crônicos (CASSAL et al., 2014; MARCELINO; WACHTEL; GHISI, 2019).

Com isso e, evidenciando-se a responsabilidade ambiental e social que alguns produtores vem adquirindo, têm-se buscado alternativas para controlar ou evitar a incidência de patógenos e pragas nas lavouras, de forma a se obter um produto diferente do convencional (MÜLLER, 2015). Assim, se tratando de patógenos, o uso de fungicidas químicos pode trazer casos de resistência aos fungos e deixar de ser eficaz. Com isso, o uso de tecnologias alternativas as convencionais tem sido estudadas, como é o caso dos mecanismos endógenos de defesa da planta que podem ser induzidos por compostos exógenos (GADAGA et al., 2017).

2.6 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Naturalmente, as plantas possuem diversos mecanismos de defesa que permanecem inativos ou latentes até que haja uma ativação por agentes de indução que podem ser externos ou internos da própria planta (BARROS et al., 2010). Quando ocorre alguma perturbação, sendo ela um estresse biótico ou abiótico as plantas desencadeiam processos de defesa por meios físicos ou químicos para se proteger do problema (ALMEIDA et al., 2012; VANTINI et al., 2008).

Estudos recentes mostram eficiência em induzir a resistência em plantas à patógenos utilizando produtos que geram esses estresses, estes são chamados de eliciadores (MÜLLER, 2015). Elicidores são substâncias que induzem reações de defesa nas plantas e, após o reconhecimento de um sinal de estresse, se ligam a proteínas receptoras, disparando uma cascata de sinalização que, carregada pelo citoplasma chega ao núcleo da célula e ali é iniciado o processo de respostas de defesa. Dentre essas respostas estão: a alteração do fluxo de íons, síntese de

espécies reativas de oxigênio e a ativação de mensageiros secundários, que levam a ativação de fatores de transcrição e expressão de genes de defesa (RESENDE et al., 2006).

A expressão de genes varia entre genótipos, tecidos e estádios de desenvolvimento, sofrendo influência direta também de fatores externos (BAHRY; ZIMMER, 2014). Lipoxigenases, peroxidases, fenilalanina amônia-liase, quitinases e β -1,3-glucanases são algumas das enzimas marcadoras da indução de resistência (ALMEIDA et al., 2012).

Um dos mecanismos de defesa das plantas durante o processo de infecção é a síntese de proteínas relacionadas a patogênese, ou proteínas-PR para se defender da doença (FELIPINI; PIERO, 2013). A síntese destas talvez seja a mais evidente das alterações decorrentes da interação entre a planta e o patógeno (BARROS et al., 2010).

A ativação dos genes que induzem a síntese dessas proteínas ocorrem na última etapa do processo de sinalização desenvolvidos pelas células, chamado de tradução, onde se converte o sinal em respostas celulares específicas (RESENDE et al., 2006). Logo, a planta infectada ativa essas proteínas que compreendem inibidores de protease (que desativam as enzimas proteolíticas secretadas por agentes patogênicos) e enzimas líticas (β -1,3 glucanase e quitinase), que degradam as paredes celulares microbianas (CREELMAN; MULLET, 1997).

Campos et al. (2009), utilizando *Colletotrichum lindemuthianum* como indutor de resistência obtiveram resultados positivos observando a atividade de β -1,3 glucanase e quitinase aumentadas. A imersão de sementes de tomateiro em acibenzolar-S-metílico, por exemplo, apesar de não interferir no tombamento de plântulas de tomate, ativou as enzimas β -1,3 glucanase e quitinases, que são enzimas responsáveis pela indução de resistência (BERTONCELLI et al., 2015).

2.7 β -1,3-GLUCANASE

As proteínas PR são divididas em 17 famílias, com diversas funções, sendo na família PR-2, encontradas as β -1,3 glucanases. Estas são enzimas amplamente distribuídas em plantas e sementes que, além de estarem ligadas a defesa, sua presença em plantas saudáveis, possivelmente, as relaciona também aos processos

normais de desenvolvimento (GORJANOVIĆ, 2009).

Elas são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas do tipo β -1,3 e β -1,6 presentes em β -D-glucanas (BAUERMEISTER et al., 2010). O principal componente da parede celular dos fungos é a β -D-glucana (COSTA, 2008) e uma das formas de defesa que envolvem as proteínas-PR é o efeito direto, como, por exemplo com as β -1,3 glucanases que hidrolisam os β -D-glucanos presentes na parede celular dos fungos (FELIPINI; PIERO, 2013).

Genes β -1,3 glucanase estão diretamente ligados a elevados níveis de resistência. George et al. (2016) estudando a expressão de genes de *Piper colubrinum* (pimenta do reino) sob inoculação de *Phytophthora capsici* observaram um importante papel desempenhado por esse gene na ação de defesa das plantas.

O gene SGlu2, está possivelmente envolvido no processo de defesa das plantas contra fatores bióticos e abióticos (BAHRY; ZIMMER, 2014). Segundo Costa (2008) a expressão de β -1,3 glucanase foi aumentada durante a invasão de *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de *Phaseolus vulgaris* (feijão) independente do meio de cultivo utilizado.

Observando a resistência induzida por inoculação de *Colletotrichum spp.* na indução, Shi; Zhang; Shih, (2006) infectaram algumas plantas de morango com *Colletotrichum fragariae* e outras com *Colletotrichum acutatum*. Observaram aumento na expressão de genes de β -1,3 glucanase em diferentes momentos da infecção, com melhores resultados para *C. fragariae*.

Ainda sobre *Colletotrichum lindemuthianum* na indução, Campos et al. (2009), puderam confirmaram o aumento das enzimas β -1,3 glucanase e quitinase. Houve alta significância entre o índice de severidade da antracnose do feijão e a atividade dessas enzimas, sugerindo que a utilização de *C. lindemuthianum* tem potencial para controlar a doença.

O mesmo ocorre com *Brassica juncea* (mostarda-marrom), que após a infecção com *Alternaria brassicae*, aplicação de ácido salicílico e lesões propositalmente teve a atividade do gene nomeado BjPR2 (~99% semelhante com β -1,3 glucanase) aumentada rapidamente. O contrário ocorreu com a aplicação de ácido jasmônico que atrasou a atividade do gene (ALI et al., 2017).

Efeito oposto foi visualizado em soja, na qual a aplicação exógena de ácido jasmônico induziu a defesa das plantas ao ataque do nematoide das galhas (*Meloidogyne hapla* Chitwood (Tylenchida: Meloidogynidae)), aumentando a

atividade dos genes de quitinase e β -1,3 glucanase (HU et al., 2017). Segundo Mazaro et al. (2008), outro produto que pode ser utilizado como indutor é a quitosana, sendo essa tão eficiente que pode ser referência em outros trabalhos parecidos.

O uso de acibenzolar-S-metílico também se mostrou satisfatório na indução de resistência. Bertoncelli et al. (2015), utilizaram esse produto para tratar sementes de tomateiro por imersão e, obtiveram como resultados a ativação das enzimas quitinase e β -1,3 glucanase.

Para quantificar a expressão de genes de interesse, como de β -1,3 glucanase em diferentes situações utilizando amostras de RNA extraídos do organismo alvo, pode ser utilizada a PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica tem ganhado espaço por ser rápida, sensível e específica (NAVARRO et al., 2015).

2.8 PCR TEMPO REAL

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é uma metodologia *in vitro* desenvolvida nos anos 80 que sintetiza uma sequência de DNA mesmo com poucas quantidades disponíveis. Sua descoberta trouxe benefícios como o sequenciamento de genomas, expressão de genes, estudo da genética molecular, entre outros (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Com o avanço da ciência, buscando técnicas mais precisas, a PCR em tempo real surge e consegue quantificar a expressão gênica de maneira mais flexível e sensível (WANG; BROWN, 1999). Esta técnica, como o próprio nome sugere, monitora a PCR enquanto ela ocorre em tempo real e gera valores durante a fase exponencial, se tornando reproduzível (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A PCR em tempo real utiliza um termociclador com sistema ótico e fluoróforos, que são moléculas que proporcionam o acompanhamento da reação. A emissão dos corpos fluorescentes aumenta em proporção direta com a quantidade de produto da PCR e seus valores são gravados durante cada ciclo. Para isso é necessário um computador com software para aquisição de dados e análise final da reação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A utilização da PCR em tempo real ganhou espaço por ter excelente sensibilidade e especificidade, dados reproduzíveis, baixo risco de contaminação e

redução do tempo de execução (NAVARRO et al., 2015). Além da precisão, a técnica ainda exige menos mão de obra, é mais rápida e precisa na quantificação quando comparada a outros métodos PCR (HEID et al., 1996).

3 UMA PREOCUPAÇÃO GLOBAL: A MORTALIDADE DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) E SUA RELAÇÃO COM PESTICIDAS

3.1 INTRODUÇÃO

Com o crescimento da população humana aumenta a necessidade de polinização, porém, as espécies de polinizadores, como as abelhas estão diminuindo (GOULSON et al., 2015). Esta diminuição pode estar relacionado aos mais diversos fatores, tais como patógenos, pragas, pesticidas, falha da rainha, alterações climáticas, manejo inadequado da colmeia entre outros (DAI et al., 2019; GODFRAY et al., 2014; HENRY et al., 2012; MANNING; RAMANAIDU; CUTLER, 2018).

Nesse sentido, a exposição a pesticidas e a oferta de alimento contaminado prejudicam as respostas imunes das abelhas, tornando-as mais suscetíveis à doenças, pragas (DIAO et al., 2018; GOULSON et al., 2015) e outros problemas. Logo, os níveis de contaminação do ambiente com agrotóxicos são preocupantes, tanto para os seres humanos quanto para a segurança ambiental, na qual estão inseridas as abelhas (MARCELINO; WACHTEL; GHISI, 2019; TOSI; NIEH, 2017a).

Abelhas forrageadoras são as mais expostas aos produtos aplicados no ambiente e podem morrer devido ao contato com agrotóxicos ou podem, ainda, levar pólen ou néctar contaminado para sua colmeia (SILVINA et al., 2017). Isto pode ser tóxico a outras abelhas e até mesmo às larvas que serão alimentadas com aquele produto (ZHU et al., 2015).

Considerando a necessidade de polinização para aumento e/ou manutenção da produtividade agrícola, os interesses dos pesquisadores visam determinar as causas da mortalidade e do declínio de abelhas, em especial *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) (GOULSON et al., 2015). Estas informações são ainda mais importantes quando leva-se em consideração que cada pesticida age de uma maneira diferente e tem um nível específico de toxicidade aos organismos (ZHU et al., 2015).

Neste sentido, uma meta-análise é útil para combinar os resultados de diferentes estudos (HUA; BUREAU, 2012). Usando critérios matemáticos, cada estudo utilizado é ponderado de acordo com os dados fornecidos. Os resultados disponíveis são sintetizados e ajudam a formar uma conclusão sobre o assunto,

mesmo se houver resultados conflitantes, o que também permite uma análise de acordo com as informações disponíveis variadas, como metodologia, tratamentos e características dos indivíduos (BORENSTEIN et al., 2009).

Mesmo sabendo que *A. mellifera* é considerada um dos mais importantes polinizadores para as culturas agrícolas e selvagens (DAI et al., 2019; HUNG et al., 2018), não se tem estudos de meta-análise sobre a relação de pesticidas sobre estes insetos. Assim, este é o primeiro estudo a compilar as respostas da exposição de *A. mellifera* a diferentes pesticidas de diferentes maneiras, usando uma revisão meta-analítica.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Critérios de pesquisa, seleção e extração de dados

A pesquisa foi realizada no ISI Web of Science (<http://www.webofscience.com>). O script booleano utilizado foi "TOPIC: ("pesticide*" OR "herbicide*" OR "insecticide*" OR "fungicide*" OR "resistance inductor") AND TOPIC: ("selectivity*" OR "*toxicity*") AND TÓPICO: ("mortality*" OR "survival*") AND TOPIC: (*Apis mellifera*)". A pesquisa incluiu artigos publicados de 1951 a junho de 2019. Os estudos selecionados continham dados de sobrevivência ou mortalidade de *A. mellifera* submetida a produtos químicos fitossanitários em dias ou horas. Foram desconsiderados artigos que não continham o número de abelhas amostradas, utilizaram outras espécies que não *A. mellifera* para avaliação, que submeteram as abelhas apenas a produtos naturais ou biológicos, ou avaliaram somente doses letais ou efeitos subletais. Foi elaborado uma tabela contendo as seguintes informações: DOI, Autores, metodologia utilizada no experimento, estágio de vida das abelhas, ingrediente ativo ao qual foram submetidas, seu grupo químico e uso.

Para a extração do número de abelhas vivas e mortas, padronizou-se a coleta de dados de 240 horas e, quando esse não era avaliado, o número que mais se aproximava foi utilizado. O método meta-analítico pode considerar apenas um tratamento para cada grupo controle. Nesse sentido, ao testar doses múltiplas, a dose média foi empregada. Quando a mortalidade ou sobrevivência foi apresentada

em valor médio ou porcentagem, transformou-se em números reais de acordo com o número de abelhas utilizadas, conforme descrito na metodologia.

3.2.2 Análise de dados

Após a obtenção dos dados, a tabela foi submetida ao programa MetaWin, utilizando dados binários e Odds Ratio (como tamanho dos efeitos) para análise de média e desvio padrão. Em seguida foram separados por cada categoria, de acordo com a metodologia (pulverização, contato, ingestão e semi-campo), fase de vida (adulto ou pupa) e grupo químico (neonicotinoides, piretroides, carbamatos, inorgânicos, organofosforado, alquil sulfito, formamidina, biperidil, sulfoxamina, anilida, triazóis isoftalonitrila, fenilpirazóis, piriproxifena, espinosinas e diacilhidrazinas). Como os dados não apresentaram homogeneidade quando testados efeitos fixos, considerou-se efeitos aleatórios.

Para verificar a presença de viés de publicação, os dados foram explorados testando os métodos de Kendall e Spearman, que são mais sensíveis a um menor número de estudos, e testaram o valor obtido pelo método de Rosenthal para o "N à prova de falhas". Para Kendall e Spearman, uma correlação significativa ($p < 0,05$) indica um viés de publicação. Um gráfico de funil foi gerado para explorar visualmente os dados, no entanto, é essencial interpretar os dados numéricos de acordo com os valores gerados pelos métodos acima.

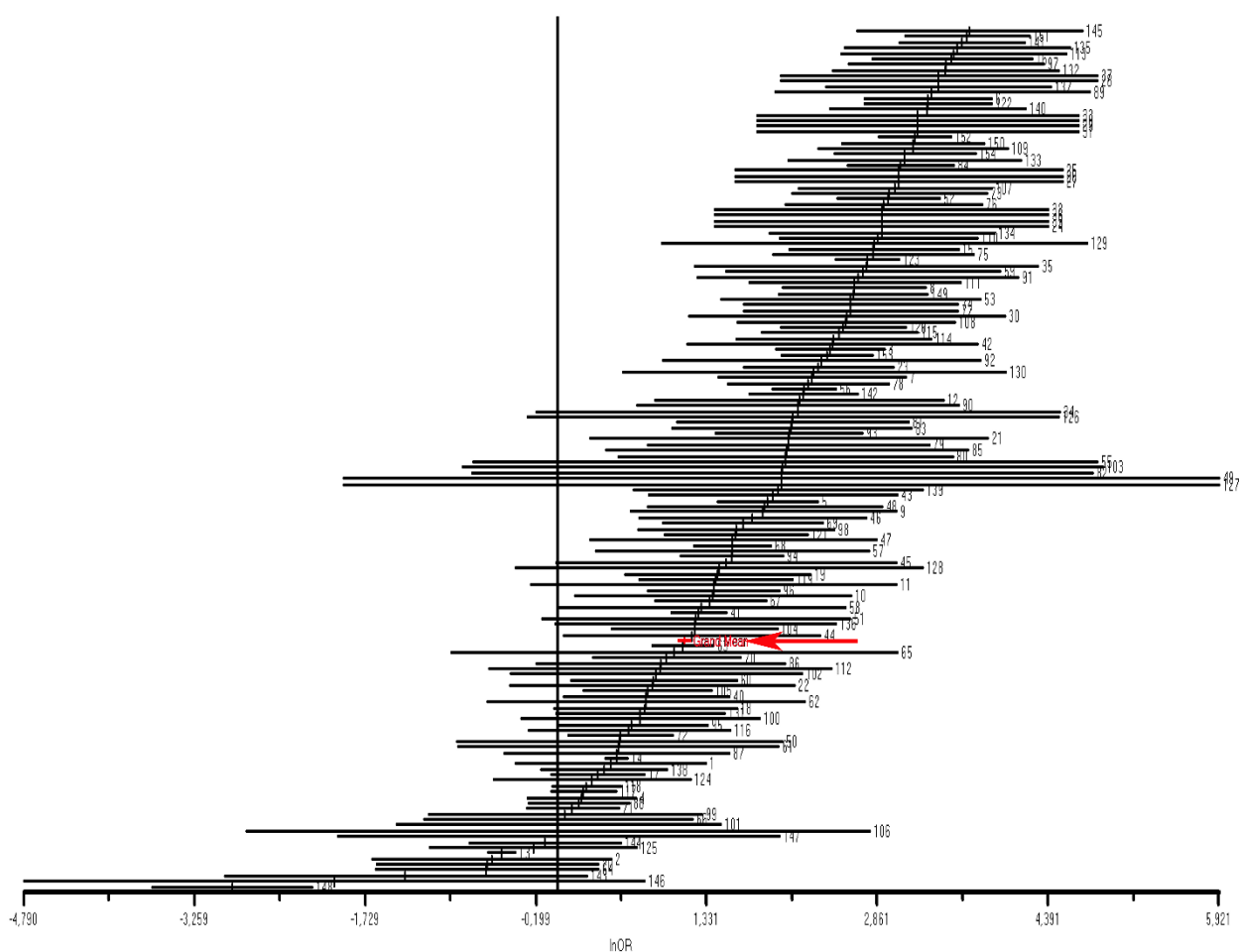
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 538 artigos foram encontrados nas bases de dados Principal Coleção do Web of Science, Derwent Innovations Index, KCI - Base de dados de periódicos coreanos, Russian Science Citation Index e SciELO Citation Index. Após refinamento manual, 82 publicações foram elencadas, resultando em 154 conjuntos de dados (Tabela 1). A metodologia de exposição mais utilizada foi a ingestão, os insetos na fase adulta ganharam maior destaque e os inseticidas foram as substâncias mais testadas.

Utilizando o modelo de efeitos aleatórios, pode-se afirmar que há diferença significativa entre os grupos tratado e controle, uma vez que na Grande Média o

intervalo de confiança de 95% não inclui zero ($E + 1,814$; IC = 1,5925 a 2,0361). Isso significa que o número de abelhas mortas nos grupos expostos a pesticidas é maior que o número de abelhas mortas no controle (Figura 1).

Figura 1 - Forest plot de estudos avaliando a influência de pesticidas na sobrevivência de *Apis mellifera*, organizados pelo tamanho dos efeitos. Nota: o estimador da Odds Ratio (tamanho dos efeitos = OR) e o intervalo de confiança (IC) de 95% de cada experimento incluído na meta-análise são apresentados. O número próximo às barras representa o número de referência de cada experimento, conforme mostrado na Tabela 1. A Grande Média é o tamanho médio geral dos efeitos de todos os estudos.



Fonte: Autoria própria, 2020.

Tabela 1 - Número de referência de cada estudo na meta-análise, citação da referência, metodologia utilizada, estágio de vida das abelhas no estudo, grupo químico e função do pesticida utilizado em cada estudo.

ID	Citação	Metodologia	Ciclo		
			de vida	Grupo químico	Função
1	(YANG et al., 2019)	Alimentação	Adultos	Formamidina	Acaricidas

2	(YANG et al., 2019)	Alimentação	Adultos	Organofosforado	Inseticidas
3	(YANG et al., 2019)	Alimentação	Adultos	Organofosforado	Inseticidas
4	(NEAL et al., 2019)	Alimentação	Adultos	Isoftalonitrila	Fungicidas
	(ZHU; YAO;				
5	ADAMCZYK, 2018)	Pulverização	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
6	(MIN et al., 2019)	Contato	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
7	(MIN et al., 2019)	Contato	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
8	(MIN et al., 2019)	Contato	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
9	(DAI et al., 2019)	Alimentação	Larvas	Organofosforado	Inseticidas
10	(DAI et al., 2019)	Alimentação	Larvas	Neonicotinoide	Inseticidas
11	(DAI et al., 2019)	Alimentação	Larvas	Organofosforado	Inseticidas
12	(DAI et al., 2019)	Alimentação	Larvas	Neonicotinoide	Inseticidas
13	(BERG et al., 2018)	Semi-campo	Adultos	Dicarboximida	Fungicidas
14	(CHENG et al., 2018)	Semi-campo	Adultos	Sulfoxamina	Inseticidas
15	(DAI et al., 2018a)	Alimentação	Larvas	Isoftalonitrila	Fungicidas
16	(DAI et al., 2018a)	Alimentação	Larvas	Benzoiluréia	Inseticidas
	(WONG; ID;				
17	BERENBAUM, 2018)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
	(MOTTA; RAYMANN;				
18	MORAN, 2018)	Alimentação	Adultos	Organofosforado	Herbicidas
	(ABRAHAM et al.,				
19	2018)	Contato	Adultos	Organofosforado	Herbicidas
20	(RIVA et al., 2018)	Alimentação	Adultos	Carbamatos	Inseticidas
21	(DAI et al., 2018b)	Alimentação	Larvas	Organofosforado	Herbicidas
22	(SHI et al., 2018)	Alimentação	Adultos	Benzimidazole	Fungicidas
23	(DIAO et al., 2018)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
24	(IMRAN et al., 2018)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
25	(IMRAN et al., 2018)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
26	(IMRAN et al., 2018)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
27	(IMRAN et al., 2018)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
28	(IMRAN et al., 2018)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
29	(IMRAN et al., 2018)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
30	(IMRAN et al., 2018)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas

31	(IMRAN et al., 2018)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
32	(IMRAN et al., 2018)	Contato	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
33	(IMRAN et al., 2018)	Contato	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
34	(IMRAN et al., 2018)	Contato	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
35	(IMRAN et al., 2018)	Contato	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
36	(IMRAN et al., 2018)	Contato	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
37	(IMRAN et al., 2018)	Contato	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
38	(IMRAN et al., 2018)	Contato	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
39	(IMRAN et al., 2018)	Contato	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
40	(YAO et al., 2018)	Alimentação	Adultos	Organofosforado	Inseticidas
41	(LIAO et al., 2018)	Alimentação	Adultos	Piretroide	Inseticidas
42	(SIMON-DELISO et al., 2018)	Alimentação	Adultos	Anilida	Fungicidas
43	(DAI et al., 2018c)	Alimentação	Larvas	Formamidina	Acaricidas
44	(DAI et al., 2018c)	Alimentação	Larvas	Organofosforado	Acaricidas
45	(DAI et al., 2018c)	Alimentação	Larvas	Piretroide	Acaricidas
46	(FISHER et al., 2018)	Contato	Adultos	Diacil-hidrazinas	Inseticidas
47	(FISHER et al., 2018)	Contato	Adultos	Piriproxifen	Inseticidas
48	(FISHER et al., 2018)	Contato	Adultos	Bifenazates	Inseticidas
49	(HESSELBACH; SCHEINER, 2018)	Alimentação	Adultos	Butenolides	Inseticidas
50	(OVERMYER et al., 2018)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
51	(OVERMYER et al., 2018)	Alimentação	Larvas	Neonicotinoide	Inseticidas
52	(MIGDAŁ et al., 2018)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
53	(WERNECKE et al., 2017)	Pulverização	Adultos	Piretroide	Inseticidas
54	(WERNECKE et al., 2017)	Pulverização	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
55	(WERNECKE et al., 2017)	Pulverização	Adultos	Triazol	Fungicidas
56	(COULON et al., 2017)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas

	2017)				
	(MATTOS; SOARES;				
57	TARPY, 2017)	Alimentação	Adultos	Bipiridilos	Herbicidas
	(MATTOS; SOARES;				
58	TARPY, 2017)	Alimentação	Adultos	Bipiridilos	Herbicidas
	(MATTOS; SOARES;				
59	TARPY, 2017)	Alimentação	Adultos	Bipiridilos	Herbicidas
	(SGOLASTRA et al.,				
60	2017)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
61	(TOSI et al., 2017)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
62	(TOSI et al., 2017)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
63	(LIAO et al., 2017)	Contato	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
	(MANNING et al.,				
64	2017)	Contato	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
	(MANNING et al.,				
65	2017)	Contato	Adultos	Triazol	Fungicidas
	(MANNING et al.,				
66	2017)	Contato	Adultos	Spinosinas	Inseticidas
67	(PARIS et al., 2017)	Alimentação	Adultos	Fenilpirazol	Inseticidas
	(SÁNCHEZ-BAYO;				
	BELZUNCES;				
68	BONMATIN, 2017)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
	(DOMINGUES et al.,				
69	2017)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
	(TAVARES et al.,				
70	2017)	Alimentação	Larvas	Neonicotinoide	Inseticidas
71	(FRIOL et al., 2017)	Alimentação	Larvas	Neonicotinoide	Inseticidas
	(GRILLONE et al.,				
72	2017)	Alimentação	Larvas	Neonicotinoide	Inseticidas
	(RASULI; RAFIE;				
73	SADEGHI, 2017)	Pulverização	Adultos	Organofosforado	Inseticidas
	(RASULI; RAFIE;				
74	SADEGHI, 2017)	Pulverização	Adultos	Carbamates	Inseticidas

	(RASULI; RAFIE;					
75	SADEGHI, 2017)	Pulverização	Adultos	Propargites		Acaricidas
	(RASULI; RAFIE;					
76	SADEGHI, 2017)	Pulverização	Adultos	Neonicotinoide		Inseticidas
	(RASULI; RAFIE;					
77	SADEGHI, 2017)	Pulverização	Adultos	Inorganics		Fungicidas
78	(ZHU et al., 2017)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide		Inseticidas
79	(ZHU et al., 2017)	Alimentação	Adultos	Organofosforado		Inseticidas
80	(ZHU et al., 2017)	Alimentação	Adultos	Piretroide		Inseticidas
81	(ZHU et al., 2017)	Alimentação	Adultos	Carbamates		Inseticidas
82	(ZHU et al., 2017)	Alimentação	Adultos	Triazol		Fungicidas
83	(ZHU et al., 2017)	Alimentação	Adultos	Organofosforado		Herbicidas
84	(ZHU et al., 2017)	Alimentação	Adultos	Sulfoxamine		Inseticidas
85	(ABBO et al., 2017)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide		Inseticidas
	(SIMON-DELSO et					
86	al., 2017)	Alimentação	Larvas	Anilida		Fungicidas
	(SGOLASTRA et al.,					
87	2016)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide		Inseticidas
	(RUEPPELL et al.,					
88	2017)	Contato	Adultos	Bipiridilos		Herbicidas
89	(CHEN et al., 2017)	Pulverização	Adultos	Neonicotinoide		Inseticidas
90	(CHEN et al., 2017)	Pulverização	Adultos	Spinosinas		Inseticidas
91	(CHEN et al., 2017)	Pulverização	Adultos	Organofosforado		Inseticidas
92	(CHEN et al., 2017)	Pulverização	Adultos	Neonicotinoide		Inseticidas
	(LIAO; WU;					
93	BERENBAUM, 2017)	Alimentação	Adultos	Piretroide		Inseticidas
94	(LÓPEZ et al., 2017)	Alimentação	Larvas	Organofosforado		Inseticidas
95	(LÓPEZ et al., 2017)	Alimentação	Larvas	Neonicotinoide		Inseticidas
96	(LÓPEZ et al., 2017)	Alimentação	Larvas	Piretroide		Inseticidas
	(HESKETH et al.,					
97	2016)	Alimentação	Adultos	Organofosforado		Inseticidas
	(HESKETH et al.,					
98	2016)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide		Inseticidas

99	(HESKETH et al., 2016)	Alimentação	Adultos	Triazol	Fungicidas
100	(HESKETH et al., 2016)	Alimentação	Adultos	Piretroide	Inseticidas
101	(HESKETH et al., 2016)	Alimentação	Adultos	Aryloxyalkanoic Acid	Herbicidas
102	(CHEN et al., 2016)	Alimentação	Adultos	Piriproxifen	Inseticidas
103	(DUSSAUBAT et al., 2016)	Semi-campo	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
104	(ALKASSAB; KIRCHNER, 2016)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
105	(DÉMARES et al., 2016)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
106	(RENZI et al., 2016)	Alimentação	Adultos	Fenil Pirazol	Inseticidas
107	(RASULI; RAFIE; SADEGHI, 2017)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
108	(RASULI; RAFIE; SADEGHI, 2017)	Alimentação	Adultos	Dimetil Carbamato	Inseticidas
109	(RASULI; RAFIE; SADEGHI, 2017)	Alimentação	Adultos	Organofosforado	Inseticidas
110	(RASULI; RAFIE; SADEGHI, 2017)	Alimentação	Adultos	Propargites	Inseticidas
111	(RASULI; RAFIE; SADEGHI, 2017)	Alimentação	Adultos	Inorgânico	Fungicidas
112	(DOUBLET et al., 2015)	Alimentação	Larvas	Neonicotinoide	Inseticidas
113	(SCHMEHL et al., 2014)	Alimentação	Adultos	Organofosforado	Inseticidas
114	(NAKASU et al., 2014)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
115	(NAKASU et al., 2014)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
116	(AUFAUVRE et al., 2014)	Alimentação	Adultos	Fenil Pirazol	Inseticidas

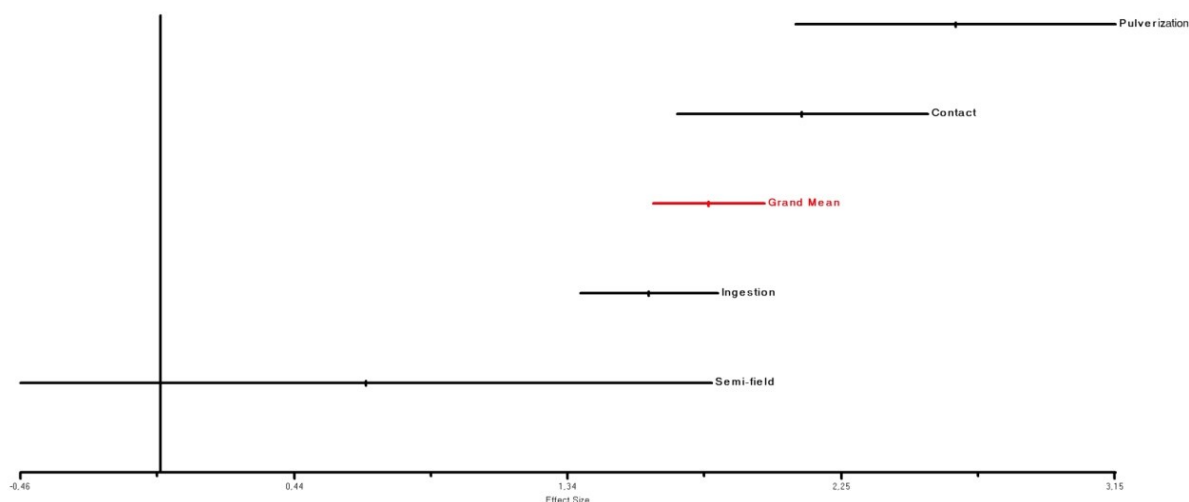
	2014)				
	(FORKPAH et al.,				
117	2014)	Alimentação	Adultos	Diacil-hidrazinas	Inseticidas
	(FORKPAH et al.,				
118	2014)	Alimentação	Adultos	Piretroide	Acaricidas
119	(ZHU et al., 2014)	Alimentação	Larvas	Organofosforado	Acaricidas
120	(COSTA et al., 2014)	Alimentação	Adultos	Benzoylphenylurea	Inseticidas
121	(COSTA et al., 2014)	Pulverização	Adultos	Pyriproxyfen	Inseticidas
122	(COSTA et al., 2014)	Contato	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
123	(BOILY et al., 2013)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
	(WILLIAMSON;				
124	WRIGHT, 2013)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
	(WILLIAMSON;				
125	WRIGHT, 2013)	Alimentação	Adultos	Organofosforado	Acaricidas
	(DAHLGREN et al.,				
126	2012)	Pulverização	Adultos	Formamidina	Acaricidas
	(DAHLGREN et al.,				
127	2012)	Pulverização	Adultos	Organofosforado	Acaricidas
	(DAHLGREN et al.,				
128	2012)	Pulverização	Adultos	Piretroide	Inseticidas
	(DAHLGREN et al.,				
129	2012)	Pulverização	Adultos	METI	Acaricidas
	(HENDRIKSMA;				
	HARTEL; STEFFAN-				
130	DEWENTER, 2011)	Alimentação	Larvas	Organofosforado	Inseticidas
131	(VIDAU et al., 2011)	Alimentação	Adultos	Phenylpyrazoles	Inseticidas
	(LAURINO et al.,				
132	2011)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
	(LAURINO et al.,				
133	2011)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
	(LAURINO et al.,				
134	2011)	Contato	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas
135	(LAURINO et al.,	Contato	Adultos	Neonicotinoide	Inseticidas

	2011)					
	(LAURINO et al.,					
136	2011)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide		Inseticidas
	(LAURINO et al.,					
137	2011)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide		Inseticidas
138	(AL AUX et al., 2010)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide		Inseticidas
	(THOMAZONI et al.,					
139	2009)	Semi-campo	Adultos	Piretroide		Inseticidas
140	(AKCA et al., 2009)	Contato	Adultos	Carbamates		Inseticidas
	(YASSINE et al.,					
141	2009)	Alimentação	Adultos	Phenylpyrazoles		Inseticidas
	(AUPINEL et al.,					
142	2007)	Alimentação	Larvas	Organofosforado		Inseticidas
143	(BAILEY et al., 2005)	Contato	Adultos	Carbamates		Inseticidas
	(LADURNER et al.,					
144	2005)	Contato	Adultos	Dicarboximides		Fungicidas
	(SHARMA; ABROL,					
145	2005)	Contato	Adultos	Piretroide		Inseticidas
	(MONCHARMONT et					
146	al., 2003)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide		Inseticidas
	(MONCHARMONT et					
147	al., 2003)	Alimentação	Adultos	Piretroide		Inseticidas
	(DECOURTYE;					
	LACASSIE; PHAM-					
148	DELÈGUE, 2003)	Alimentação	Adultos	Neonicotinoide		Inseticidas
	(VANDEMBERG;					
149	SHIMANUKI, 1990)	Contato	Adultos	Formamidina		Acaricidas
				Carbamato de		
150	(MASON, 1986)	Pulverização	Adultos	naftilmetila		Inseticidas
151	(MURRAY, 1985)	Pulverização	Adultos	Organofosforado		Inseticidas
	(MOFFETT;					
	MORTON;					
152	MACDONALD, 1972)	Pulverização	Adultos	Bipiridilos		Herbicidas

	(ANDERSON; TUFT,				
153	1952)	Contato	Adultos	Organofosforado	Inseticidas
154	(MENKE, 1951)	Contato	Adultos	Organofosforado	Inseticidas

Em relação à metodologia de exposição, a pulverização foi a metodologia com a maior média, ficando mais distante de zero (Figura 2). Embora a metodologia de semi-campo não tenha diferido significativamente do controle, a grande média apresentou um intervalo de confiança de 95% de 1,6270 a 1,9956 e para o teste de heterogeneidade $Q = 178,3989$ ($df = 152$, $p = 0,07050$). Assim, abelhas expostas a pesticidas por testes de pulverização, de contato ou ingestão são mais afetados do que indivíduos não expostos a pesticidas.

Figura 2 - Forest plot de estudos avaliando a influência de pesticidas na sobrevivência de *Apis mellifera*, organizados por tamanho de efeito e agrupados pela metodologia utilizada.



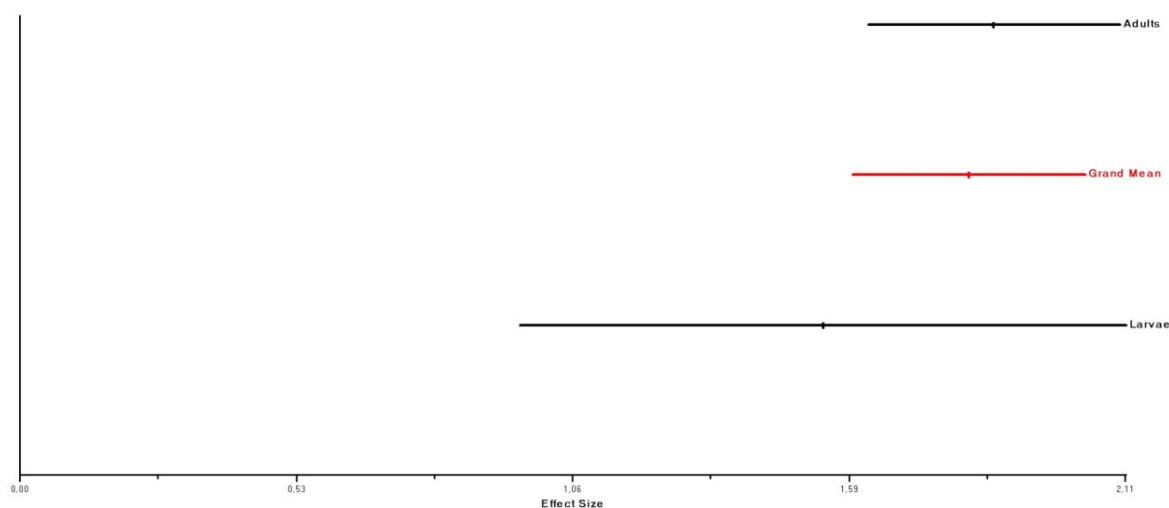
Fonte: Autoria própria, 2020.

Uma comparação das taxas de mortalidade em diferentes estágios da vida revelou que as abelhas adultas apresentam uma média mais alta e são as mais afetadas (Figura 3); no entanto, as larvas também mostraram uma diferença significativa na taxa de mortalidade e a sobrevivência também foi reduzida na presença dos pesticidas. A grande média apresenta IC 95% 1,5788 to 2,0224 e o teste de heterogeneidade $Q = 121.9456$; $df = 151$, $p = 0.96029$.

Quanto ao grupo químico, sulfito de alquila, inorgânicos, organofosforado, neonicotinoides, bipirilideos, sulfoxamina, formamidina, piretroides, fenilpirazóis e

carbamatos apresentaram diferença significativa quanto ao número de abelhas sobreviventes após 240 horas de exposição, sendo a maioria destes grupos referentes a inseticidas e acaricidas. Os outros pesticidas não apresentaram diferença significativa quanto a sobrevivência de abelhas do grupo controle e tratado (Figura 4). Para o teste de heterogeneidade foi encontrado $Q = 129,2183$; $df = 139$, $p = 0,71253$ e um valor de intervalo de confiança a 95% de 1,6105 até 2,0404, ou seja, os dados são homogêneos neste parâmetro.

Figura 3 - Forest plot de estudos avaliando a influência de pesticidas na sobrevivência de *Apis mellifera*, organizados por tamanho de efeito e agrupados por estágio de vida em que as abelhas foram submetidas a tratamento.

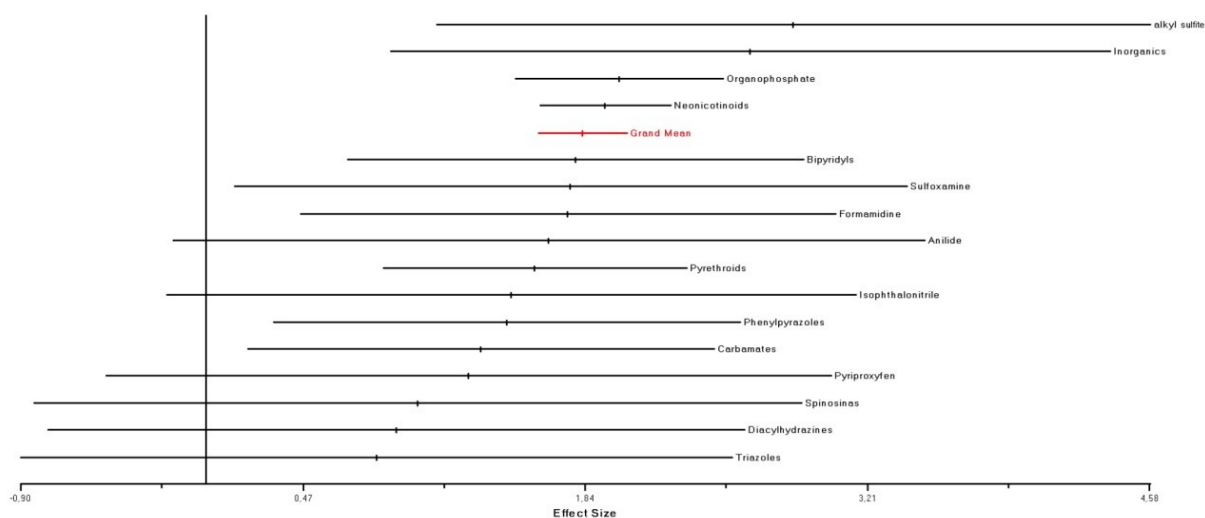


Fonte: Autoria própria, 2020

Os inseticidas foram os pesticidas mais testados nos estudos analisados e também causaram a maior mortalidade nas abelhas, quando comparado aos demais produtos (Figura 5). Este fato gerou um resultado significativo para o teste de heterogeneidade ($Q = 139,5797$; $df = 150$, $p = 0,71817$) e um valor de IC de 95% de 1,5943 a 2,0103.

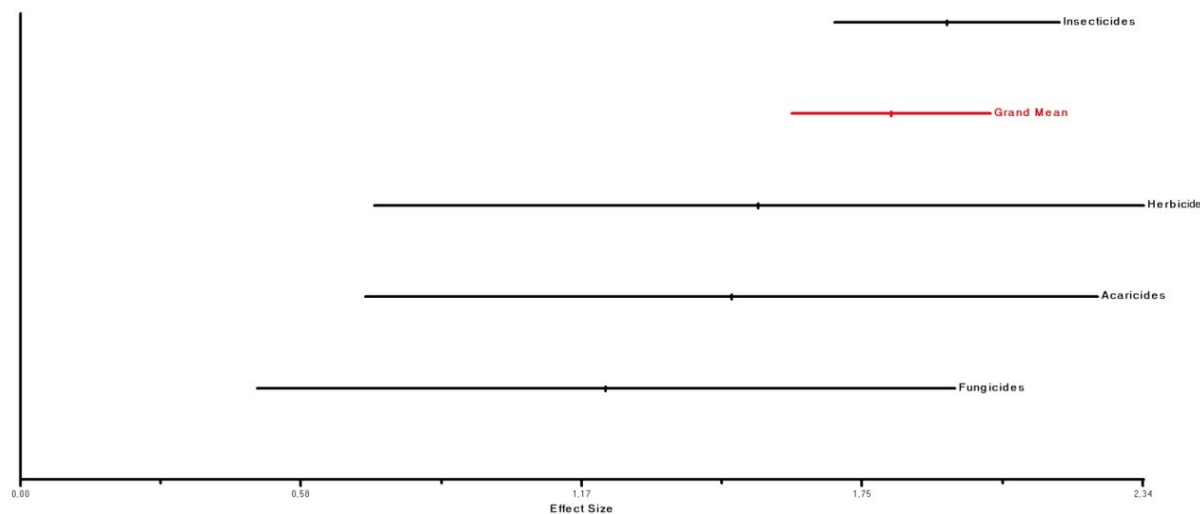
Quanto a análise de viés de publicação, pelo método de Kendall's Tau foi encontrada uma probabilidade de 0,01795, enquanto, pelo método de Spearman 0,05911. Rosenthal's Method apresentou um valor de 153485,9 e Orwin's Method apontou 712,0 estudos faltantes.

Figura 4 - Forest plot de estudos que avaliam a influência de pesticidas na sobrevivência de *Apis mellifera*, organizados por tamanho de efeito e agrupados por grupo químico do ingrediente ativo testado.



Fonte: Autoria própria, 2020.

Figura 5 - Forest plot de estudos avaliando a influência de pesticidas na sobrevivência de *Apis mellifera*, organizados por tamanho de efeito e agrupados por função agrícola.



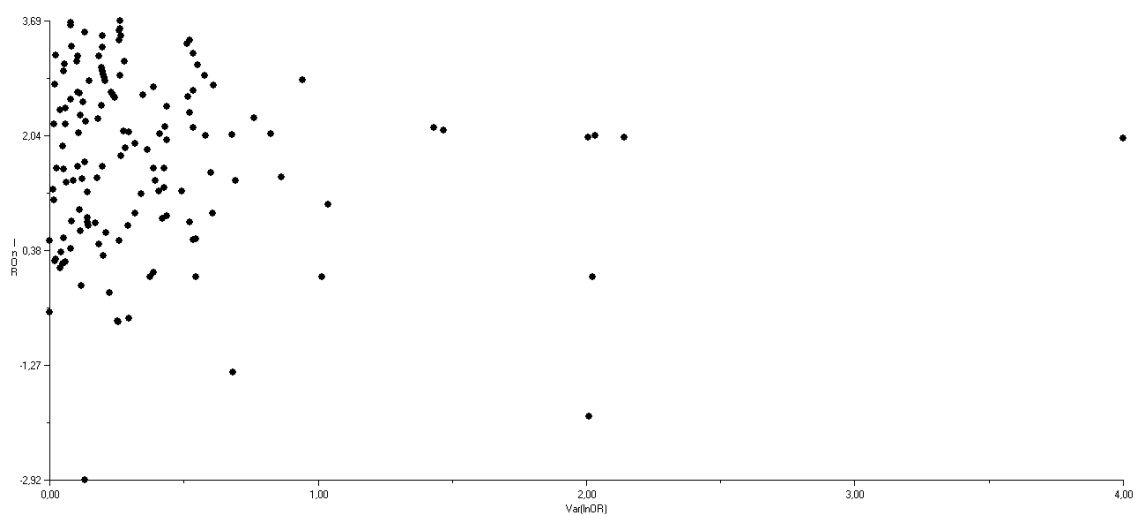
Fonte: Autoria própria, 2020.

O gráfico de funil (Figura 6) foi feito para estimar o viés de publicação, mas é mais efetivo avaliá-lo através de dados numéricos, como pelos métodos de Kendall's Tau e Spearman. Esses resultados apresentaram probabilidades de 0,01795 e 0,05911, respectivamente, mostrando disparidade nos resultados. De acordo com o método Kendall's Tau, existe viés de publicação ($p < 0,05$). No entanto, pelo método

de Spearman, falhamos em rejeitar a hipótese nula de que não há viés de publicação ($p > 0,05$). Ambos, são utilizados com frequência para amostras pequenas.

Assim, usando o método de Rosenthal para validação dos trabalhos estudados, foi calculado um valor "N à prova de falhas" de 153485,9, que é um valor alto e, portanto, seguro, porque 153.486 estudos seriam necessários para "anular" o efeito, o que mostra o quão real é a mortalidade de *A. mellifera* frente a pesticidas.

Figura 6 - Gráfico de funil para análise de viés de publicação, com tamanho de efeito no eixo X e tamanho ou variação da amostra no eixo Y.



Fonte: Autoria própria, 2020.

A maioria dos conjuntos de dados apresentou diferença significativa entre o grupo controle e tratado, sendo, este último, o que causou maior mortalidade para *A. mellifera*. Independentemente da metodologia utilizada, ingrediente ativo, grupo químico e função do pesticida testado, os pesticidas, de maneira geral tem acarretado mortalidade de abelhas melíferas. Esses resultados são preocupantes, uma vez que as abelhas estão em contato com esses pesticidas no meio ambiente.

Nos Estados Unidos, o pólen coletado pelas abelhas, mesmo em áreas não agrícolas, foi encontrado contaminado com 29 pesticidas, incluindo fungicidas, herbicidas e inseticidas, sendo muito semelhante ao número de pesticidas encontrados no pólen coletado nas áreas de milho de sementes tratadas (31). Embora nesta área, a concentração desses contaminantes seja muito maior (LONG; KRUPKE, 2016). Mais de 50% dos pesticidas são altamente tóxicos para as

abelhas, enquanto 62% dos inseticidas testados por Zhu et al. (2015) (n = 42) mataram mais de 99% das abelhas, enquanto apenas três mataram menos de 1%.

Nossos resultados corroboram com os encontrados por Costa et al. (2014), que testaram diferentes produtos com diferentes metodologias laboratoriais e identificaram a pulverização como sendo a metodologia de maior impacto negativo para *A. mellifera*. Este resultado, porém contrasta aos resultados de Imran et al. (2018), que verificaram a maior mortalidade de *A. mellifera* pela metodologia de contato em folhas úmidas, devido ao contato direto, ainda em sua concentração máxima.

Quando os dados são analisados de acordo com o estágio de vida das abelhas expostas, pode-se concluir que a sobrevivência de larvas e adultos é significativamente reduzida por agrotóxicos. A mortalidade média é maior para adultos, o que causa ainda mais preocupação pelo fato de saírem da colônia, podendo se contaminar facilmente (SILVINA et al., 2017).

As abelhas adultas forrageadoras são as mais expostas a pesticidas e podem ser contaminadas direta e indiretamente desde o momento em que procuram pólen e néctar no campo (pulverização direta ou contato com superfícies contaminadas), até a alimentação (pólen ou néctar contaminado) (ZHU et al., 2015).

Na revisão meta-analítica dividida em grupos químicos, houve uma redução significativa na longevidade de *A. mellifera* entre o grupo tratado e o grupo controle. Os sulfitos de aquila, inorgânicos, organofosforados, neonicotinoides, bipirilídeos, sulfoxamina, formamidina, piretroides, fenilpirazóis e carbamatos causam a maior interferência negativa, em ordem decrescente.

As moléculas que apresentaram maior risco para os insetos não-alvo em questão foram aquelas pertencentes ao grupo organofosforado. Esses agentes neurotóxicos atuam na transmissão sináptica como inibidores da acetilcolinesterase no sistema nervoso central e periférico (LANG et al., 2016), o que está relacionado à alta mortalidade em abelhas. Este grupo é o segundo maior grupo de produtos químicos sintéticos usados em diferentes culturas agrícolas para controlar insetos, ervas daninhas e doenças (MULLA et al., 2019).

Esses pesticidas estão em contato com as abelhas no ambiente. Por exemplo, o pólen coletado das áreas agrícolas dos Estados Unidos pelas abelhas forrageiras está contaminado com diferentes pesticidas, especialmente níveis mais altos de piretroides (LONG; KRUPKE, 2016). Na Itália, análises de 53 apiários

revelaram que a contaminação por clorpirifós (organofosforado) era mais comum (30% do total), enquanto o imidaclopride (neonicotinoide) foi encontrado nos níveis mais altos (Quociente de Perigo = 5054) no pólen coletado por *A. mellifera* (TOSI et al., 2018).

O uso de acefato (organofosforado), tiametoxam e clotianidina (neonicotinoides) são comuns por sua ação ocorrer tanto por contato como sistêmico, controlando insetos sugadores. Esses pesticidas, juntamente com alguns piretroides são químicos altamente tóxicos as abelhas (ZHU et al., 2015), vindo de encontro aos resultados obtidos nesta meta-análise.

Os resultados meta-analíticos revelaram as maiores taxas médias de mortalidade de abelhas quando os pesticidas foram usados. Isso ocorre porque a fisiologia dos insetos pragas e a fisiologia dos insetos não-alvo são muito semelhantes (BERG et al., 2018). Esses dados são consistentes com resultados anteriores de que 26 de vários pesticidas causaram taxas de mortalidade acima de 99%, incluindo os inseticidas organofosfatos e neonicotinoides comumente usados. No entanto, apenas um herbicida, um miticida e um neonicotinoide, causaram taxas de mortalidade de abelhas inferiores a 1% (ZHU et al., 2015).

É possível verificar vários estudos e pesquisas sobre a relação, os efeitos e o impacto de pesticidas sobre abelhas. Essas pesquisas ocorrem nos mais variados países da África (ABDEL RAZIK, 2019; ABRAHAM et al., 2018), América do Norte (NEAL et al., 2019; ZHU; YAO; ADAMCZYK, 2018), América do Sul (SANTOS et al., 2018), Ásia (DAI et al., 2019; YANG et al., 2019), Europa (HESSELBACH; SCHEINER, 2019; SIEDE et al., 2018) e Oceania (LIAO et al., 2018).

Neste trabalho, apenas dados de *A. mellifera* foram utilizados porque esta espécie é um bom bioindicador e pode ser usado como substituto de teste para avaliação de riscos ambientais (isto é, alertando antecipadamente o risco de morte de outras espécies de abelhas mais sensíveis) (ARENA; SGOLASTRA, 2014). Além disso, nos últimos anos, a mortalidade de *A. mellifera* tem crescido muito, sendo observadas abelhas mortas perto das colônias, além de traços de pesticidas nas amostras analisadas (SINDIVEG, 2017).

O uso de inseticidas químicos sintéticos tem sido investigado como um dos fatores mais relevantes para a ocorrência de Desordem do Colapso das Colônias (DCC). A DCC é identificada pelo desaparecimento das abelhas sem a presença destes insetos mortos perto das colônias (KAPLAN, 2012). O contato entre as

abelhas e os pesticidas presentes nas flores ou em outros locais pode causar problemas relacionados à orientação e perda da capacidade de voo, comprometendo a colônia (AMARO; GODINHO, 2012; CATAE et al., 2018; TOSI; NIEH, 2017b; WOLFF; REIS; SANTOS, 2008).

O declínio de abelhas teve início logo após a introdução do DDT (diclorodifeniltricloroetano) na agricultura, o primeiro pesticida moderno (ELLIS; EVANS; PETTIS, 2010). As práticas agrícolas atuais devem levar em consideração a sustentabilidade e buscar a redução do uso de pesticidas, assim, populações afetadas poderiam se recuperar (SÁNCHEZ-BAYO; WYCKHUYS, 2019).

Devido aos benefícios significativos das abelhas para a vida no planeta, há uma necessidade de orientação para reduzir o uso de pesticidas ou a substituição por grupos químicos que sejam seletivos a estes, como o uso de agentes de controle biológico (LIBARDONI et al., 2018; POTRICH et al., 2018). Também é importante notar que não existem apenas efeitos letais causados por pesticidas como investigados neste trabalho, mas também efeitos subletais, os quais são dignos de estudo. Avaliações da aprendizagem olfativa, capacidade de voo, análise de danos no DNA e avaliações histológicas são importantes para a sobrevivência de *A. mellifera* e, conseqüentemente, as atividades nas quais elas estão envolvidos.

3.4 CONCLUSÃO

As abelhas são afetadas pela presença de pesticidas, dada a diferença significativa nos valores médios nas categorias analisadas. A sobrevivência de *A. mellifera* é reduzida, independentemente do estágio da vida, da maneira como entram em contato com pesticidas, de seus grupos químicos e de sua função. Portanto, há relação direta entre a mortalidade de *A. mellifera* e o uso de pesticidas.

4 INFLUÊNCIA DE ACIBENZOLAR-S-METÍLICO NA SOBREVIVÊNCIA E CAPACIDADE DE VOO DE FORRAGEIRAS DE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) AFRICANIZADA

4.1 INTRODUÇÃO

Abelhas possuem elevada importância nos agroecossistemas, sendo responsáveis pela produção e qualidade de vários produtos agrícolas por meio da polinização (WITTER et al., 2014). Esses insetos estão expostos a diferentes fatores, os quais têm comprometido seus serviços. Dentre os fatores destaca-se a falta de alimento de qualidade, presença de pragas e patógenos apícolas, falha no manejo do apiário, alterações climáticas e exposição aos agrotóxicos (CAIRES; BARCELOS, 2017; GOULSON et al., 2015; ZORAN et al., 2019).

Os agrotóxicos têm ganhado ênfase por serem aplicados diretamente nas colmeias e também nas culturas em fase de floração (NEAL et al., 2019). Dessa forma, durante o forrageamento, em busca de pólen e néctar das flores, abelhas acabam se contaminando com esses produtos, acarretando em problemas à colônia (NOCELLI et al., 2012; YANG et al., 2019).

Apis mellifera L. (Hymenoptera: Apidae) é um dos principais polinizadores (DAI et al., 2019; HUNG et al., 2018), sendo responsável pelo aumento da produtividade de cultivos, inclusive da soja (CHIARI et al., 2008; CUNNINGHAM-MINNICK; PETERS; CRIST, 2019; LAUTENBACH et al., 2012). Aproximadamente 70% dos estudos toxicológicos de agrotóxicos sobre abelhas realizados no Brasil focam nessa espécie (NOCELLI et al., 2012).

A morte de *A. mellifera* ocasionada pela utilização de agrotóxicos já é conhecida e bastante estudada (DAHLGREN et al., 2012; MIN et al., 2019; MURRAY, 1985; NEAL et al., 2019; RASULI; RAFIE; SADEGHI, 2017; YANG et al., 2019; ZHU; YAO; ADAMCZYK, 2018). O que vem ganhando ênfase em estudos é a análise da seletividade de doses subletais e seus efeitos sobre *A. mellifera* e suas colônias (ABDEL RAZIK, 2019; HESSELBACH; SCHEINER, 2019; YANG et al., 2019). Assim, estudos toxicológicos são relevantes para descoberta do nível de adaptação das abelhas e da seletividade dos agrotóxicos a estas em ecossistemas impactados ou em agroecossistemas (NOCELLI et al., 2012).

Em estudo de campo, avaliando o efeito de agrotóxicos na visitação floral de abelhas em tomateiro, Silva-Neto et al. (2018), obtiveram resultados desfavoráveis para a qualidade dos frutos tratados com Acibenzolar-S-metílico (ASM), sendo estes os com menor número de sementes, massa e tamanho de fruto. Estes resultados podem estar relacionados com a repelência ou mortalidade de abelhas, uma vez que a polinização aumenta a qualidade dos frutos.

Acibenzolar-S-metílico é um produto de efeitos ainda desconhecidos para as abelhas (SILVA-NETO et al., 2018), dessa maneira, tendo em vista sua utilização como indutor de resistência, torna-se importante realizar testes toxicológicos avaliando a segurança da utilização deste produto, em especial em culturas visitadas por abelhas.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes concentrações de ASM na sobrevivência e na capacidade de voo de *A. mellifera*, em diferentes metodologias de exposição.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Produto químico e *Apis mellifera*

O produto químico utilizado nos bioensaios foi o ativador de plantas Bion 500 WG®. Seu uso é recomendado de forma preventiva como indutor de resistência, tendo como princípio ativo o Acibenzolar-S-metílico (ASM). Para os experimentos foram preparados os seguintes tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2 - Siglas dos tratamentos de acordo com a quantidade de Acibenzolar-S-metílico utilizado, sendo 100% a dose recomendada pelo fabricante para a cultura do feijão (25g/100L).

Tratamento	Concentração (% do valor recomendado para campo)	Ingrediente ativo/100L
T1 (água destilada esterilizada)	0%	0g
T2 (ASM)	20%	5g
T3 (ASM)	40%	10g
T4 (ASM)	60%	15g
T5 (ASM)	80%	20g
T6 (ASM)	100%	25g

Para todos os bioensaios as abelhas foram acondicionadas em gaiolas de PVC com 20 cm de altura × 15 cm de Ø. As gaiolas foram alocadas em sala climatizada ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12h).

As operárias forrageiras de *A. mellifera* africanizadas foram obtidas a partir de coletas realizadas na entrada de colmeias do apiário experimental da UNEPE Apicultura da UTFPR - DV. As abelhas que chegavam do campo foram capturadas em gaiolas de PVC sendo, posteriormente, cobertas com tecido *voile* e transportadas ao Laboratório de Controle Biológico I, mantidas em sala climatizada até a montagem de cada bioensaio.

4.2.2 Bioensaio 1: Acibenzolar-S-metílico incorporado a pasta Cândi

As abelhas forrageiras foram anestesiadas com CO_2 por 120 segundos e transferidas para gaiolas de PVC em grupos de 20 indivíduos. Pasta Cândi (açúcar e mel) sem tratamento (T1 - testemunha) e com tratamento (T2, T3, T4, T5 e T6) foram alocados sobre o *voile* e fixados com este, juntamente foi incluído algodão embebido com água.

O alimento foi preparado separadamente por tratamento, sendo adicionado 3 mL de cada solução na mistura de açúcar com mel. Cada tratamento foi composto por cinco repetições de 20 insetos, totalizando 100 insetos por tratamento. O bioensaio foi alocado em sala climatizada e o número de abelhas mortas foi avaliado às 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a disponibilização do alimento incorporado (Fotografia 1).

Fotografia 1 - Gaiolas de PVC, contendo 20 abelhas forrageiras de *A. mellifera* africanizada disposta em sala de criação ($26 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12h).



Fonte: Autoria própria, 2020.

4.2.3 Bioensaio 2: Contato com superfície vítrea pulverizada com ASM

Placas de Petri de vidro, previamente higienizadas e autoclavadas (15 cm de diâmetro \times 1,5 cm de altura), receberam 290 μL dos tratamentos (volume baseado na área da placa na qual a solução foi pulverizada em relação ao volume de calda por hectare) pulverizados com aerógrafo Pneumatic Sagyma[®] acoplado a uma bomba Tecnal[®] (TE-058) de pressão constante (1,2 kgf/cm) contendo laterais protegidas (Fotografia 2). As placas foram dispostas em câmara de fluxo unidirecional laminar (VECO) para a evaporação completa da água.

As abelhas forrageiras foram anestesiadas com CO_2 , por 120 segundos, e separadas em grupos de dez insetos, por placa tratada. Estas foram mantidas em sala climatizada por duas horas, mantendo-se as abelhas em contato com os tratamentos (Fotografia 3). Em seguida, vinte abelhas (duas placas) de cada tratamento foram transferidas para gaiolas de PVC identificadas, onde receberam alimento (pasta Cândi: açúcar e mel) e água (algodão umedecido). Os demais procedimentos foram os mesmos descritos no bioensaio 1.

Fotografia 2 - Pulverização de 290 μ L da calda diretamente sobre as abelhas separadas em grupos de dez em cada caixa gerbox.



Fonte: Autoria própria, 2020.

Fotografia 3 - Abelhas forrageiras em contato com o tratamento pulverizado em superfície vítrea por duas horas.



Fonte: Autoria própria, 2020.

4.2.4 Bioensaio 3: Pulverização direta de Acibenzolar-S-metílico sobre *Apis mellifera*

As abelhas coletadas foram anestesiadas com CO₂ por 120 segundos e transferidas, em grupos de dez insetos, para caixas gerbox (11 x 11 x 3,5 cm) limpas e previamente esterilizadas em luz UV por 20 minutos. Cada grupo/caixa recebeu pulverização de 290 μ L da calda do seu tratamento feita com aerógrafo Pneumatic Sagyma® acoplado a uma bomba Tecnal® (TE-058) de pressão constante (1,2

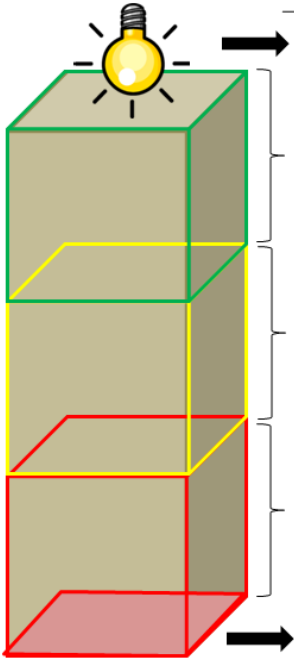
kgf/cm²) (Fotografia 2).

As operárias, após pulverização, foram transferidas para gaiolas de PVC em grupos de vinte abelhas de cada tratamento, onde receberam alimento (pasta Cândi: açúcar e mel) e água (algodões umedecidos). Os demais procedimentos foram os mesmos descritos no bioensaio 1.

4.2.5 Análise de capacidade de voo

Após 48 horas do início do experimento, 30 abelhas tratadas como descrito no bioensaio 2 (contato), foram submetidas a análise de capacidade de voo, onde foi possível avaliar a capacidade de deslocamento vertical (15 abelhas) e retomada ao voo (15 abelhas) quando em queda livre. Esse bioensaio foi realizado em sala escura, com uma torre de voo (35 cm x 35 cm de largura e 105 cm de altura), contendo uma fonte luminosa no topo e uma fita métrica em seu interior (Figura 7). A partir da marcação da fita, foi possível classificar cinco estratos, descritos na Figura 10 adaptado de Tomé et al. (2015).

Figura 7 - Ilustração da torre de voo e classificação dos estratos de acordo com o comportamento das abelhas nos testes de queda e voo.



Estrato	Deslocamento vertical	Retomada de voo
V	Voo até a fonte luminosa	Voo direto a luz/não há queda
IV	Deslocamento máximo entre 70 e 105 cm	Queda com retomada de voo entre 70 e 105
III	Deslocamento máximo entre 35 e 70 cm	Queda com retomada de voo entre 35 e 70
II	Deslocamento máximo entre 1 e 35 cm	Queda com retomada de voo entre 1 e 35
I	Permanência em 0 cm/não ocorrência de deslocamento	Queda direta a base/sem retomada de voo

Fonte: Autoria própria, 2020.

Para análise de capacidade de voo, as abelhas foram liberadas, individualmente na base da torre, e seu deslocamento avaliado por um minuto, marcando o estrato máximo atingido. Posteriormente as abelhas foram descartadas. Para a queda livre, as abelhas foram liberadas do topo da torre e analisada a altura em que a abelha conseguiu retomar o voo para a fonte luminosa.

4.2.6 Análises Estatísticas

Para os dados de longevidade das operárias de *A. mellifera*, foi realizada análise de sobrevivência usando Kaplan-Meier. Os tratamentos foram comparados usando o teste de log-rank e a análise completa foi realizada utilizando o pacote de sobrevivência (THERNEAU, 2015) do software R.

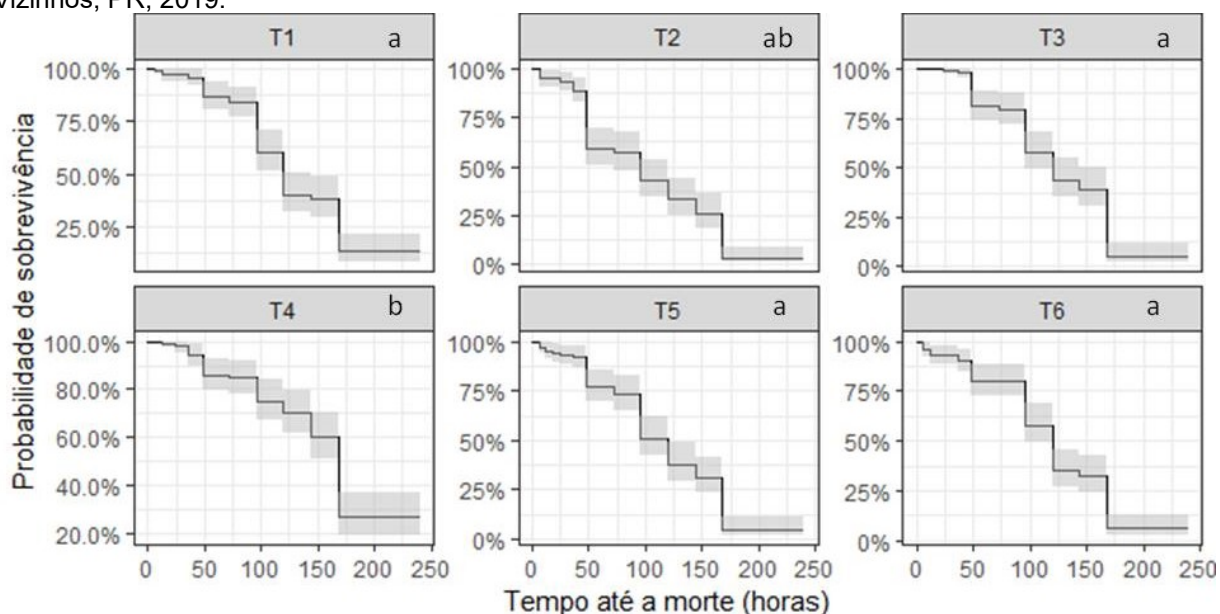
Para o Bioensaio de capacidade de voo foram utilizados Modelos Lineares Generalizados, regressão ordinal, através do teste de Wald (Qui-quadrado), utilizando-se o software R, pacote ordinal.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve redução na sobrevivência de forrageiras de *A. mellifera* quando alimentadas com pasta Cândi contendo ASM nas concentrações de 20%, 40%, 80% e 100% comparando à testemunha (Gráfico 1). A sobrevivência média das forrageiras de *A. mellifera* quando alimentadas com pasta Cândi pura foi de 130,2 horas e no grupo tratado com dose de campo foi de 117,6 horas. Porém, o grupo tratado com 60% da dose recomendada (T4) teve sua sobrevivência reduzida (99,4 horas).

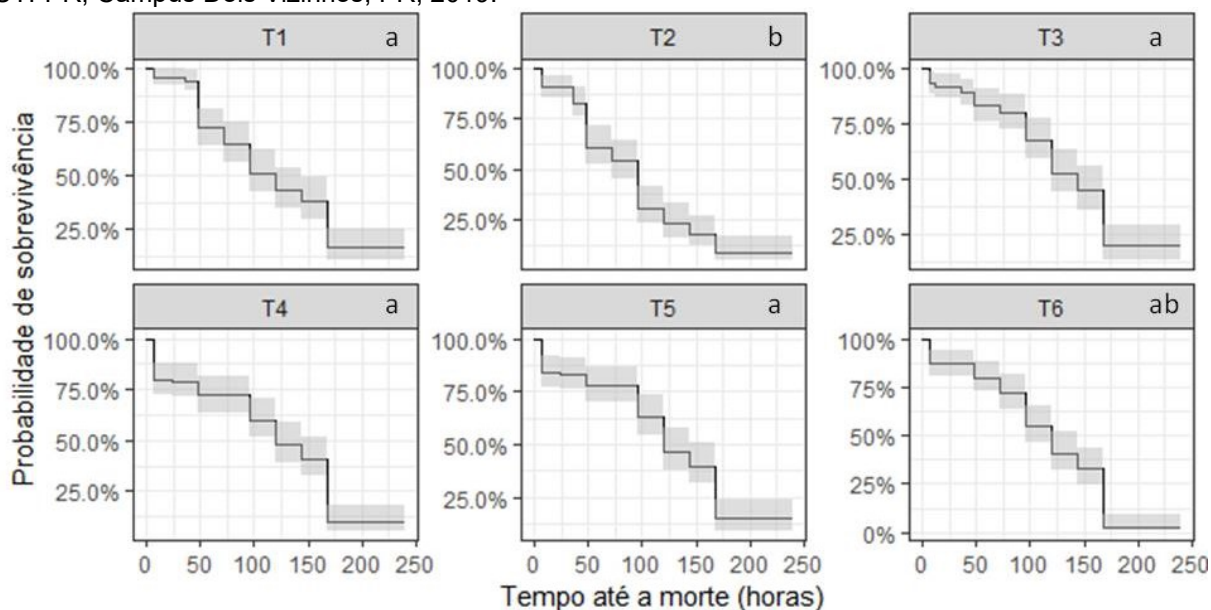
Forrageiras que entraram em contato com superfície tratada com ASM na concentração de 20% também tiveram sua sobrevivência reduzida (94,6 horas) quando comparadas as provenientes do grupo testemunha (Gráfico 2). As forrageiras oriundas do grupo testemunha sobreviveram em média 122,1 horas e as abelhas do tratamento com dose de campo (T6 - 100%) tiveram 112,1 horas de sobrevivência média.

Gráfico 1 - Sobrevivência de forrageiras de *Apis mellifera* africanizada alimentadas com pasta Cândi incorporada com doses de Acibenzolar-S-metílico, por Kaplan-Meier ajustada aos tempos (horas). Onde: T1-0% (controle), T2-20%, T3-40%, T4-60%, T5-80%, T6-100% da dose recomendada. Temperatura de 27 ± 2 °C, U. R. de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12/12h C/E. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2019.



Fonte: Autoria própria, 2020.

Gráfico 2 - Sobrevivência de forrageiras de *Apis mellifera* africanizada quando em contato com superfície vítrea pulverizada com diferentes doses de Acibenzolar-S-metílico, por Kaplan-Meier ajustada aos tempos (horas). Onde: T1-0% (controle), T2-20%, T3-40%, T4-60%, T5-80%, T6-100% da dose recomendada. Temperatura de 27 ± 2 °C, U. R. de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12/12h C/E. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2019.



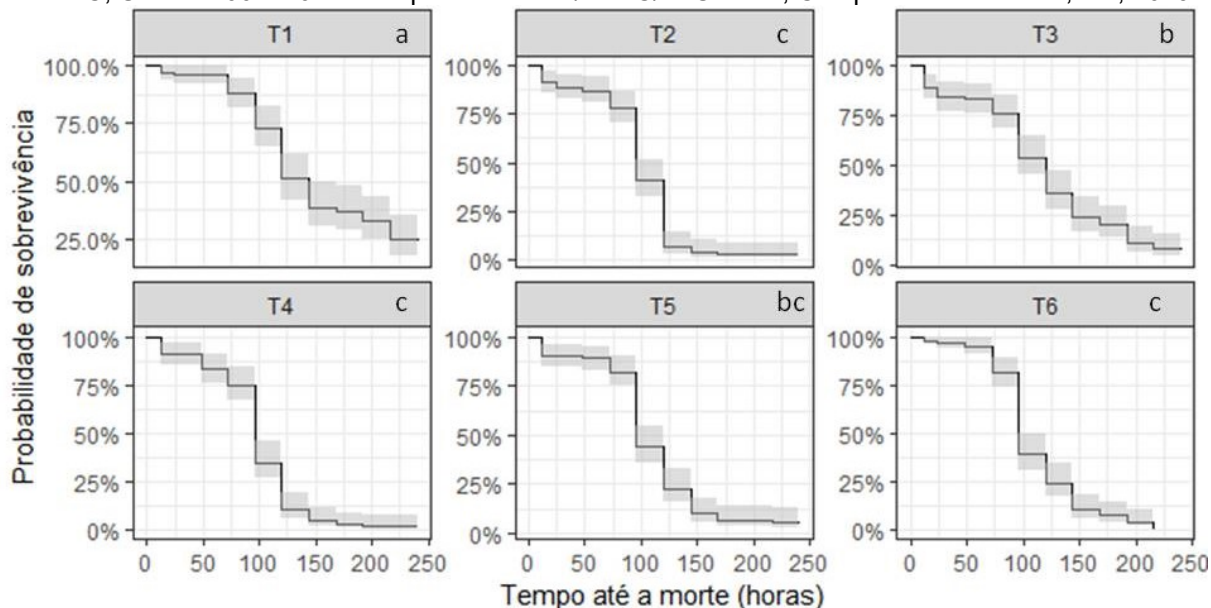
Fonte: Autoria própria, 2020.

A pulverização direta de ASM sobre forrageiras causou redução na

sobrevivência das operárias desde as doses mais baixas (20%) até a dose de campo (100%) (Gráfico 3). Nesta metodologia as abelhas do grupo controle sobreviveram em média 152,7 horas, e as provenientes dos demais tratamentos, no máximo, 117,7 horas (T3 - 40%) de sobrevivência média, reduzindo significativamente o tempo de vida dos insetos. A pulverização com 60% da dose de campo (T4) foi a mais invasiva, reduzindo a sobrevivência média de *A. mellifera* em 96,6 horas.

O uso de ASM tende a diminuir a utilização de fungicidas, uma vez que este ativa a resistência das plantas contra doenças fúngicas. Deve-se levar em consideração que alguns fungicidas reduzem significativamente a sobrevivência de *A. mellifera*, mesmo quando ingeridos (DAI et al., 2018a), enquanto ASM causou pouca ou nenhuma redução quando comparado as abelhas que se alimentaram de Pasta Cândi sem o produto.

Gráfico 3 - Sobrevivência de forrageiras de *Apis mellifera* africanizada após pulverização direta de diferentes doses de Acibenzolar-S-metílico por Kaplan-Meier ajustada aos tempos (horas). Onde: T1-0% (controle), T2-20%, T3-40%, T4-60%, T5-80%, T6-100% da dose recomendada. Temperatura de 27 ± 2 °C, U. R. de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12/12h C/E. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2019.



Fonte: Autoria própria, 2020.

Quando não letal, os fungicidas diminuem a resistência das abelhas a patógenos tornando-as mais suscetíveis a infecções virais (NEAL et al., 2019; SHI et al., 2018). Além disso, alteram sua atividade, diminuindo seus movimentos (TADEI et al., 2019).

A utilização de fungicidas, como clorotalonil, utilizado repetidamente na dieta de larvas de *A. mellifera* reduziu significativamente a sobrevivência deste inseto (DAI et al., 2018a). O mesmo ingrediente ativo (clorotalonil) diminuiu a resistência, imunidade, nutrição e desenvolvimento de forrageiras de *A. mellifera* (NEAL et al., 2019).

O carbendazim, outro fungicida, também prejudica a resposta imune e desintoxicação de forrageiras de *A. mellifera* (SHI et al., 2018). Boscalid, também utilizado como fungicida, reduz o tempo de vida de abelhas adultas de *A. mellifera* em até 78% (SIMON-DELSO et al., 2018). Já a utilização de ASM na alimentação de adultos de *A. mellifera* reduziu apenas 10% do tempo de sobrevivência destes insetos.

Outro efeito dos fungicidas que deve ser considerado, é quando utilizado junto com inseticidas, por exemplo. Wernecke et al. (2017), observaram que, há um efeito sinérgico, no qual a redução da desintoxicação de abelhas causada pelos fungicidas potencializa a toxicidade dos inseticidas, reduzindo a sobrevivência de *A. mellifera*. ASM não foi testado em associação com inseticidas na presente pesquisa, entretanto, é uma sinergia que deverá ser estudada em futuros trabalhos pois poderá vir a ocorrer no ambiente.

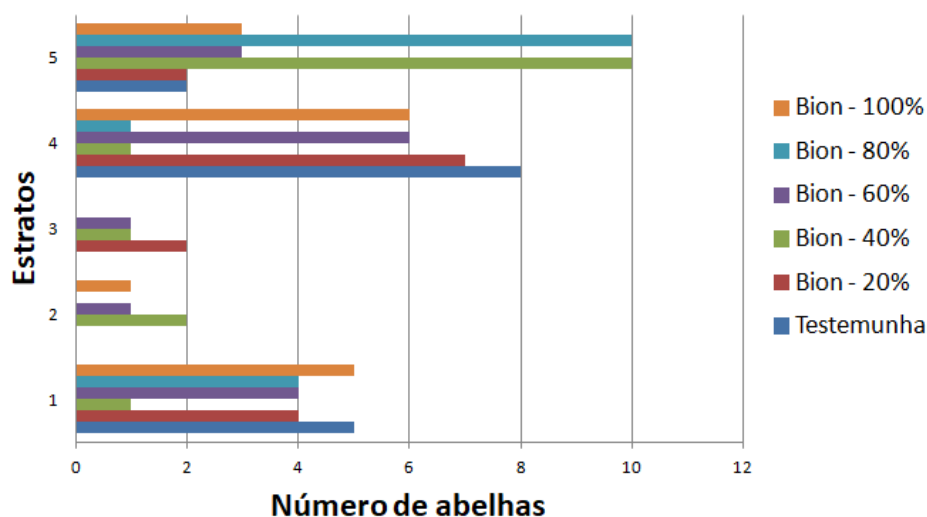
Nos horários mais quentes do dia, as flores recebem o maior número de abelhas (BLETTLER; FAGÚNDEZ; CAVIGLIA, 2018), então, para minimizar a pulverização direta sobre as abelhas no campo e, conseqüentemente, a mortalidade de *A. mellifera*, evitar as aplicações nos horários de picos de visitas florais se torna uma alternativa viável. Ressalta-se, principalmente, o cuidado com a pulverização, uma vez que na metodologia de contato e alimentação com o produto não se verificou redução significativa. Essa recomendação se estende a qualquer agrotóxico, pois o horário de aplicação, juntamente com a frequência e forma de aplicação tem influência direta nos efeitos em organismos alvos e não-alvos, como abelhas (FRANCESCHINELLI et al., 2017).

As forrageiras de *A. mellifera* expostas aos seis tratamentos (controle + cinco concentrações) e submetidas a avaliação de efeitos subletais por meio da análise de capacidade de voo não tiveram o deslocamento e a retomada do voo afetados. A maioria das abelhas voltou para a fonte luminosa sem chegar à base nos testes de retomada de voo (Gráfico 4), e dirigiam-se até a fonte luminosa em menos de um minuto no teste de deslocamento vertical (Gráfico 5). Assim, ASM não afetou

a capacidade comportamental de voo das abelhas.

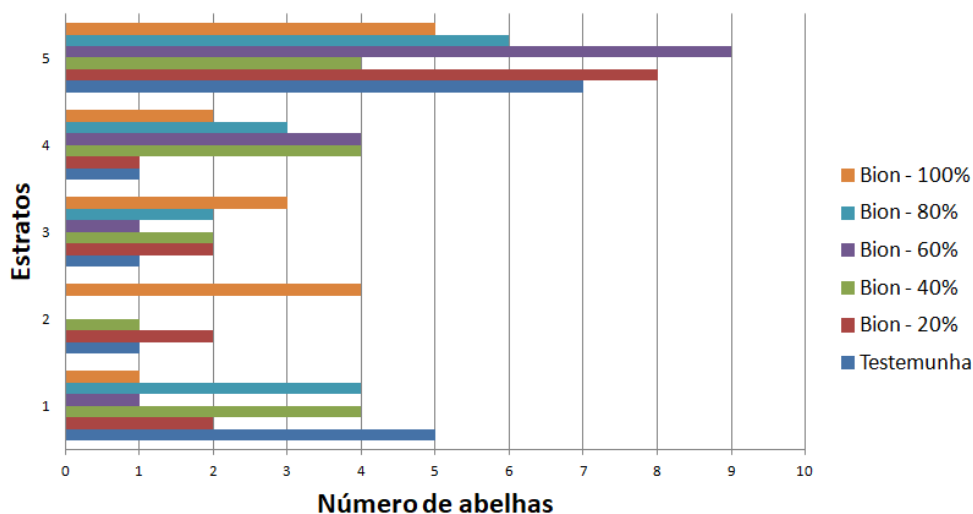
Quando saem em busca de alimento, forrageiras entram em contato com os agrotóxicos e, quando não mortas, podem ter sua capacidade de voo alterada. A redução da capacidade de voo torna uma abelha forrageira ineficiente, comprometendo sua atividade em campo e causando consequências negativas para toda a colônia (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007; TOMÉ et al., 2015b). A colônia começa a ser afetada quando, as forrageiras demoram ou não conseguem voltar para a colônia, pois são elas as responsáveis pela alimentação da colônia (BALBUENA et al., 2015).

Gráfico 4 - Número de forrageiras de *Apis mellifera* africanizada que retomaram o voo após entrar em contato com diferentes concentrações de ASM.



Fonte: Autoria própria, 2020.

Gráfico 5 - Deslocamento de forrageiras de *A. mellifera* africanizada após entrar em contato por duas horas com ASM.



Fonte: Autoria própria, 2020.

Dessa forma, é importante salientar que o uso de ASM é seguro em dose de campo quando ingerido ou quando em contato com forrageiras de *A. mellifera* africanizada. Porém, deve ser pulverizado no início ou no fim do dia, horário em que as abelhas já retornaram para suas colmeias e portanto, garantindo que estas não receberão pulverização direta. O produto ainda deve receber mais enfoque em pesquisas para estudos de resistência, imunidade e efeitos sinérgicos com outros produtos, além do entendimento de sua ação sobre o estresse tanto em *A. mellifera* como em outros organismos.

4.4 CONCLUSÃO

ASM mostrou-se seguro para forrageiras de *A. mellifera* africanizada, não interferindo na sobrevivência quando as mesmas entram em contato na alimentação ou em superfície contaminada. Entretanto, quando ASM foi pulverizado diretamente reduziu significativamente a sobrevivência. ASM também não interferiu na capacidade de voo das forrageiras. ASM tem influência negativa na sobrevivência de forrageiras de *A. mellifera* africanizada quando pulverizado diretamente sobre estas.

5 UTILIZAÇÃO DE ACIBENZOLAR-S-METÍLICO PARA EXPRESSÃO DO GENE β -1,3-GLUCANASE EM SOJA

5.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja com uma produção superior a 115 milhões de toneladas na safra 2018/2019 (CONAB, 2019). Levando em conta os modelos utilizados na agricultura atual, a degradação ambiental é uma consequência eminente (NICODEMO et al., 2008) e o aumento da presença de pragas e doenças tem aumentado consideravelmente.

Para alcançar tais resultados de produtividade e conseguir se manter na vice-liderança, o Brasil está entre os maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (CASSAL et al., 2014). Estes agrotóxicos, quando usados indiscriminadamente, trazem perigos ao meio ambiente, a organismos não alvo e também a saúde pública (CASSAL et al., 2014; MARCELINO; WACHTEL; GHISI, 2019).

Este fato, juntamente com casos de resistência a produtos químicos fitossanitários, têm despertado interesse em estudos que buscam tecnologias ecologicamente corretas para controle de pragas ou para evitar a incidência de patógenos nas plantas, como é o caso dos mecanismos endógenos de defesa da planta que podem ser induzidos por compostos exógenos (GADAGA et al., 2017).

Quando tratadas biótica ou abioticamente as plantas desencadeiam processos de defesa por meios físicos ou químicos para se proteger destas condições adversas (ALMEIDA et al., 2012). Para induzir essas reações, são utilizados eliciadores que, por meio de uma cascata de reações nas células, levam a expressão de genes de defesa (RESENDE et al., 2006).

Um dos mecanismos de defesa das plantas durante o processo de estresses é a síntese de proteínas relacionadas a patogênese, ou proteínas-PR para se defender da doença (FELIPINI; PIERO, 2013). Logo, a planta infectada ativa essas proteínas que compreendem inibidores da protease (que desativam as enzimas proteolíticas secretadas por agentes patogênicos) e enzimas líticas (β -1,3 glucanase e quitinase), que degradam as paredes celulares microbianas, principalmente fúngicas (CREELMAN; MULLET, 1997).

Genes codificadores da proteína β -1,3 glucanase estão diretamente ligados a elevados níveis de resistência (GEORGE et al., 2016) e podem ser induzidos por microrganismos (ALI et al., 2017; CAMPOS et al., 2009; COSTA, 2008; GEORGE et al., 2016; SHI; ZHANG; SHIH, 2006), ácido jasmônico (ALI et al., 2017; HU et al., 2017), quitosana, produtos de outras plantas (MAZARO et al., 2008), acibenzolar-S-metílico (BERTONCELLI et al., 2015), dentre vários outros.

Muitos gêneros de fungos possuem parede celular composta pelos polissacarídeos β -1,3-glucana (SHI; ZHANG; SHIH, 2006). As β -1,3-glucanases liberam elicitores de defesas vegetais que catalisam a hidrólise da parede celular desses fungos (BISHOP et al., 2005).

O Acibenzolar-S-metílico é um composto sintético que ativa genes codificadores de proteínas relacionadas a patogênese, como β -1,3-glucanases (ABO-ELYOUSR et al., 2010). No Brasil, é comercializado pela Syngenta® com o nome de Bion 500WG®, Actigard® e Inssimo® todos com formulação de granulado dispersível com recomendação de uso de forma preventiva, mas nenhum com recomendação para a cultura da soja (AGROFIT, 2019).

Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar a expressão de um gene de resistência na cultura da soja inoculada com a ferrugem asiática *Phakopsora pachyrhizi*, tratada ou não com Bion 500WG® em diferentes tempos.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Material vegetal: Soja

As plantas de soja, cultivar BRS 284 foram semeadas em vasos de 25 litros, contendo solo autoclavado que estavam alocados em casa de vegetação automatizada com controle de temperatura e umidade na UTFPR - Campus Dois Vizinhos. Foram semeadas 60 sementes por vaso e, quando alcançaram a fase V2, foram mantidas apenas as plantas mais vigorosas. O delineamento utilizado foi o Inteiramente Casualizado, com 2 tratamentos, 4 repetições por tratamento, sendo que, cada repetição era composta por dois vasos. Entre V2 e V3 foram aplicados os tratamentos T1 - testemunha (água destilada autoclavada) e T2 - Acibenzolar-S-Metílico ($0,025 \text{ g.L}^{-1}$) (considerado tempo zero).

Vinte e quatro horas depois, após a coleta de folhas para as análises, todas as plantas, dos dois tratamentos, foram inoculadas com o patógeno, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd.. Para isso, folhas de soja infectadas com esta doença foram disponibilizadas pela EMATER-PR e mantidas em câmara úmida até que a esporulação fosse aumentada.

Os esporos foram coletados e misturados em 100 mL de água destilada autoclavada e com o auxílio de um borrifador (Fotografia 4a), 4 mL da solução foram aplicados em cada Unidade Experimental. Utilizando sacos plásticos, foi simulado uma câmara úmida, a fim de proporcionar ambiente ideal para a infecção do patógeno na planta (Fotografia 4b).

Amostras de folhas foram retiradas das 4 repetições de cada tratamento em triplicata nos tempos 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas após a aplicação dos tratamentos. O material foi armazenado em nitrogênio líquido e levado para a Embrapa Soja (Londrina-PR) para realização das análises de β -1,3 glucanases.

Fotografia 4- a) Inoculação de *P. pachyrhizi* com o uso de borrifador; b) simulação de câmara úmida utilizando saco plástico para favorecer a infecção do patógeno na planta.



Fonte: Autoria própria, 2020.

5.2.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a extração do RNA foi adaptado o protocolo do reagente Trizol (Invitrogen™) que é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanadina. Para tal, 100 mg de folhas de cada um dos tratamentos, bem como da testemunha foram triturados individualmente em gral contendo nitrogênio líquido até total

pulverização (Fotografia 5).

Fotografia 5 - Pulverização de amostra vegetal em gral com uso de nitrogênio líquido.



Fonte: Autoria própria, 2020.

O pó resultante da maceração foi transferido para microtubos de 1,5 mL que receberam 1 mL de TRIZOL, o material foi homogeneizado com o auxílio de um vórtex por aproximadamente um minuto e após, centrifugado por dez minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para tubos limpos, e o pellet descartado.

Aos novos tubos foi adicionado 200 μ L de clorofórmio e o material foi homogeneizado em vórtex por aproximadamente 15 segundos, seguido de agitação a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, novamente as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 rpm. Com cuidado, 500 μ L da fase aquosa superior foram transferidos para um novo tubo.

Neste material, onde estava contido a maioria do RNA, foi adicionado 500 μ L de isopropanol e homogeneizado, o que fez com que o RNA precipitasse. Então, as amostras foram incubadas em sala climatizada por 10 minutos, seguida de centrifugação (12.000 rpm por 10 minutos), se desprezou o sobrenadante, e o RNA antes invisível permaneceu em formato de pellet sedimentado, tipo gel.

O pellet foi ressuspensionado em 1 mL de etanol 75% seguido de uma agitação em vórtex por 15 segundos para dissolver possíveis vestígios residuais de guanidínio, posteriormente, foi centrifugado por 5 minutos a 9500 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet permaneceu em temperatura ambiente por 8

minutos.

Para a solubilização do RNA, o sedimento foi dissolvido em 50 μL de água milli-Q tratada com DEPC (dietil pirocarbonato) e incubado de 10-15 minutos em gelo para assegurar a solubilização completa. Após isso o material foi armazenado em ultrafreezer ($\cong -80^\circ\text{C}$).

Para avaliar a quantidade e a pureza do RNA extraído foram realizadas leituras em NanoDrop, onde a razão entre a absorbância a 260 e 280 nm proporcionou uma estimativa da pureza do RNA (preparações puras tem uma proporção A260/A280 entre 1,8 e 2,0, enquanto contaminadas com proteínas ou fenol é menor (Fotografia 6).

Fotografia 6 - Aplicação de 1 μL de RNA total em NanoDrop para quantificação.



Fonte: Autoria própria, 2020.

A integridade do RNA total isolado foi avaliada por eletroforese em gel de agarose desnaturante (contendo 0,6 moles/L de formaldeído) a 1% com Brometo de Etídeo a 1%. Como tampão da corrida foi utilizado o tampão SB.

O cDNA foi sintetizado a partir de 2 ng de RNA total e protocolo padrão do Kit SuperScript III (Invitrogen). Sua qualidade foi testada por PCR, seguida de eletroforese, utilizando primers específicos e verificando o tamanho das bandas amplificadas.

5.2.3 RT-qPCR

As análises de expressão gênica foram conduzidas em equipamento para PCR em tempo real modelo 7900 (Applied Biosystems), utilizando os seguintes componentes: 4,7µl de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) Kit, 0,38µl de cada primer (10µM), juntamente com 1µl de cDNA (diluído 1:10 a partir do cDNA original) e 3,32µl de água para reações de 9,4µl de volume final.

Os oligonucleotídeos iniciadores (primers) do gene alvo foram confeccionados a partir do gene SGlu5 (GenBank: AF034110.1), considerando as regiões mais conservadas. Em seguida, foi realizado um blast no banco de dados Phytozome para confirmar que os primers anelavam apenas na região alvo, e com o software GeneRunner que não haveria a ocorrência de hairpins. Esse conjunto de primers resultam em um fragmento de 126 pares de bases. Como referência endógena foi utilizado o primer da β -actina (Quadro 1).

Quadro 1 - Sequência de primers utilizados para RT-qPCR.

Primer	Forward	Reverse
B-Actina	CCCCTCAACCCAAAGGTCAACA G	GGAATCTCTCTGCCCAATTGT G
SGlu5	TGCCATATTGCTGCTTCTTG	AGATCCACCACTGCTTGCTT

As condições das reações foram: 50°C por 2 minutos, desnaturação a 95°C durante dez minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e temperatura de anelamento em 60°C por um minuto. Ao final da amplificação um período adicional de 30 minutos, com elevação gradual da temperatura de 60°C a 94°C foi utilizado para obtenção da curva de dissociação, a fim de se confirmar a amplificação de apenas um fragmento.

A determinação dos níveis de expressão dos genes alvos foi realizada pela quantificação relativa utilizando a expressão $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde, para cada tratamento é detectado o valor de Ct (Cycle threshold), tanto para o gene alvo quanto para o controle endógeno. Este valor representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectado. O valor de Ct do gene alvo é subtraído do valor de Ct do controle endógeno, para normalizar a reação. Obtém-se então o valor de ΔCt . O valor de ΔCt dos tratamentos foi subtraído do valor de ΔCt da amostra controle (calibrador),

tendo-se o valor de $\Delta\Delta Ct$. Este valor é utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do controle endógeno, considerando a porcentagem de eficiência de cada gene.

5.2.4 Análises Estatísticas

Foram realizadas análise de variância combinada, utilizando como repetições as triplicatas do material biológico, presentes em cada placa da análise de PCR em tempo real pelo programa Rest 2009.

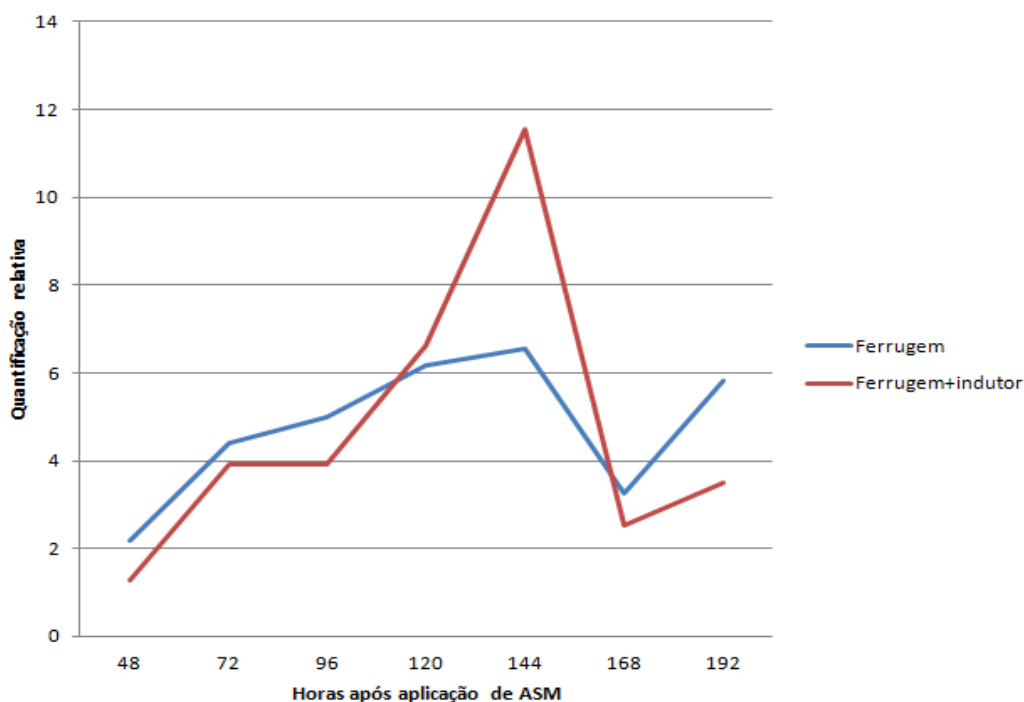
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão do gene SGlu5, não foi diferente significativamente entre os tratamentos. A partir das 72 horas após a aplicação de ASM, houve diferença significativa na expressão do gene SGlu5, quando comparado cada tempo com a coleta de 24h (Gráfico 6). Isso mostra que, o gene SGlu5 teve sua expressão aumentada pela inoculação de *P. pachyrhizi* (pois sua parede celular possui glucana, ativando bioticamente o gene SGlu5) e não pela aplicação do ASM.

Apesar de não avaliada a severidade da doença neste trabalho, há pesquisas demonstrando que o ASM não é eficiente para o controle da ferrugem asiática na soja (BARROS, 2011; CARVALHO et al., 2013; ROESE; FILHO; MELO, 2012; SILVA et al., 2013).

Há trabalhos que mostram o contrário, Cruz et al. (2012), obtiveram resultados positivos para a utilização de ASM na diminuição da severidade da ferrugem asiática na soja. Abo-Elyousr et al. (2010) também concluíram que a ferrugem asiática e a atividade de β -1,3-glucanase é potencializada com a utilização de ASM. Porém, existem pelo menos 12 classes de genes que codificam β -1,3-glucanase na soja, sendo SGlu5 (gene aqui estudado), apenas um deles (JIN et al., 1999).

Gráfico 6 - Quantificação relativa da expressão do gene SGlu5 em diferentes tempos com diferentes tratamentos.



Em outras plantas, o efeito de ASM também pode ser notado. Em arroz, plantas pulverizadas com ASM, tiveram as atividades de polifenoloxidasas, fenilalanina amônia-liases, quitinases e β -1,3-glucanases aumentadas (NASCIMENTO et al., 2016). Em alface, ASM pode ser utilizado para o controle de nematóides das galhas (HERNANDES et al., 2017) e, até mesmo em plantas de kiwi, ASM reduz a incidência de manchas foliares (JONG et al., 2019).

A utilização de ASM pode induzir a expressão de outros genes de defesa em soja, com picos as 141 horas após a inoculação, como fenilalanina amônio liase, quitinase, chalcona isomerase, lipoxigenase, PR1 e metaloproteinase (CRUZ, 2012). Estudos mostram ainda que outras doenças como oídio podem ser reduzidas com o uso do ASM nesta cultura (SILVA et al., 2013).

Efeitos positivos na expressão do gene β -1,3-glucanase em soja pode ser encontrado utilizando outros elicitores. A utilização de bactérias do gênero *Bacillus spp.*, por exemplo, faz com que, não somente o gene β -1,3-glucanase seja expresso, como também o gene quitinase, ambos responsáveis por inibir fitopatógenos degradando sua parede celular (JAIN et al., 2016).

Bacillus thuringiensis, já vendido comercialmente como agente de controle

biológico, é um entomopatígeno e, quando avaliado sua ação sobre a ferrugem asiática, pode-se perceber a redução da severidade da doença e aumento da atividade de enzimas β -1,3-glucanase na quantificação de proteínas-PR (MÜLLER et al., 2019).

São necessários mais estudos com outros genes de defesa e até mesmo com outros indutores, a fim de descobrir uma forma preventiva e alternativa ao uso desenfreado de fungicidas nas lavouras.

5.4 CONCLUSÃO

A utilização de Acibenzolar-S-Metílico não altera a expressão do gene SGlu5 em soja, cultivar BRS 284. Este foi alterado somente pela presença do fungo *P. pachyrhizi* após 72 horas de inoculação.

6 CONCLUSÕES

Os agrotóxicos, de maneira geral, tem relação direta com a mortalidade de *Apis mellifera*. A pulverização direta, juntamente com os inseticidas são a maneira e a classe, respectivamente, que causam maiores ameaças as populações desta espécie. Abelhas adultas são mais sensíveis e sulfito de aquila e inorgânicos (ambos grupos de acaricidas) são os mais danosos.

O Acibenzolar-S-metílico (ASM) reduz a sobrevivência de *A. mellifera* quando o mesmo é pulverizado diretamente sobre estas. Porém se, a abelha somente se alimentar ou entrar em contato com o produto em sua dose de campo, este não interfere na sobrevivência e nem na sua capacidade de voo.

Ainda, o Acibenzolar-S-metílico não é eficaz na indução da expressão do gene SGlu5. Dessa forma, deve-se dar atenção a pesquisas que avaliem a expressão de outros genes de resistência e que busquem novos indutores para a cultura da soja.

A importância de reduzir o uso de agrotóxicos, vai muito além da saúde de *A. mellifera*, são ecossistemas inteiros que aos poucos se desequilibram e trazem fortes consequências para todo o meio. Dessa forma, deve-se considerar a utilização de controle de pragas e doenças alternativos, que visem aumentar a produtividade sem esquecer da sustentabilidade, visando o bem-estar e saúde de todos os indivíduos e o maior equilíbrios dos agroecossistemas.

REFERÊNCIAS

- ABBO, P. M. et al. Effects of Imidacloprid and *Varroa destructor* on survival and health of European honey bees, *Apis mellifera*. **Insect Science**, v. 24, n. 3, p. 467–477, 2017.
- ABDEL RAZIK, M. A. RAOUF A. MAGEED. Toxicity and side effects of some insecticides applied in cotton fields on *Apis mellifera*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 5, p. 4987–4996, 2019.
- ABO-ELYOUSR, A. M. K. et al. Effect of Acibenzolar-S-methyl and *Rahnella aquatilis* on Disease Resistance of Apple Plants. **The Plant Pathology Journal**, v. 26, n. 1, p. 63–69, 2010.
- ABRAHAM, J. et al. Commercially formulated glyphosate can kill non-target pollinator bees under laboratory conditions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, p. 1–8, 2018.
- AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 24 mar. 2019.
- AKCA, I. et al. Residual Toxicity of 8 Different Insecticides on Honey Bee (*Apis mellifera* Hymenoptera : Apidae). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8, n. 3, p. 436–440, 2009.
- ALAUX, C. et al. Interactions between *Nosema microspores* and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 774–782, 2010.
- ALI, S. et al. Isolation and molecular characterization of pathogenesis related PR2 gene and its promoter from *Brassica juncea*. **Biologia Plantarum**, v. 61, n. 4, p. 763–773, 2017.
- ALKASSAB, A. T.; KIRCHNER, W. H. Impacts of chronic sublethal exposure to clothianidin on winter honeybees. **Ecotoxicology**, 2016.
- ALMEIDA, H. O. et al. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 2, p. 163–172, 2012.
- AMARO, P.; GODINHO, J. Pesticidas e abelhas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 5, p. 53–62, 2012.
- AMIRI, E. et al. Queen Quality and the Impact of Honey Bee Diseases on Queen Health : Potential for Interactions between Two Major Threats to Colony Health. **Insects**, v. 8, n. 48, p. 1–18, 2017.
- ANDERSON, L. D.; TUFT, T. O. Toxicity of Several New Insecticides to Honey Bees. **Journal of Economic Entomology**, v. 45, n. 3, p. 466–469, 1952.
- ARENA, M.; SGOLASTRA, F. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. n. January, 2014.
- AUFAUVRE, J. et al. Transcriptome Analyses of the Honeybee Response to *Nosema ceranae* and Insecticides. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.
- AUPINEL, P. et al. Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis*

mellifera), using a new in vitro standardized feeding method. **Pest Management Science**, v. 1094, n. September, p. 1090–1094, 2007.

BAHRY, C. A.; ZIMMER, P. D. SGLu2 gene expression in coats of soybean seeds. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 3, p. 290–294, 2014.

BAILEY, J. et al. Contact and oral toxicity to honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada. **Apidologie**, v. 36, p. 623–633, 2005.

BALBUENA, M. S. et al. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 218, p. 2799–2805, 2015.

BARROS, F. C. et al. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 231–239, 2010.

BARROS, R. ESTUDO SOBRE A APLICAÇÃO FOLIAR DE ACIBENZOLAR-S-METIL PARA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM ASIÁTICA EM SOJA E CERCOSPORIOSE EM MILHO. **Arq. Inst. Biol**, v. 78, n. 4, p. 519–528, 2011.

BAUERMEISTER, A. et al. β -1,3-Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 31, n. 2, p. 75–86, 2010.

BERG, C. et al. The effects of iprodione fungicide on survival, behavior, and brood development of honeybees (*Apis mellifera* L.) after one foliar application during flowering on mustard. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 12, p. 3086–3094, 2018.

BERINGER, J. DA S.; MACIEL, F. L.; TRAMONTINA, F. F. O declínio populacional das abelhas: causas, potenciais soluções e perspectivas futuras. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 5, n. 1, p. 17–26, 2019.

BERTONCELLI, D. J. et al. Resumo Acibenzolar-S-metil na indução de resistência de tomateiro e controle de *Rhizoctonia solani* kuhn in vitro Resúmen. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science**, v. 8, p. 43–50, 2015.

BIANCHI, V. L. T. et al. **Agroecossistema e meio ambiente: a necessidade da sustentabilidade** *Scientia Agraria Paranaensis*, 2006.

BISHOP, J. G. et al. Selection on Glycine β -1,3-Endoglucanase Genes Differentially Inhibited by a *Phytophthora* Glucanase Inhibitor Protein. **Genetics**, v. 169, p. 1009–1019, 2005.

BLETTLER, D. C.; FAGÚNDEZ, G. A.; CAVIGLIA, O. P. Contribution of honeybees to soybean yield. **Apidologie**, v. 49, p. 101–111, 2018.

BOILY, M. et al. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, p. 5603–5614, 2013.

BOMMARCO, R.; MARINI, L.; VAISSIÈRE, B. E. Insect pollination enhances seed yield, quality, and market value in oilseed rape. **Oecologia**, n. 169, p. 1025–1032, 2012.

BORENSTEIN, M. et al. **Introduction to Meta-Analysis**. John Wiley ed. Chichester: [s.n.].

CAIRES, S. C.; BARCELOS, D. Colapso das abelhas: Possíveis causas e

- consequências do seu desaparecimento na natureza. **Acta Apicola Brasilica**, v. 05, n. 1, p. 11–15, 2017.
- CALDERONE, N. W. Insect Pollinated Crops, Insect Pollinators and US Agriculture: Trend Analysis of Aggregate Data for the Period 1992–2009. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 24–28, 2012.
- CAMPOS, Â. D. et al. Indução de resistência sistêmica à antracnose em feijoeiro-comum pela raça delta avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 44, n. 1, p. 15–21, 2009.
- CARVALHO, B. O. et al. Action of defense activator and foliar fungicide on the control of Asiatic rust and on yield and quality of soybean seeds. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 2, p. 198–206, 2013.
- CASSAL, V. B. et al. Agrotóxicos: Uma Revisão De Suas Consequências Para a Saúde Pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 437–445, 2014.
- CASTRO, L. S.; MIRANDA, M. H.; LIMA, J. E. Indicadores sociais de desenvolvimento e a produção de soja: Uma análise multivariada nos 150 maiores municípios produtores brasileiros. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**, v. 11, n. 1, p. 69–87, 2015.
- CATAE, A. F. et al. MALDI-imaging analyses of honeybee brains exposed to a neonicotinoid insecticide. **Pest Management Science**, v. 75, n. 3, p. 607–615, 2018.
- CHAPMAN, R. F. **The Insects: Structure and functions**. 5. ed. Nova York: Cambridge University Press, 2013.
- CHEN, X. D. et al. Risk assessment of various insecticides used for management of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* in Florida citrus, against honey bee, *Apis mellifera*. **Ecotoxicology**, p. 1–9, 2017.
- CHEN, Y. et al. The impact of pyriproxyfen on the development of honey bee (*Apis mellifera* L.) colony in field. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 19, n. 3, p. 589–594, 2016.
- CHENG, Y. et al. A semi-field study to evaluate effects of sulfoxaflor on honey bee (*Apis mellifera*). **Bulletin of Insectology**, v. 71, n. 2, p. 225–233, 2018.
- CHIARI, W. C. et al. Polinização Poliniz ação por *Apis mellifera* em soja trans tran s gênica [*Glycine max* (L.) Merrill] Roundup Ready cv. BRS BRS 245 RR e convencional cv. BRS 133. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 2, p. 267–271, 2008.
- CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: grãos. **Monitoramento agrícola- Safra 2019**, v. 6, n. 12, p. 1–98, 2019.
- COSTA, B. S. R. Análise dos níveis de poligalacturonases e glucanases expressas durante os processos de interação patogênica e saprofítica de *Sclerotinia sclerotiorum*. 2008.
- COSTA, E. M. et al. Toxicity of insecticides used in the Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions. **Apidologie**, v. 45, n. 1, p. 34–44, 2014.
- COULON, M. et al. Metabolisation of thiamethoxam (a neonicotinoid pesticide) and

interaction with the chronic bee paralysis virus in honeybees. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2017.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: UNEP, 2006.

COX-FOSTER, D. L. et al. A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. **Science**, v. 318, p. 283–287, 2007.

CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Biosynthesis and Action of Jasmonates in Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 1, p. 355–381, 1997.

CRUZ, M. F. A. DA. **Indutores de resistência e silício na interação *Glycine max* L. (Merrill) - *Phakopsora pachyrhizi***. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2012.

CRUZ, M. F. A. et al. Soybean Resistance to *Phakopsora pachyrhizi* as Affected by Acibenzolar-S-Methyl, Jasmonic Acid and Silicon. **Journal of Phytopathology**, v. 162, p. 133–136, 2012.

CUNNINGHAM-MINNICK, M. J.; PETERS, V. E.; CRIST, T. O. Nesting habitat enhancement for wild bees within soybean fields increases crop production. **Apidologie**, 2019.

DAHLGREN, L. et al. Comparative Toxicity of Acaricides to Honey Bee (Hymenoptera : Apidae) Workers and Queens. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, n. 6, p. 1895–1902, 2012.

DAI, P. et al. The impacts of chlorothalonil and diflubenzuron on *Apis mellifera* L. larvae reared in vitro. **Ecotoxicology and Environmental Safety journal**, v. 164, n. July, p. 283–288, 2018a.

DAI, P. et al. The Herbicide Glyphosate Negatively Affects Midgut Bacterial Communities and Survival of Honey Bee during Larvae Reared in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2018b.

DAI, P. et al. Chronic toxicity of amitraz, coumaphos and fluvalinate to *Apis mellifera* L. larvae reared in vitro. **Scientific Reports**, p. 1–9, 2018c.

DAI, P. et al. Chronic toxicity of clothianidin, imidacloprid, chlorpyrifos, and dimethoate to *Apis mellifera* L. larvae reared in vitro. **Pest Management Science**, v. 75, n. 1, p. 29–36, 2019.

DECOURTYE, A.; LACASSIE, E.; PHAM-DELÈGUE, M.-H. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L.) are differentially affected by imidacloprid according to the season. **Pest Management Science**, v. 59, n. March 2002, p. 269–278, 2003.

DÉMARES, F. J. et al. Sucrose Sensitivity of Honey Bees Is Differently Affected by Dietary Protein and a Neonicotinoid Pesticide. **PlosOne**, v. 11, n. 6, p. 1–17, 2016.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 81–106, 2007.

DIAO, Q. et al. Science of the Total Environment Enhancement of chronic bee paralysis virus levels in honeybees acute exposed to imidacloprid: A Chinese case study. **Science of the Total Environment**, v. 630, p. 487–494, 2018.

DOMINGUES, C. E. C. et al. Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotoxic system of the Africanized honeybee.

Chemosphere, 2017.

DOUBLET, V. et al. Bees under stress : sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle.

Environmental Microbiology, v. 17, n. 4, p. 969–983, 2015.

DUSSAUBAT, C. et al. Combined neonicotinoid pesticide and parasite stress alter honeybee queens ' physiology and survival. **Nature Publishing Group**, n. May, p. 1–7, 2016.

ELLIS, J. D.; EVANS, J. D.; PETTIS, J. Colony losses , managed colony population decline , and Colony Collapse Disorder in the United States. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 6–9, 2010.

ELLIS, M. Pesticides Applied to Crops and Honey Bee Toxicity. **American Bee Journal**, 2010.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil : os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 25–38, 2007.

FELIPINI, R.; PIERO, R. DI. PR-protein activities in table beet against *Cercospora beticola* after spraying chitosan or acibenzolar-S-methyl. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. December, p. 534–538, 2013.

FISHER, A. et al. The Effects of the Insect Growth Regulators Methoxyfenozide and Pyriproxyfen and the Acaricide Bifenazate on Honey Bee (Hymenoptera : Apidae) Forager Survival. **Journal of Economic Entomology**, n. February, p. 1–7, 2018.

FORKPAH, C. et al. Xenobiotic Effects on Intestinal Stem Cell Proliferation in Adult Honey Bee (*Apis mellifera* L) Workers. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–9, 2014.

FRANCESCHINELLI, E. V. et al. Influence of landscape context on the abundance of native bee pollinators in tomato crops in Central Brazil. **Journal of Insect Conservation**, v. 21, n. 4, p. 715–726, 2017.

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. **Polinizadores e pesticidas: Princípios de manejo para os agroecossistemas brasileiros**. Brasília: [s.n.].

FRIOL, P. S. et al. Can the exposure of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apiadae) larvae to a field concentration of thiamethoxam affect newly emerged bees? **Chemosphere**, v. 185, p. 56–66, 2017.

GADAGA, S. J. C. et al. Phosphites for the control of anthracnose in common bean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 1, p. 36–44, 2017.

GAZZONI, D. L. **Soja e Abelhas**. 1. ed. Brasília, DF: [s.n.].

GEORGE, K. J. et al. Interplay of genes in plant–pathogen interactions: In planta expression and docking studies of a beta 1,3 glucanase gene from *Piper colubrinum* and a glucanase inhibitor gene from *Phytophthora capsici*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 22, n. 4, p. 567–573, 2016.

GODFRAY, H. C. J. et al. A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1786, 2014.

GORJANOVIĆ, S. A review: Biological and technological functions of barley seed pathogenesis- related proteins (PRS). **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, n.

4, p. 334–360, 2009.

GOULSON, D. et al. Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, 2015.

GRILLONE, G. et al. Toxicity of thiametoxam on in vitro reared honey bee brood. **Apidologie**, 2017.

HEID, C. et al. Real time quantitative PCR. **Genome research**, v. 6, p. 986–994, 1996.

HENDRIKSMA, H. P.; HARTEL, S.; STEFFAN-DEWENTER, I. Honey bee risk assessment : new approaches for in vitro larvae rearing and data analyses. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 2, p. 509–517, 2011.

HENRY, M. et al. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 348–350, 2012.

HERNANDES, I. et al. Acibenzolar-S-methyl on *Meloidogyne javanica* control in lettuce. **Soil & Plant Science**, v. 67, n. 7, p. 660–664, 2017.

HESKETH, H. et al. Extending standard testing period in honeybees to predict lifespan impacts of pesticides and heavy metals using dynamic energy budget modelling. **Nature Publishing Group**, n. December, p. 1–12, 2016.

HESSELBACH, H.; SCHEINER, R. Effects of the novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) on honeybee taste and cognition. **Scientific Reports**, n. March, p. 1–8, 2018.

HESSELBACH, H.; SCHEINER, R. The novel pesticide fl upyradifurone (Sivanto) affects honeybee motor abilities. **Ecotoxicology**, 2019.

HU, Y. et al. Exogenous application of methyl jasmonate induces defence against *Meloidogyne hapla* in soybean. **Nematology**, v. 19, n. 3, p. 293–304, 2017.

HUA, K.; BUREAU, D. P. Exploring the possibility of quantifying the effects of plant protein ingredients in fish feeds using meta-analysis and nutritional model simulation-based approaches. **Aquaculture**, v. 356–357, p. 284–301, 2012.

HUNG, K.-L. J. et al. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1870, p. 20172140, 2018.

IMRAN, M. et al. Assessment of sensitivity level of honeybee (*Apis mellifera*) to neonicotinoid insecticides. **Asian Journal of Agriculture and Biology**, v. 6, n. 3, p. 327–334, 2018.

JAIN, S. et al. Molecular characterization of chitinase and β -1, 3-glucanase gene of soybean plant growth promoting bacterium *Bacillus sp.* SJ-5. **International Journal of Agricultural and Life Sciences**, v. 2, n. 4, p. 54–59, 2016.

JIN, W. et al. Analysis and Mapping of Gene Families Encoding β -1, 3-Glucanases of Soybean. **Genetics**, v. 153, p. 445–452, 1999.

JONG, H. DE et al. Integrated Use of *Aureobasidium pullulans* Strain CG163 and Acibenzolar-S-Methyl for Management of Bacterial Canker in Kiwifruit. **Plants**, v. 8, n. 287, p. 1–19, 2019.

KAHLOW, C. et al. Atendimento à suspeita de intoxicação por agrotóxicos em apicultura no centro-sul do paraná. **MV & Z**, v. 14, n. 2, p. 73, 2016.

- KAPLAN, J. K. Colony Collapse Disorder: An Incomplete Puzzle. **Agricultural Research Magazine**, n. July, p. 2489, 2012.
- KUTLU, M. A.; ÖZDEMİR, F. A.; GÜL, A. Investigation of the Effect of Honey Bee Pollination for Apple (*Malus sylvestris* (L .) Mill .) on Fruit Yield , Seed Number and Seed Germination Capacity Elma (*Malus sylvestris* (L .) Mill .) Polinasyonunda Bal Arısı Kullanımının Meyve Verimi , Tohum S. **KSU Journal AgricNat**, v. 22, n. 6, p. 830–836, 2019.
- LADURNER, E. et al. Assessing delayed and acute toxicity of five formulated fungicides to *Osmia lignaria* Say and *Apis mellifera* L. **Apidologie**, v. 36, p. 449–460, 2005.
- LANDIM, C. DA C. **Abelhas: Morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009.
- LANG, Q. et al. A sensitive acetylcholinesterase biosensor based on gold nanorods modified electrode for detection of organophosphate pesticide. **Talanta**, 2016.
- LAURINO, D. et al. Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. **Bulletin of Insectology**, v. 64, n. 1, p. 107–113, 2011.
- LAUTENBACH, S. et al. Spatial and Temporal Trends of Global Pollination Benefit. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.
- LIAO, C. et al. Effect of fenpropathrin on the viability and homing ability of worker bees *Apis mellifera*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 20, n. 4, p. 1063–1066, 2017.
- LIAO, C. et al. Short - Term Exposure to Lambda - Cyhalothrin Negatively Affects the Survival and Memory - Related Characteristics of Worker Bees *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, n. 0123456789, 2018.
- LIAO, L.-H.; WU, W.-Y.; BERENBAUM, M. R. Impacts of Dietary Phytochemicals in the Presence and Absence of Pesticides on Longevity of Honey Bees (*Apis mellifera*). **Insects**, v. 8, n. 22, 2017.
- LIBARDONI, G. et al. Effect of different *Bacillus thuringiensis* strains on the longevity of Africanized honey bee. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 1, p. 329–338, 2018.
- LONG, E. Y.; KRUPKE, C. H. Non-cultivated plants present a season-long route of pesticide exposure for honey bees. **Nature Communications**, v. 7, n. May, p. 1–12, 2016.
- LÓPEZ, J. H. et al. Sublethal pesticide doses negatively affect survival and the cellular responses in American foulbrood-infected honeybee larvae. **Scientific Reports**, n. December 2016, p. 33–36, 2017.
- MALERBO-SOUZA, D. T.; NOGUEIRA-COUTO, R. H.; COUTO, L. A. Características das colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), coletadas de alojamentos naturais em Jaboticabal, Estado de São Paulo. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 4, p. 863–867, 2002.
- MANNING, P. et al. Honey bee survival is affected by interactions between field-relevant rates of fungicides and insecticides used in apple and blueberry production. **FACETS**, n. Barile 2013, p. 910–918, 2017.
- MANNING, P.; RAMANAIDU, K.; CUTLER, G. C. Correction: Honey bee survival is affected by interactions between field-relevant rates of fungicides and insecticides

- used in apple and blueberry production. **FACETS**, v. 3, n. 1, p. 530–530, 2018.
- MARCELINO, A. F.; WACHTEL, C. C.; GHISI, N. DE C. Are our farm workers in danger? Genetic damage in farmers exposed to pesticides. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 3, 2019.
- MARTINEZ, E. A. et al. Oferta de serviços ambientais a partir de diferentes agroecossistemas de base familiar no sul do Rio Grande do Sul. **Agricultura Familiar: Pesquisa, Formação e Desenvolvimento**, v. 11, p. 71–86, 2017.
- MASON, C. E. Progression of Knockdown and Mortality of Honey Bees (Hymenoptera : Apidae) Sprayed with Insecticides Mixed with Penncap- M. **Environmental Entomology**, v. 15, n. 1, p. 170–176, 1986.
- MATTOS, I. M. DE; SOARES, A. E. E.; TARPY, D. R. Mitigating effects of pollen during paraquat exposure on gene expression and pathogen prevalence in *Apis mellifera* L. **Ecotoxicology**, 2017.
- MAZARO, S. M. et al. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1824–1829, 2008.
- MENKE, H. F. Toxicity of Some Insecticides to *Nomia melanderi* and *Apis mellifera*. **Journal of Economic Entomology**, v. 44, n. 4, p. 624–625, 1951.
- MIGDAŁ, P. et al. The Impact of Selected Pesticides on Honey Bees. **Pol. J. Environ. Stud**, v. 27, n. 2, p. 787–792, 2018.
- MIN, S. et al. Foliage Residual Toxicity to Honeybee on Pepper and Cucumber Foliage of Systemic Insecticides by Root Uptake Into Crops. **Korean J. Pestic. Sci.**, v. 23, n. 1, p. 8–16, 2019.
- MOFFETT, J. O.; MORTON, H. L.; MACDONALD, R. H. Toxicity of Some Herbicidal Sprays to Honey Bees. **Journal of Economic Entomology**, v. 65, n. 1, p. 32–36, 1972.
- MONASTEROLO, M. et al. Soybean crops may benefit from forest pollinators. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 202, p. 217–222, 2015.
- MONCHARMONT, F.-X. D. et al. Statistical analysis of honeybee survival after chronic exposure to insecticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 12, p. 3088–3094, 2003.
- MOTTA, E. V. S.; RAYMANN, K.; MORAN, N. A. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. **PNAS Latest Articles**, v. 2018, p. 1–6, 2018.
- MULLA, S. I. et al. Organophosphate Pesticides : Impact on Environment , Toxicity , and Their Degradation. In: **Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety**. Springer N ed. Singapore: [s.n.]. p. 265–290.
- MÜLLER, I. **Indução de resistência e tratamento de sementes de soja com fosfitos de potássio**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.
- MÜLLER, M. A. et al. *Bacillus thuringiensis* Combined With Fungicide Applications in the Management of Soybean Leaf Diseases. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 13, p. 226–239, 2019.
- MURRAY, A. Acute and Residual Toxicity of a New Pyrethroid Insecticide, WL85871, to Honey-bees. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 34, p. 560–564, 1985.

- NAKASU, E. Y. T. et al. Novel biopesticide based on a spider venom peptide shows no adverse effects on honeybees. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 281, 2014.
- NASCIMENTO, K. J. T. et al. Silicon , acibenzolar-S-methyl and potassium phosphite in the control of brown spot in rice Soil material. **Plant Protection**, v. 75, n. 2, p. 212–221, 2016.
- NAVARRO, E. et al. Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 231–250, 2015.
- NEAL, S. T. O. et al. Chlorothalonil Exposure Alters Virus Susceptibility and Markers of Immunity , Nutrition , and Development in Honey Bees. **Journal of Insect Science**, v. 19, 2019.
- NETO, E. Q. Territórios complexos da agroecologia: inter-relações de fluxos agrícolas, sócio-econômicos e ambientais. **Orbis Latina**, v. 1, n. 1, p. 28–34, 2011.
- NICODEMO, M. L. F. et al. Conciliação entre produção agropecuária e integridade ambiental: o papel dos serviços ambientais. **Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos**, 2008.
- NOCELLI, R. C. F. et al. Riscos de Pesticidas sobre as Abelhas. In: **Semana dos Polinizadores**. Embrapa Se ed. Petrolina: [s.n.]. p. 196–212.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 10–13, 2004.
- OVERMYER, J. et al. Thiamethoxam honey bee colony feeding study: Linking effects at the level of the individual to those at the colony level. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 816–828, 2018.
- PANDEY, S.; GURR, G. M. Conservation biological control using Australian native plants in a brassica crop system: seeking complementary ecosystem services. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 280, n. April, p. 77–84, 2019.
- PARIS, L. et al. Disruption of oxidative balance in the gut of the western honeybee *Apis mellifera* exposed to the intracellular parasite *Nosema ceranae* and to the insecticide fi pronil. **Microbial Biotechnology**, 2017.
- PEREIRA, F. DE M. et al. **Sistemas de Produção: Produção de Mel - Características e Organização**. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_sisal/arvore/CONT000fckg3dhb02wx5eo0a2ndxytqx96jy.html>.
- PEREIRA, L. H. et al. Efeitos do uso de pesticidas nas abelhas: revisão sistemática em bases de dados científicas. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 12, p. 32821–32833, 2019.
- PIRES, C. S. S. et al. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil : há casos de CCD ? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 422–442, 2016.
- POTRICH, M. et al. Effect of entomopathogens on Africanized *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 62, n. 1, p. 23–28, 2018.
- RAMOS, J. M.; CARVALHO, N. C. DE. Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. **Revista Científica Eletrônica De Engenharia**

Florestal, v. 6, n. 10, 2007.

RASULI, F.; RAFIE, J. N.; SADEGHI, A. Acute contact toxicity of six pesticides in honeybees (*Apis mellifera* Meda) in Iran. **J. Apic. Sci**, v. 61, n. 1, p. 29–36, 2017.

RAVICHANDRA, N. G. **Agrochemicals in Plant Disease Management**. India: Scientific Publishers, 2018.

RENZI, M. T. et al. Chronic toxicity and physiological changes induced in the honey bee by the exposure to fipronil and *Bacillus thuringiensis* spores alone or combined. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 205–213, 2016.

RESENDE, M. L. V et al. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Rapp**, v. 14, n. May 2014, p. 129–198, 2006.

RIVA, C. et al. Effect of oral exposure to the acaricide pirimicarb, a new varroacide candidate, on *Apis mellifera* feeding rate. **Pest Manag Sci.**, 2018.

ROESE, A. D.; FILHO, O. F. DE L.; MELO, C. L. P. DE. Efeito de indutores abióticos de resistência na severidade da ferrugem-asiática e na produtividade de soja. **Embrapa Agropecuária Oeste**, v. 62, p. 22, 2012.

RUEPPELL, O. et al. Early life stress affects mortality rate more than social behavior, gene expression or oxidative damage in honey bee workers. **Experimental Gerontology**, 2017.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; BELZUNCES, L.; BONMATIN, J. Lethal and sublethal effects , and incomplete clearance of ingested imidacloprid in honey bees (*Apis mellifera*). **Ecotoxicology**, 2017.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees - A risk assessment. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; WYCKHUYS, K. A. G. Worldwide decline of the entomofauna : A review of its drivers. **Biological Conservation**, v. 232, n. January, p. 8–27, 2019.

SANTOS, A. C. C. et al. Ecotoxicology and Environmental Safety *Apis mellifera* (Insecta : Hymenoptera) in the target of neonicotinoids : A one- way ticket ? Bioinsecticides can be an alternative. v. 163, n. July, p. 28–36, 2018.

SARANDÓN, S. J.; FLORES, C. C. **Agroecología : bases teóricas para el diseño y manejo de agroecosistemas sustentables**. 1. ed. Buenos Aires, Argentina: La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2014.

SCHMEHL, D. R. et al. Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). **JOURNAL OF INSECT PHYSIOLOGY**, 2014.

SGOLASTRA, F. et al. Synergistic mortality between a neonicotinoid insecticide and an ergosterol-biosynthesis-inhibiting fungicide in three bee species. **Pest Management Science**, 2016.

SGOLASTRA, F. et al. Lethal effects of Cr(III) alone and in combination with propiconazole and clothianidin in honey bees. **Chemosphere**, n. lii, 2017.

SHARMA, D.; ABROL, D. P. Contact Toxicity of Some Insecticides to Honeybee *Apis mellifera* (L .) and *Apis cerana* (F .). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 8, n. 1, p. 113–115, 2005.

- SHI, T. et al. Effects of Field-Realistic Concentrations of Carbendazim on Survival and Physiology in Forager Honey Bees (Hymenoptera : Apidae). **Journal of Insect Science**, v. 18, n. July, p. 5–9, 2018.
- SHI, Y.; ZHANG, Y.; SHIH, D. S. Cloning and expression analysis of two β -1,3-glucanase genes from Strawberry. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 9, p. 956–967, 2006.
- SIEDE, R. et al. A long-term field study on the effects of dietary exposure of clothianidin to varroosis-weakened honey bee colonies. **Ecotoxicology**, v. 2013, n. Ec 2013, 2018.
- SILVA-NETO, C. D. M. E. et al. Interaction between biological and chemistry fungicides and tomato pollinators. **Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas**, v. 12, n. 2, p. 425–435, 2018.
- SILVA, O. C. et al. Fontes de fosfito e acibenzolar-S-metilico associados a fungicidas para o controle de doenças foliares na cultura da soja. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 1, p. 72–77, 2013.
- SILVINA, N. et al. Neonicotinoids transference from the field to the hive by honey bees: Towards a pesticide residues biomonitor. **Science of the Total Environment**, v. 581–582, p. 25–31, 2017.
- SIMON-DELISO, N. et al. Toxicity assessment on honey bee larvae of a repeated exposition of a systemic fungicide , boscalid. **Bulletin of Insectology**, v. 70, n. 1, p. 83–89, 2017.
- SIMON-DELISO, N. et al. Time-to-death approach to reveal chronic and cumulative toxicity of a fungicide for honeybees not revealed with the standard ten-day test. **Scientific Reports**, n. April, p. 1–11, 2018.
- SINDIVEG, S. N. DA I. DE P. PARA D. V. Mapeamento de Abelhas Participativo (MAP). **Colmeia Viva**, 2017.
- TADEI, R. et al. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 3277, p. 1–11, 2019.
- TAUTZ, J. **O Fenômeno das Abelhas**. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- TAVARES, D. A. et al. Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages *. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 386–393, 2017.
- THANY, S. H. et al. Similar comparative low and high doses of deltamethrin and acetamiprid differently impair the retrieval of the proboscis extension reflex in the forager honey bee (*Apis mellifera*). **Insects**, v. 6, n. 4, p. 805–814, 2015.
- THERNEAU, T. **A Package for Survival Analysis in S. Version 2.38**. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=survival>>.
- THOMAZONI, D. et al. Selectivity of insecticides for adult workers of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 35, n. 2, p. 173–176, 2009.
- TOMÉ, H. V. V. et al. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. **Chemosphere**, v. 124, n. 1, p. 103–109, 2015a.

- TOMÉ, H. V. V et al. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species : impact on survival and activity. **Annals of Applied Biology**, v. 167, p. 186–196, 2015b.
- TOSI, S. et al. Neonicotinoid pesticides and nutritional stress synergistically reduce survival in honey bees. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 284, 2017.
- TOSI, S. et al. A 3-year survey of Italian honey bee-collected pollen reveals widespread contamination by agricultural pesticides. **Science of the Total Environment**, v. 615, p. 208–218, 2018.
- TOSI, S.; NIEH, J. C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, alters honey bee activity, motor functions, and movement to light. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017a.
- TOSI, S.; NIEH, J. C. A common neonicotinoid pesticide , thiamethoxam , alters honey bee activity , motor functions , and movement to light. **Scientific Reports**, n. June, p. 1–13, 2017b.
- VANDEMBERG, J.; SHIMANUKI, H. Effect of amitraz treatments on honey bees and on the honey bee tracheal mite. **Apidologie**, v. 21, p. 243–247, 1990.
- VANTINI, J. DA S. et al. Expressão gênica diferencial da b-1,3-Glucanase (PR-2) nas interações compatível e incompatível entre *Xanthomonas axonopodis* e *Citrus sinensis*. **Científica**, v. 36, n. January 2008, p. 139–147, 2008.
- VIDAU, C. et al. Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.
- WADE, A. et al. Combined Toxicity of Insecticides and Fungicides Applied to California Almond Orchards to Honey Bee Larvae and Adults. **Insects**, v. 10, n. 1, p. 20, 2019.
- WANG, T.; BROWN, M. J. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: Validation and comparison with RNase protection. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 1, p. 198–201, 1999.
- WERNECKE, A. et al. Tank mixtures of insecticides and fungicides , adjuvants , additives , fertilizers and their effects on honey bees after contact exposure in a spray cham. **13th international symposium of the ICP-PR Bee protection group**, v. 13, n. 1, p. 137–141, 2017.
- WILLIAMSON, S. M.; WRIGHT, G. A. Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. **J. Exp. Biol. Advance Online Articles**, n. February, 2013.
- WITTER, S. et al. **As abelhas e a agricultura**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2014.
- WOLFF, L. F.; REIS, V. D. A. DOS; SANTOS, R. S. S. DOS. **Abelhas melíferas: bioindicadores de qualidade ambiental e de sustentabilidade da agricultura familiar de base ecológica**. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 2008.
- WONG, M. J.; ID, L. L.; BERENBAUM, M. R. Biphasic concentration-dependent interaction between imidacloprid and dietary phytochemicals in honey bees (*Apis mellifera*). **PLoS ONE**, v. 13, p. 1–15, 2018.
- YANG, Y. et al. Effects of three common pesticides on survival, food consumption

and midgut bacterial communities of adult workers *Apis cerana* and *Apis mellifera*. **Environmental Pollution**, 2019.

YAO, J. et al. Influences of acephate and mixtures with other commonly used pesticides on honey bee (*Apis mellifera*) survival and detoxification enzyme activities. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology**, p. #pagerange#, 2018.

YASSINE, A. et al. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides : effects on behavior. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 113–122, 2009.

ZHU, W. et al. Four Common Pesticides , Their Mixtures and a Formulation Solvent in the Hive Environment Have High Oral Toxicity to Honey Bee Larvae. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

ZHU, Y. C. et al. Spray Toxicity and Risk Potential of 42 Commonly Used Formulations of Row Crop Pesticides to Adult Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 6, p. 2640–2647, 2015.

ZHU, Y. C. et al. Feeding toxicity and impact of imidacloprid formulation and mixtures with six representative pesticides at residue concentrations on honey bee physiology (*Apis mellifera*). **PlosOne**, p. 1–19, 2017.

ZHU, Y. C.; YAO, J.; ADAMCZYK, J. Long - term risk assessment on noneffective and effective toxic doses of imidacloprid to honeybee workers. **Journal of Applied Entomology**, n. May, p. 1–11, 2018.

ZORAN, S. et al. Looking for the causes of and solutions to the issue of honey bee colony losses. **Acta Veterinaria Beograd**, v. 69, n. 1, p. 1–31, 2019.