

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**Efeito de fungicida de ação tríplice na expressão de genes
em abelhas melíferas bem e mal nutridas**

Aline Yukari Kato
Zootecnista

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**Efeito de fungicida de ação tríplice na expressão de genes em
abelhas melíferas bem e mal nutridas**

Aline Yukari Kato

Orientador: Prof. Dr. Daniel Nicodemo

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

2023

K19e Kato, Aline Yukari
Efeito de fungicida de ação tríplice na expressão de genes em
abelhas melíferas bem e mal nutridas / Aline Yukari Kato. --
Jaboticabal, 2023
48 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Daniel Nicodemo

1. Bixafem. 2. Imunidade. 3. Nutrição. 4. Protiococonazol. 5.
Trifloxistrombina. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DE FUNGICIDA DE AÇÃO TRÍPLICE NA EXPRESSÃO DE GENES EM ABELHAS MELÍFERAS BEM E MAL NUTRIDAS

AUTORA: ALINE YUKARI KATO

ORIENTADOR: DANIEL NICODEMO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência Animal, área: Nutrição Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. DANIEL NICODEMO (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal / FCAT Unesp Dracena



Documento assinado digitalmente
DANIEL NICODEMO
Data: 04/10/2023 11:48:05-0380
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. JAQUELINE DALBELLO BILLER (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal / FCAT UNESP Dracena



Documento assinado digitalmente
JAQUELINE DALBELLO BILLER
Data: 04/10/2023 16:38:01-0380
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. RICARDO DE OLIVEIRA ORSI (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva / FMVZ UNESP Botucatu



Documento assinado digitalmente
RICARDO DE OLIVEIRA ORSI
Data: 04/10/2023 13:04:40-0380
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jaboticabal, 03 de outubro de 2023

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Aline Yukari Kato, nascida em 18 de janeiro de 1996 na cidade de Kawaguchi, província de Saitama no Japão, filha de Hiroaki Kato e Neusa Watanabe Kato. Ingressou em fevereiro de 2016, no curso de Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita de Filho” - Unesp - Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Campus de Dracena/SP, e graduou-se em fevereiro de 2021. Em agosto de 2021, deu início ao curso de Mestrado em Nutrição Animal pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal/SP, onde a mestrandia foi bolsista pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) até a conclusão do curso.

“Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade”

Marie Curie

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente para à minha família que me apoiou e me incentivou a prosseguir com o mestrado;

Dedico este trabalho especialmente ao meu avô materno, Kiyomasso Watanabe (*in memoriam*) que, juntamente com a minha avó, me acolheu durante todo o meu período de graduação;

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Hiroaki Kato e Neusa Watanabe Kato, que me incentivam incondicionalmente a dedicar aos estudos e na maioria das vezes nunca mediram esforços quando o assunto era sobre o meu acesso à educação de qualidade desde à minha tenra idade;

Aos meus avós maternos que me receberam de braços abertos para eu morar sob o teto deles durante toda a minha época de graduação e o início do meu mestrado;

Ao Prof.^o Dr.^o Daniel Nicodemo, que me orientou com muita paciência, boa vontade, profissionalismo e gentileza durante a minha graduação, como também me aceitou para o programa de mestrado e me guiou durante todo meu percurso, sem negar apoio em nenhum momento sequer;

A Prof.^a Dr.^a Jaqueline Dalbello Biller e a Simone Benetti que me orientaram nas minhas análises laboratoriais;

Ao grupo NOS - Núcleo de Organização Sustentável, principalmente aos integrantes que eu conheci ao longo do meu mestrado, que me proporcionaram inúmeras experiências que agregaram para o meu aprendizado e me auxiliaram de alguma forma no meu experimento;

Aos meus queridos amigos: Laura (Kpeta), Melissa (Damata) e o Victor (Risada), os quais conheci durante minha graduação e que - pela bênção do universo - os reencontrei durante o meu percurso do mestrado, pois eles que me proporcionaram momentos maravilhosos e divertidos que deram mais brilho para minha vida durante os meus dias na Unesp Dracena;

A FCAV - Unesp Jaboticabal pelo programa de pós-graduação de Ciência Animal que possibilitou o meu desenvolvimento como uma mestrande e a minha *alma-mater*, a FCAT - Unesp Dracena, que possibilitou o acontecimento do meu experimento e pelo ambiente sem igual que sempre zelou pelo bem estar dos alunos;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

RESUMO	Pág. I
ABSTRACT	II
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	01
1. Introdução	01
2. Nutrição das abelhas	04
3. Efeito dos agrotóxicos nas abelhas	05
REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO 2 - Bixafen, protioconazol e trifloxistrobina alteram a expressão gênica em abelhas melíferas com suplementação ou restrição alimentar	19
RESUMO	19
ABSTRACT	20
INTRODUÇÃO	21
MATERIAL E MÉTODOS	22
Local do experimento	22
Determinação das doses experimentais	23
Manejo alimentar das colônias de abelhas melíferas	26
Avaliação da expressão gênica	26
Extração de RNA e construção de biblioteca de cDNA	27
Determinação molecular da expressão de genes	29
RESULTADOS	30
Avaliação dos P. A. na calda de aplicação do fungicida	30
Contaminação das abelhas melíferas fixadas em plantas de algodão	30
Manejo alimentar das colônias	31
DISCUSSÃO	35
Contaminação das abelhas melíferas fixadas em plantas de algodão	35
Manejo alimentar das colônias	37
Expressão de genes importantes para a saúde das abelhas	38
CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

Expressão gênica em abelhas melíferas bem e mal nutridas e intoxicadas com fungicida de ação tríplice

RESUMO

O uso constante de agrotóxicos em cultivos agrícolas, embora seja necessário para o combate às pragas e doenças, é prejudicial para a manutenção das populações de agentes polinizadores, inclusive as abelhas. Dentre tais produtos, destacam-se os fungicidas, pois seu uso recorrente tem ocasionado a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes. Dessa forma, doses maiores dos fungicidas comerciais são empregadas no campo, até que produtos com novos princípios ativos sejam disponibilizados ao agricultor. Uma nova estratégia para o combate de fungos fitopatogênicos é a formulação de fungicidas com três princípios ativos, visando o controle de populações de fungos em diferentes fases do ciclo de vida. Se esta alternativa tem se mostrado promissora do ponto de vista agrônomo, para apicultores tal medida aparenta ser preocupante. Nesse contexto agrícola, no qual é usual o plantio de vastas áreas com monoculturas, há de se considerar o estado nutricional e imunológico desses insetos polinizadores, haja vista que deficiências nutricionais podem implicar em maior suscetibilidade a agentes estressores, como os fungicidas. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos dos fungicidas bixafen, protioconazol e trifloxistrobina, isolados ou em associação, sobre a expressão de genes com função inerente a processos de detoxificação, nutrição, longevidade e imunidade de abelhas melíferas, que tiveram a sua alimentação suplementada ou restrita, utilizando-se doses dos fungicidas que podem contaminar as abelhas quando a aplicação é realizada de acordo com as recomendações agrônomicas. Neste ensaio, foram estabelecidas duas doses de contaminação: 1 e 7 µg de cada fungicida por abelha. O manejo alimentar consistiu em alimentar cinco colônias com dietas formuladas com ingredientes energéticos e proteicos por 15 semanas. Durante o mesmo período, outro grupo de cinco colônias não teve sua alimentação suplementada e para restringir o consumo de alimento proteico, foi colocado um coletor de pólen no alvado de cada colmeia. Após este período, foram coletadas abelhas campeiras, que foram contaminadas por contato com as doses preestabelecidas. Após 48h da contaminação, as abelhas foram dissecadas, e os abdomens sem intestino foram utilizados para a análise de expressão gênica por meio de PCR em tempo real. Houve alteração da expressão dos 10 genes avaliados com os três fungicidas, com destaque para a infrarregulação observada quando as abelhas foram contaminadas com a maior dose dos três fungicidas em associação. Abelhas do grupo de colônias com suplementação alimentar apresentaram menos diferenças em relação ao controle (sem fungicida) em relação às abelhas do grupo com restrição alimentar. Os fungicidas estudados podem comprometer a saúde das abelhas, principalmente quando a contaminação se dá por meio da associação dos três fungicidas em dose de 7 µg de cada fungicida por abelha.

Palavras-chave: bixafen, imunidade, nutrição, proticonazol, toxicidade, trifloxistrobina.

Gene expression in well and poorly nourished honey bees contaminated with a triple action fungicide

ABSTRACT

The constant use of pesticides in agricultural crops, although necessary to control pests and diseases, is detrimental to the maintenance of populations of pollinating agents, including bees. Among such products, fungicides stand out, as their recurrent use has led to the selection of resistant phytopathogenic fungi. Thus, larger doses of commercial fungicides are used in the field, until products with new active ingredients are made available to the farmers. A new strategy for combating phytopathogenic fungi is the formulation of fungicides with three active ingredients to control fungal populations at different stages of their life cycle. If this alternative has been shown to be promising from an agronomic point of view, for beekeepers such a measure appears to be worrying. In this agricultural context, in which it is usual to plant vast areas with monocultures, the nutritional and immunological status of these pollinating insects must be considered, given that nutritional deficiencies may result in greater susceptibility to stressors, such as fungicides. The objective of this work was to study the effects of the fungicides bixafen, prothioconazole and trifloxystrobin, alone or in association, on the expression of genes with an inherent function in detoxification processes, nutrition, longevity, and immunity of honey bees, which had their food supplemented or restricted, using doses of fungicides that can contaminate the bees when the application is carried out according to agronomic recommendations. In this test, two contamination doses were established: 1 and 7 μg of each fungicide per bee. Feeding management consisted of feeding five colonies with diets formulated with energy and protein ingredients for 15 weeks. During the same period, another group of five colonies did not have their food supplemented and to restrict the consumption of protein food, a pollen trap was placed on the front of each hive. After this period, forager bees were collected, which were contaminated by contact with pre-established doses. After 48 hours of contamination, the bees were dissected and the abdomens without intestines were used for gene expression analysis using real-time PCR. There was a change in the expression of the 10 genes evaluated with the three fungicides, with emphasis on the downregulation observed when the bees were contaminated with the highest dose of the three fungicides in combination. Bees in the group of colonies with food supplementation showed less differences in relation to the control (without fungicide) in comparison to the bees in the group with food restriction. The fungicides studied can compromise the bee's health, especially when contamination occurs through the association of the three fungicides at a dose of 7 μg of each fungicide per insect.

Keywords: bixafen, immunity, nutrition, prothioconazole, toxicity, trifloxystrobin.

Capítulo 1 – Considerações gerais

1. Introdução

A interação dos polinizadores com as angiospermas apresenta vantagens para os organismos envolvidos nesta relação, com os polinizadores sendo favorecidos pelo acesso ao pólen, néctar e local para nidificação. Para as plantas, durante a coleta dos recursos alimentares pelos visitantes florais, pode ocorrer a polinização cruzada que favorece a produção de frutos e sementes (Giannini et al., 2015; Quinlan e Grozinger, 2023). Sendo assim, os agentes polinizadores têm grande relevância para a reprodução e perpetuação de inúmeras espécies de plantas, contribuindo para a manutenção da biodiversidade e do equilíbrio do ecossistêmico natural, além de contribuir para o incremento da produção nos agroecossistemas (Biesmeijer et al., 2006; Potts et al., 2010; IPBES, 2016; Roubik, 2018).

O grupo de agentes polinizadores bióticos é formado por aves, lagartos, moluscos, morcegos, outros mamíferos, e, principalmente, os insetos (Potts et al., 2016; Roubik, 2018; Wolowski et al., 2019). Dentre os insetos, as abelhas compõem um grupo de destaque entre todas as espécies de polinizadores, pois, durante todo o seu ciclo de vida são totalmente dependentes das plantas para a sua alimentação. Realizando visitas às flores de forma constante e padronizada, evidenciam seu comportamento de persistência, no que diz respeito à busca pelas melhores fontes de recursos florais, considerando-se a qualidade e a quantidade do néctar e ou pólen, além da distância da fonte alimentar, que implica em economia do uso de energia pelas abelhas (Seeley et al., 1991; Klein et al., 2007; Roubik, 2018).

De todos os agentes polinizadores, as abelhas representam o grupo de maior importância econômica, sendo responsáveis por contribuírem com cerca de 35% da produção mundial de alimentos (Klein et al., 2007), e por colaborarem na polinização de até 73% de espécies cultivadas no mundo (Ricketts et al., 2008). De um modo geral, as abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) são consideradas os agentes polinizadores mais eficientes. Isso é possível devido às características comportamentais e morfológicas favoráveis deste inseto, como: presença de pelos em todo o corpo e de estruturas apropriadas para coleta e transporte de pólen, habilidade de recrutamento e formação de colônias com grande número de indivíduos (Neff e Simpson 1993; Schlindwein, 1998; Peruquetti et al., 2017).

O manejo de colônias de abelhas melíferas é praticado há séculos. Estas abelhas são rústicas e capazes de sobreviver em vários biomas e coletam recursos florais em grande quantidade para manutenção do nível populacional da colônia. Em virtude de suas características biológicas e do seu alto nível de plasticidade, no que diz respeito a sua capacidade de sobreviver em ecossistemas variados, estas abelhas são os agentes polinizadores mais utilizados para polinizar inúmeras culturas de interesse agrícola e para produzir mel e outros produtos apícolas (Pires et al., 2016).

O expressivo crescimento da população humana, principalmente a partir do século XX, implicou em aumento da produção de alimentos para atender a maior demanda por estes recursos. Sendo assim, a agricultura foi transformada por meio da introdução de novas tecnologias que otimizaram a produção e que permitiram a diminuição das perdas das safras por conta do uso de agrotóxicos que controlam as pragas e doenças, resultando, em regra, em processos produtivos mais eficientes e intensivos (Shiva, 1993; Ribas e Matsumura, 2009; Pingali, 2012; Oliveira et al., 2013).

Já na terceira década do século XXI, o setor agrícola continua em processo de evolução, buscando novas tecnologias com o objetivo de aumentar a capacidade de produção e lucratividade. Estima-se que até o ano de 2050, a agricultura aumente mais 50% sua capacidade de produção para poder atender a necessidade alimentar de uma população ainda crescente, que deve chegar a nove bilhões de pessoas até a metade deste século (FAO 2017; Nações Unidas, 2019; Armanda et al., 2019).

Contudo, o aumento de produtividade no campo, baseado no aumento da utilização de energia auxiliar nos sistemas produtivos e no cultivo de monoculturas, têm implicado em efeitos negativos para o meio ambiente, como a redução da biodiversidade, maiores níveis de infestação de pragas e doenças e degradação dos recursos naturais, que implicam em maior dependência do uso de agrotóxicos, intensificando o desequilíbrio dos ecossistemas agrícolas e naturais (Shiva, 1993; Pingali, 2012; Tyagi, 2016).

De acordo com Freitas et al. (2009), o desmatamento e a implantação de monoculturas acabam reduzindo a diversidade de floradas disponíveis para as abelhas, que são fonte de recursos alimentares com variação nutricional qualitativa. A expansão das áreas de monocultivos, como a de soja, restringe a dieta das abelhas a recursos alimentares monoflorais, fato que pode contribuir para a desnutrição e maior

suscetibilidade destes insetos a agentes estressores. Enquanto o desmatamento reduz o habitat natural das abelhas, a monocultura reduz a diversidade do pasto apícola, comprometendo a quantidade e a qualidade do alimento destes insetos (Vaudo et al., 2015).

A prática da agricultura convencional, com uso de grandes áreas para o cultivo de monoculturas pode tornar a paisagem nutricionalmente restrita, no que se refere à disponibilidade de alimentos para os agentes polinizadores bióticos, mesmo com possibilidade de encontrarem alimento em grande abundância em poucos dias ou semanas de cada ano, em função da floração das culturas agrícolas que predominam neste ambiente. Nos outros meses do ano, há escassez de alimentos para as abelhas, tornando estas regiões menos favoráveis para a sobrevivência dos polinizadores (Blaauw e Isaacs et al., 2014; Negri et al., 2019). O cultivo de monoculturas pode não atender a demanda nutricional das abelhas como fonte exclusiva de alimento para estes insetos, pois este tipo de pasto apícola tem capacidade de produção de pólen atrelada a apenas uma cultura, limitando a oferta de proteínas e aminoácidos essenciais para as abelhas, fato que pode implicar em desnutrição, mesmo havendo alimentos disponíveis (Alaux et al., 2010).

O desequilíbrio ecológico desfavorece ainda o controle biológico natural das pragas, que pode ser afetado com a simplificação da paisagem, pois, a ocorrência de inimigos naturais de pragas das culturas agrícolas é prejudicada, favorecendo-se a ocorrência de pragas. Nesse contexto, as aplicações de agrotóxicos são recorrentes a fim de se controlar as pragas agrícolas (Meehan et al., 2011).

Para combater pragas e doenças na agricultura são utilizados agrotóxicos, porém, tais produtos quando aplicados no campo não atingem somente a cultura alvo com a praga que se deseja controlar. Essas substâncias químicas podem contaminar o solo, a água e outros seres vivos que quaisquer prejuízos trazem aos sistemas agrícolas (Margni et al., 2002; Godfray et al., 2014). Além disso, o uso desenfreado de agrotóxicos pode acarretar em seleção indireta de pragas, favorecendo a sobrevivência daquelas que se tornam resistentes a estes produtos sintéticos, além da morte de inimigos naturais dessas pragas e de agentes polinizadores, intensificando o desequilíbrio dos ecossistemas (Ehlers, 2017; Togni et al. 2019).

2. Nutrição das abelhas

As abelhas possuem necessidades nutricionais específicas para atingir o seu potencial de produção e reprodução. Para isso, elas precisam de alimentos que forneçam proporções adequadas de carboidratos, aminoácidos, lipídios, vitaminas, sais minerais e água. Cada abelha pode ter uma necessidade nutricional e mecanismos de alimentação diferenciados para processar os alimentos conforme a casta pertencente. Caso essas necessidades não sejam atendidas, a postura da rainha é diminuída e, em poucas semanas, o número de abelhas operárias também diminui, fazendo com que o ritmo de trabalho da colônia entre em declínio, resultando assim em queda da produtividade da colmeia (Pires et al., 2016; DeGrandi-Hoffman et al., 2018).

O pólen e o néctar são as fontes fundamentais para alimentar as abelhas e são oriundos das flores. Estes recursos são utilizados ao longo de toda a vida destes insetos, com proporções diferentes quando se comparam crias e adultos. Vale destacar que as abelhas operárias usam esses insumos para sintetizar cera, útil para a construção do ninho, e geleia de operária e geleia real, utilizadas para alimentação das crias de operárias e zangões, e rainhas, respectivamente (Castagnino, 2008; Gois et al., 2010).

O néctar possui a função de suprir a demanda energética das abelhas, sendo transformado e armazenado nos alvéolos dos favos como mel, sendo útil na alimentação das abelhas, principalmente em épocas de escassez de néctar no campo. E o tal insumo é a fonte principal de carboidrato (energia) para as abelhas, sendo importante para a produção de calor corporal, contrações musculares, funcionamento dos órgãos vitais e das glândulas (Sereia, 2009; Degirmenci et al., 2018).

Os açúcares do néctar são oriundos dos nectários extraflorais, sendo os principais tipos de açúcares encontrados em maioria dos néctares: sacarose, glicose e frutose. Em composição menor podem ser encontrados também outras moléculas de açúcares (Ricigliano et al., 2017; Roy et al., 2017).

O néctar ingerido pela abelha fica armazenado no papo do inseto, onde o material é transformado em mel através da ação de enzimas (diástase, glucose oxidase e invertase), assim para finalmente ser armazenado nos favos. O mel além de ser considerado um alimento, possui benefícios como proteção contra patógenos

e toxinas, auxílio contra estresse pelo frio, regulação no crescimento e longevidade (Berenbaum & Calla, 2021; Tsuruda et al., 2021).

O pólen é fonte de aminoácidos, lipídeos, vitaminas e minerais para o desenvolvimento corporal das abelhas, muito demandado na fase de cria e nos primeiros dias de vida do inseto adulto. A água tem utilidade para dissolver o mel, contribuir para o transporte metabólico de substâncias e como meio para reações químicas no organismo da abelha, além de ser útil para controlar a temperatura da colônia. A ausência de qualquer um dos nutrientes pode afetar o desenvolvimento, a manutenção e a reprodução das colônias. A carência de néctar implica em falta de energia para produzir mais crias, e o pólen em quantidade insuficiente torna a colônia inapta para cuidar das crias, além de comprometer a longevidade dos indivíduos adultos (Sereia, 2009).

Quando a reserva de alimento na colmeia é diminuída e não é repostada em virtude da escassez de alimento no campo, ocorre deficiência nutricional da colônia, e, conseqüentemente, há impacto no estado nutricional das operárias e na forma de cuidado das crias em desenvolvimento. Para garantir o desenvolvimento de algumas crias, pode haver canibalismo de certas larvas para que outras sejam devidamente alimentadas e possam completar seu desenvolvimento na fase de cria de tal modo que, na fase adulta, o inseto consiga realizar plenamente suas funções. Se a demanda nutricional é deficitária, o desenvolvimento da colônia pode ser comprometido, implicando em redução do nível populacional e até maior suscetibilidade a agentes estressores (Brodschneider e Crailsheim, 2010).

Foi relatado por Naug e Gibbs (2009), que a alimentação precária torna a colmeia mais vulnerável às doenças e aos inimigos naturais e xenobióticos, podendo chegar ao ponto das abelhas não conseguirem mais executar devidamente suas funções. A escassez de alimento, se persistir por um grande período, além de causar declínio populacional da colônia, pode implicar na morte da colmeia (Li et al., 2012; Di Pasquale et al., 2013).

3. Efeito dos agrotóxicos nas abelhas

No momento que as abelhas forrageiras estão visitando as flores de uma área de cultivo agrícola, buscando coletar pólen, néctar e ou matéria prima para a produção

de própolis, estes insetos podem entrar em contato direto com partículas de agrotóxicos que estão suspensos no ar e ou que permanecem nas plantas após a aplicação destes produtos (Jivan, 2013). Os agrotóxicos, quando aplicados nas áreas de cultivo, podem ser absorvidos pelas plantas. A contaminação das abelhas pode ocorrer por meio de contato no momento da aplicação. Caso os agrotóxicos utilizados sejam produtos sistêmicos, pode haver contaminação do pólen e do néctar, mesmo com aplicação realizada antes do período de floração. O alimento pode prejudicar a saúde da abelha campeira que faz a coleta e daqueles que farão uso do alimento transportado para a colônia, principalmente as crias (Chauzat et al., 2006).

Os agrotóxicos podem comprometer o nascimento das abelhas e afetar a sua imunidade, aumentando a suscetibilidade a alguns vírus (DeGrandi-Hoffman et al., 2013; DeGrandi-Hoffman et al., 2015). O uso não controlado dos agrotóxicos acaba contribuindo para o declínio de várias espécies de abelhas, inclusive as abelhas melíferas (Gill, 2012). Henry (2012), relata que os princípios ativos contidos nos agrotóxicos podem afetar a capacidade de aprendizado e de memória desses insetos, assim como o senso de direção, dificultando o retorno das abelhas para as respectivas colmeias. Por possuírem costumes relacionados à vida social, as abelhas têm comportamentos coletivos para combater as doenças em nível de colônia, tal comportamento é conhecido como imunidade social (Cremer et al., 2007).

Dessa forma, as abelhas, além de se comunicarem e agirem mediante as condições da colônia, fazem também escolhas individuais em benefício da colônia, de forma que funcionem como um superorganismo (Moritz e Fuchs, 1998). Quando a colmeia se encontra em estado de exposição a um agente estressor, a capacidade de estabelecimento da imunidade social fica comprometida, podendo causar até a morte da colônia (Archer et al., 2014).

O sistema endócrino da abelha também pode ser afetado pelos agrotóxicos, que podem provocar a produção descontrolada do hormônio juvenil III, que é responsável por regular o comportamento das abelhas operárias conforme as respectivas castas. O excesso do hormônio juvenil III causa a aceleração da maturidade comportamental, com as abelhas nutrizas não exercendo mais a função de alimentar as crias e tornando-se forrageiras (Huang et al., 1991; Sullivan et al., 2000).

As consequências da transição acelerada da fase de nutrízes para a fase das campeiras são o aumento de infecção por vírus, infestação de ácaros *Varroa*, incidência de nosemose, comprometimento na produção de cera e na nutrição da colônia. Estes fatores comprometem a organização social das abelhas, assim gerando desordem na colônia e redução da longevidade das abelhas (Janmaat and Winston, 2000; Toth and Robinson, 2005; Tofilski, 2009; Thompson et al., 2007; DeGrandi-Hoffman et al., 2010; Khoury et al., 2011).

Os agrotóxicos são conhecidos como substâncias fabricadas com o objetivo de controlar pragas e doenças em vários setores de produção, em armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, em pastagens, em matas nativas e ambientes hídricos (Brasil, 1989). No cultivo de plantas, estes produtos são importantes para combater pragas, doenças e ervas daninhas que interferem na produção quando não são devidamente tratadas (Boneti et al., 2002; Bleicher et al., 2002; Botton et al., 2006).

De acordo com Cavalcanti et al. (2010), os agrotóxicos podem ser classificados quanto à finalidade de uso em: acaricidas, para controlar ácaros; bactericidas, para combater bactérias; fungicidas, para controlar fungos; herbicidas, para controlar plantas daninhas; inseticidas, para controlar insetos e nematicidas, para combater nematóides. O fungo claramente é o alvo dos fungicidas, assim como também é filogeneticamente distinto das abelhas, por isso tal produto não é visto por muitos como um grande problema para as abelhas (Kubik et al., 1999; National Honey Bee Health Stakeholder, 2012).

Alguns fungicidas não possuem restrição de aplicação para o período de floração de culturas agrícolas e, quando são usados, podem contaminar as abelhas e os recursos florais que elas coletam, podendo causar toxicidade letal ou subletal nas abelhas adultas (Pettis et al. 2013; Johnson, 2015). Devido à falta de restrição para a aplicação durante os períodos de florada, os fungicidas são a classe de agrotóxicos mais frequentemente detectados em colônias. Alguns fungicidas até apresentam efeitos de repelência para os insetos ao serem aplicados nas plantas, o que pode reduzir o forrageamento feito pelas abelhas, porém, esta característica é pouco efetiva e, em geral, há grande chance das colônias serem intoxicadas com fungicidas (Mullin et al., 2010).

Um fungicida sistêmico age em sítios bioquímicos específicos e possui ação de proteção, cura ou de erradicação; dessa forma, ele pode se difundir por meio de mobilidade apoplástica, que é a movimentação livre no espaço intracelular e na parede celular dos tecidos vegetais, ou sofrer absorção pelo floema para realizar a mobilidade simplástica, que é o transporte através dos plasmodesmos das células vegetais. Um fungicida comercial de tríplice ação está disponível no mercado há poucos anos e por meio do seu amplo espectro de ação e combate de uma praga em diferentes estágios de vida ao mesmo tempo, tem sido utilizado em grandes culturas como algodão, girassol, milho e soja. No Brasil, este produto é comercialmente chamado de Fox Xpro (Bayer, 2019).

Este fungicida comercial é composto por três princípios ativos. O primeiro deles é o bixafen, do grupo Pirazol-4-carboxamida, que inibe o complexo II da cadeia respiratória (cuja função é auxiliar no transporte de elétrons), causando redução dos níveis de ATP e liberação de oxigênio. O segundo princípio ativo, a trifloxistrobina, pertencente ao grupo das estrobilurinas, inibe a transferência de elétrons no complexo III que faz parte da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. E, por fim, o protioconazol, integrante do grupo Triazolintiona, age na inibição da demetilação do C14 e realiza a biossíntese de esterol (Oliver e Hewitt, 2014).

Yang et al. (2011), citam que os fungicidas podem afetar as estruturas biológicas dos animais, prejudicando a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, assim como podem comprometer a estrutura e funcionamento da membrana celular, transdução de sinais, respiração, mitose e divisão celular. Alguns fungicidas, como a piraclostrobina, que é uma estrobilurina assim como a trifloxistrobina, inibe as enzimas relacionadas à síntese de ATP tanto em fungos como em abelhas (Nicodemo et al., 2020).

Os efeitos da exposição a fungicidas em abelhas melíferas foram mais pesquisados em abelhas na fase de cria, dada a grande presença deste agrotóxico no pão das abelhas. A contaminação por fungicida, em dose ambientalmente relevante, pode provocar efeitos morfogênicos que prejudicam o desenvolvimento das larvas e aumentam as taxas de mortalidade nesta fase inicial de vida (Mussen et al., 2004; Zhu et al., 2014).

Quando as abelhas são expostas a agrotóxicos, se tornam mais vulneráveis aos agentes patogênicos que podem causar problemas mais graves devido ao estado de fragilidade em que o inseto se encontra. A contaminação de abelhas com neonicotinoides pode potencializar os efeitos negativos de dois patógenos: o vírus BQCV (“Black Queen Cell Virus”) e o microsporídio *Nosema ceranae* (Doublet et al., 2015).

Nas abelhas nutrizas, a exposição a doses subletais de fungicidas pode causar alterações no desenvolvimento de glândulas mandibulares e hipofaríngeas (Zaluski et al., 2017). De acordo com Yoder et al. (2013), a contaminação por fungicidas afeta a manutenção de fungos benéficos que têm a função de preservar e transformar o alimento proteico das abelhas. Sendo assim, é reduzido o valor nutricional deste alimento para estes insetos.

Doses letais de agrotóxicos são capazes de matar as abelhas individualmente como também toda a colônia em poucos dias (Atkins, 1992; Johnson et al., 2010). Já o efeito subletal de um agrotóxico pode prejudicar os integrantes das colônias de várias formas, como a capacidade de aprendizado, memória, senso de direção no campo (Frost et al., 2013; Williamson e Wright, 2013), como também o rendimento de trabalho, capacidade das abelhas adultas de cuidarem das crias e a expectativa de vida destes insetos (Wu et al., 2011; Zhu et al., 2014).

A exposição a agrotóxicos em zangões afeta a viabilidade espermática, o que influencia na reprodução das abelhas (Burley et al., 2008), além do peso e a longevidade, que tendem a ser menores (Rinderer et al., 1999). No caso das rainhas, o agrotóxico pode comprometer o peso ao chegar na fase adulta (Haarmann et al., 2002; Pettis et al., 2004), a capacidade de armazenamento de espermatozoides (Haarmann et al., 2002), a taxa de postura dos ovos (Collins et al., 2004; Haarmann et al., 2002) e o funcionamento dos ovários (Haarmann et al., 2002). A alta exposição aos agrotóxicos também reduz drasticamente a produção de rainhas (Collins et al., 2004; Pettis et al., 2004).

O efeito da intoxicação por agrotóxicos, em nível celular, podendo induzir a ativação das vias de intoxicação (Boncristiani et al., 2012; Johnson et al., 2006; Johnson et al., 2009; Johnson et al., 2012; Mao et al., 2011) e altera também a expressão de genes relacionados a imunidade (Gregorc et al., 2012). A contaminação

por agrotóxicos afeta a expressão de genes que estão relacionados com certas funções fisiológicas vitais para as abelhas operárias. Vale lembrar que alterações da expressão gênica são um importante sinalizador do impacto dos agrotóxicos na sobrevivência da colmeia, principalmente quando as abelhas estão em estado de escassez de alimento (Tomé et al., 2020).

Foi constatado que a dosagem de $2\mu\text{l L}^{-1}$ do inseticida imidacloprido pode alterar a expressão gênica da abelha melífera. Neste estudo, foram utilizadas larvas submetidas a intoxicação, que aumentaram a expressão de genes relacionados à produção de enzimas de detoxificação, causando maior desgaste celular devido a tal produção, que resultou em diminuição de expectativa de vida e aumento da mortalidade larval (Derecka et al., 2013).

Foi reconhecido um inibidor de imunidade conhecido como imunomodulador NF-kB, que surge por meio da expressão de gene por consequência da exposição das abelhas aos agrotóxicos, o que implica no aumento da replicação de patógenos devido à queda da imunidade (Di Prisco et al., 2013). Nesse caso, a exposição ao agrotóxico aumenta a propensão da abelha contrair o vírus da asa deformada e isso é possibilitado devido ao aumento da atividade do imunomodulador NF-kB (Nazzi et al., 2012).

A desnutrição também afeta o desempenho imunológico das abelhas, pois a composição da hemolinfa desses insetos depende diretamente da qualidade nutricional da dieta (De Grandi-Hoffman et al., 2010). Uma dieta que possui baixo teor de proteína prejudica a imunidade da abelha, pois a resposta imune do animal é comprometida por causa da baixa disponibilidade de aminoácidos essenciais, que são cruciais para produção de peptídeos do sistema imune, e o baixo nível de carboidratos provoca a falta de energia metabólica para o funcionamento dos processos relacionados ao sistema imunológico das abelhas (Alaux et al., 2010; Cotter et al., 2011).

A dieta desbalanceada afeta também a expressão de alguns genes como: TOR, SOD (superóxido dismutase) e GPx (glutathione peroxidase), todos relacionados ao sistema antioxidante. Estes genes estão ligados a detoxificação e falhas neste processo podem comprometer a resposta imunológica e genes envolvidos na plasticidade neural, que está relacionada com a capacidade de aprendizado das

abelhas campeiras. Situações nas quais as abelhas passam por períodos de desnutrição e são acometidas por outros fatores estressantes como contaminação por agrotóxicos e infecção por patógenos pode ser uma das causas do desaparecimento das abelhas, em virtude de alterações de muitos processos ligados ao metabolismo, imunidade e plasticidade neural, que são provocadas pelos fatores citados anteriormente, e os mesmos comprometem vários genes e provocam mais desgastes nas células, resultando em alta mortalidade de abelhas (Wiston, 2003; Naug, 2009; Martinelli et al., 2017).

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de três princípios ativos com ação fungicida sobre a expressão dos genes Superóxido Desmutase, Catalase, Glutathione Peroxidase-1, Glutathione S-transferase-1, Citocromo P450 306A1, Vitelogenina, Defensina-1, Himenoptaecina, Apidaecina e Abaecina em abelhas melíferas submetidas ao manejo de suplementação ou restrição alimentar, a partir do uso de doses isoladas ou em conjunto dos princípios ativos que podem acometer as abelhas quando a utilização dos fungicidas é feita de acordo com as recomendações agronômicas.

Referências

- Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y (2010) Diet effects on honeybee immunocompetence. **Biology Letters** 6:562-565.
- Archer CR, Pirk CWW, Wright GA, Nicolson SW (2014) Nutrition affects survival in African honeybees exposed to interacting stressors. **Functional Ecology** 28:913–923.
- Armanda DT, Guinée JB & Tukker A (2019) The second green revolution: Innovative urban agriculture's contribution to food security and sustainability—A review. **Global Food Security** 22:13-24.
- Arnoult D, Carneiro L, Tattoli I (2009) The role of mitochondria in cellular defense against microbial infection. **Seminars in Immunology** 21:223-232.
- Atkins E (1992) Injury to honey bees by poisoning. **The hive and the honey bee** p.1153-1208.
- Bayer (2019) **Fox Xpro: Fungicida**. Disponível em: <<https://www.agro.bayer.com.br/essenciais-do-campo/protecaodecultivos/fox-xpro>>. Acesso em: 17 Ago. 2023.

Berenbaum MR & Calla B (2021) Honey as a Functional Food for *Apis mellifera*. **Annual Review of Entomology** 66:185–208.

Biesmeijer JC et al (2006) Parallel Declines in Pollinators and Insect-pollinated Plants in Britain and the Netherlands. **Science** 313:351-354.

Blaauw BR, Isaacs R (2014) Flower plantings increase wild bee abundance and the pollination services provided to a pollination-dependent crop. **Journal of Applied Ecology** 51:890–898.

Bleicher J, Berton O, Boneti JI Da S, Katsurayama YD (2002) Doenças fúngicas dos frutos. A cultura da macieira. Florianópolis: **Epagri** p. 556-566

Boncristiani H, Underwood R, Schwarz R, Evans JD, Pettis J, vanEngelsdorp D (2012) Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology** 58:613–620.

Boneti JIS, Katsurayama Y, Bleicher J (2002) Doenças da Macieira. A cultura da macieira. Florianópolis: **Epagri** p. 527-555.

Botton M, Arioli CJ, Muller C (2006) Controle de lagartas no período de floração da macieira. **Agapomi** 145:06-07.

Burley LM, Fell RD, Saacke RG (2008) Survival of honey bee (Hymenoptera: *Apidae*) spermatozoa incubated at room temperature from drones exposed to miticides. **Journal of Economic Entomology** 101:1081–1087.

BRASIL. **Lei n. 7.802, de 12 de julho de 1989 (Lei Federal dos Agrotóxicos)**. Brasília, Diário Oficial da União, 12 de julho de 1989.

Brodschneider R, Crailsheim K (2010) Nutrition and health in honey bees. **Apidologie** 41:278-294.

Castagnino GLB (2008) **Produtos naturais no controle do ácaro *Varroa destructor* em abelhas *Apis mellifera* L. (Africanizadas)**. 63f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Botucatu.

Cavalcanti JA et al (2010) Agrotóxicos: uma temática para o ensino de Química. **Química nova na escola** 32:31-36.

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

Claudianos C, Ranson H, Johnson R, Biswas S, Schuler M, Berenbaum M, Feyereisen R, Oakeshott J (2006) A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect Molecular Biology** 15:615–636.

Collins AM, Pettis JS, Wilbanks R, Feldlaufer MF (2004) Performance of honey bee (*Apis mellifera*) queens reared in beeswax cells impregnated with coumaphos. **Journal of Apicultural Research** 43:128–134.

Cotter SC, Simpson SJ, Raubenheimer SS, Wilson DK (2011) Macronutrient balance mediates trade-offs between immune function and life history traits. **Functional Ecology** 25:186-198.

Couto RHN, Couto LA (2002) **Apicultura: manejo e produtos**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP. 191p.

Cremer S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P (2007) Social Immunity. **Current Biology** 17:693–702.

Değirmenci L, Thamm M, & Scheiner R (2018) Responses to sugar and sugar receptor gene expression in different social roles of the honeybee (*Apis mellifera*). **Journal of Insect Physiology** 106:65–70.

DeGrandi-Hoffman G, Chen Y, Huang E, Huang MH (2010) The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology** 56:1184–1191.

Degrandi-Hoffman G, Chen Y, Simonds R (2013) The effects of pesticides on queen rearing and virus titers in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Insects** 4:71-89.

Degrandi-Hoffman G, Chen Y, Dejong EW (2015) Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. **Journal of Economic Entomology** 108:2518-28.

DeGrandi-Hoffman G, et al. (2018). Connecting the nutrient composition of seasonal pollens with changing nutritional needs of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. **Journal of Insect Physiology** 109:114–124.

Derecka K et al (2013) Transient exposure to low levels of insecticide affects metabolic networks of honeybee larvae. **PLoS One** 8:e68191.

Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LO, Decourtye A, Kretzschmar A, Suchail S, Brunet JL, Alaux C (2013) Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? **PlosOne** 8:1-13.

Di Prisco G et al (2013) Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences** 110:18466-18471.

Doublet V et al (2015) Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. **Environmental Microbiology** 17:969-983.

Ehlers E (2017) O que é agricultura sustentável. Rio de Janeiro: Brasiliense.

FAO (2017) The Future of Food and Agriculture: Trends and Challenges.

Freitas BM, Imperatriz-Fonseca VL, Medina LM, Kleinert ADMP, Galetto L, Nates-Parra G, Queza-da-Euán JJG (2009) Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie** 40:332–346.

Frost EH, Shutler D, Hillier NK (2013) Effects of fluvalinate on honey bee learning, memory, responsiveness to sucrose, and survival. **Journal of Experimental Biology** 216:2931–2938.

Giannini TC, Boff S, Cordeiro GD, Cartolano EA, Veiga AK, Imperatriz-Fonseca VL, Saraiva AM (2015) Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. **Apidologie** 46:209-223.

Gill RJ, Ramos-Rodriguez O, Raine NE (2012) Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. **Nature** 491:8-105.

Godfray HCJ et al (2014) A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences** 281:20140558.

Gois GC, Carneiro GG, Silva EO, Campos FS (2010) *Melipona scutellaris*: Características gerais. **Pubvet** 4:1-20.

Gregorc A, Evans JD, Scharf M, Ellis JD (2012) Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and *Varroa* mites (*Varroa destructor*). **Journal of Insect Physiology** 58:1042–1049.

Haarmann T, Spivak M, Weaver D, Weaver B (2002) Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: *Apidae*) in two commercial queen rearing operations. **Journal of Economy Entomology** 95:28–35.

Henry M et al (2012) A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science** 336:348-50.

Huang ZY, Robinson GE, Tobe SS, Yagi KJ, Strambi C, Strambi A, Stay B (1991) Hormonal regulation of behavioural development in the honey bee is based on changes in the rate of juvenile hormone biosynthesis. **Journal of Insect Physiology** 37:733–741.

IPBES - The Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. The assessment report of the Intergovernmental Science Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production (2016) Potts SG, Imperatriz-Fonseca VL, Ngo HT (EDS). **Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services** p. 552.

Janmaat AF, Winston ML (2000) The influence of pollen storage area and *Varroa jacobsoni*; Oudemans parasitism on temporal caste structure in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Insectes Sociaux** 47:177–182.

Jivan A (2013) The Impact of Pesticides on Honey Bees and Hence on Humans. **Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies** 46:272-277.

Johnson RM, Wen Z, Schuler M, Berenbaum M (2006) Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: *Apidae*) by cytochrome P450 monooxygenases. **Journal of Economy Entomology** 99:1046–1050.

Johnson RM, Pollock H, Berenbaum M (2009) Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. **Journal of Economy Entomology** 102:474–479.

Johnson RM, Ellis M, Mullin C, Frazier M (2010) Pesticides and honey bee toxicity – USA. **Apidologie** 41:312–331.

Johnson RM, Mao W, Pollock HS, Niu G, Schuler MA, Berenbaum MR (2012) Ecologically appropriate xenobiotics induce cytochrome P450s in *Apis mellifera*. **PLoS One** 7:e31051.

Johnson RM (2015) Honey bee toxicology. **Annual Reviews** 60:415-434.

Khoury DS, Myerscough MR, Barron AB (2011) A quantitative model of honey bee colony population dynamics. **PLoS One** 6:e18491.

Klein AM et al (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences** 274:303-313.

Kubik M, Nowacki J, Pidek A Warakomska Z, Michalczyk L, Goszczyński W (1999) Pesticide residues in bee products collected from cherry trees protected during blooming period with contact and systemic fungicides. **Apidologie** 30:521–532.

Li C, Xu B, Wang Y, Feng Q, Yang W (2012) Effects of dietary crude protein levels on development, antioxidant status, and total midgut protease activity of honey bee (*Apis mellifera ligustica*). **Apidologie** 43:576-586.

Mao W, Schuler M, Berenbaum M (2011) CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). **Proceedings Of The National Academy Of Sciences** 108:12657–12662.

Margni M et al (2002) Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment** 93:379–392.

Martelli F, Hernandez NH, Pires CV (2017) Vida longa à rainha: e às operárias também. **Genética na Escola** 12:2-9.

Meehan TD, Werling BP, Landis DA & Gratton C (2011) Agricultural landscape simplification and insecticide use in the Midwestern United States. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 108:11500–11505

Moritz RFA, Fuchs S (1998) Organization of honeybee colonies: Characteristics and consequences of a superorganism concept. **Apidologie** 29:7–21.

Mullin CA, Frazier M, Frazier JL (2010) High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PLoS One** 5:e9754.

Mussen EC, Lopez JE, Peng CYS (2004) Effects of selected fungicides on growth and development of larval honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: *Apidae*). **Environmental Entomology** 33:151-1154.

National Honey Bee Health Stakeholder. Conference Steering Committee (2012) **Report on the National Stakeholders Conference on Honey Bee Health**. US Department of Agriculture, Washington, DC.

Naug D (2009) Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. **Biological Conservation** 142:2369– 72.

Naug D, Gibbs A (2009) Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. **Apidologie** 40:595–599.

Nazzi F, Brown SP, Annoscia D, Del Piccolo F, Di Prisco G, Varricchio P, Della Vedova G, Cattonaro F, Caprio E, Pennacchio F (2012) Synergistic parasite– pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. **PLoS Pathogens** 8:e1002735.

Neff JL e Simpson BB (1993) Bees, Pollination Systems and Plant Diversity. In: LASALLE, J; GAULD, ID (Eds). **Hymenoptera and Biodiversity** Wallingford, CAB International, p. 143-167.

Negri P, Villalobos E, Szawarski N et al (2019) Towards precision nutrition: A novel concept linking phytochemicals, immune response and honey bee health. **Insects** 10:401–430.

Nicodemo D, Mingatto FE, De Jong D, Bizerra FVB, Tavares MA, Bellini WC, Vicente EF, Carvalho A (2020) Mitochondrial respiratory inhibition promoted by pyraclostrobin in fungi is also observed in honey bees. **Environmental Toxicology and Chemistry** 39:1267-1272.

Oliveira TG, Favareto APA, Antunes PA (2013) Agrotóxicos: Levantamento dos mais utilizados no oeste paulista e seus efeitos como desreguladores endócrinos: Saúde, Saneamento e Meio Ambiente. **IX Fórum Ambiental de Alta Paulista** 9:375-390.

Oliver R, Hewitt HG (2014) **Fungicides in crop protection**. 2.ed. Boston: CABI. 189p.

Peruquetti RC, Teixeira LV, Coelho FM (2017) Introdução ao estudo sobre polinização. **Grupo de estudos sobre abelhas**. Acesso em: 09 de mai. 2023.

Pettis JS, Collins AM, Wilbanks R, Feldlaufer MF (2004) Effects of coumaphos on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. **Apidologie** 35:605–610.

Pettis JS, Lichtenberg EM, Rose S (2013) Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS One** 8:e70182.

Pires CSS (2016) Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 51:422-442.

Potts S et al (2010) Global Pollinator Declines: Trends, Impacts and Drivers. **Trends in Ecology & Evolution** 25:345-353.

Potts SG, Imperatriz-Fonseca VL, Ngo HT, Aizen MA, Biesmeijer JC, Breeze TD, Vanbergen AJ (2016) Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature** 540:220-229.

Quinlan GM, Grozinger CM (2023) Honey bee nutritional ecology: from physiology to landscapes. **Advances in Insect Physiology** 64:289-345.

Ribas PP, Matsumura ATS (2009) A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato** 10:149-158.

Ricigliano VA et al (2017) The impact of pollen consumption on honey bee (*Apis mellifera*) digestive physiology and carbohydrate metabolism. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 96:1–14.

Ricketts TH et al (2008) Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology Letters** 11:499-515.

Rinderer TE, Guzman L, Lancaster VA, Delatte GT, Stelzer JA (1999) *Varroa* in the mating yard. I. The effects of *Varroa jacobsoni* and *apistan* on drone honey bees. **The American Bee Journal** 139:134–139.

Roubik DW (2018) The pollination of cultivated plants. A compendium for practitioners, v. 2. **FAO** 324 p.

Roy R, Schmitt AJ, Thomas JB & Carter CJ (2017) Review: Nectar biology: From molecules to ecosystems. **Plant Science** 262:148–164.

Seeley TD, Camazine S, Sneyd, J (1991) Collective decision-making in honey bees: how colonies choose among nectar sources. **Behavioral Ecology and Sociobiology** 28:277-290.

Sereia MJ (2009) **Suplementos protéicos para abelhas africanizadas submetidas à produção de geléia real**. 92 f. Tese (Doutorado) - Universidade estadual de Maringá, Paraná.

Schindwein C (1998) Frequent oligolecty characterizing a diverse bee-plant community in a xerophytic bushland of subtropical Brazil. **Studies on Neotropical Fauna & Environment** 33:46-59.

Shiva V (1993) The Violence of the Green Revolution: Third World Agriculture, Ecology, and Politics. **Third World Network**.

Sullivan JP, Jassim O, Fahrbach SE, Robinson GE (2000) Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. **Hormones and Behavior** 37:1–14.

Thompson HM, Wilkins S, Battersby AH, Waite RJ, Wilkinson D (2007) Modelling long-term effects of IGRs on honey bee colonies. **Pest Management Science** 63:1081–1084.

Togni PHB et al (2019) Brazilian legislation leaning towards fast registration of biological control agents to benefit organic agriculture. **Neotropical Entomology** 48:175-185.

Tomé HVV, Schmehl DR, Wedde AE, Godoy RSM, Ravaiano SV, Guedes RNC, Martins GF, Ellis JD (2020) Frequently encountered pesticides can cause multiple disorders in developing worker honey bees. **Environmental Pollution** 256:113420.

Toth AL, Robinson GE (2005) Worker nutrition and division of labour in honeybees. **Animal Behaviour** 69:427–435.

Tsuruda JM, Chakrabarti P & Sagili RR (2021) Honey Bee Nutrition. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice** 3:505–519.

Tyagi AC (2016) Towards a Second green revolution. **Irrigation and Drainage** 4:388-389.

Vaudo AD, Tooker JF, Grozinger CM, Patch HM (2015) Bee nutrition and floral resource restoration. **Current Opinion in Insect Science** 10:133–141.

Williamson SM & Wright GA (2013) Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. **Journal of Experimental Biology** 216:1799-1807.

Winston ML (2003) A Biologia da Abelha. Editora Magister.

Wolowski M, Agostini K, Rech AR, Varassin IG, Maués M, Freitas L, Saraiva AM (2019) Relatório temático sobre polinização, polinizadores e produção de alimentos no Brasil. Espírito Santo: **REBIPP**.

Wu JY, Anelli CM, Sheppard WS (2011) Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. **PLoS One** 6:1–11.

Yang C, Hamel C, Vujanovic V (2011) Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. **ISRN Ecology** 2011:1-8.

Yoder JA, Jajack AJ, Rosselot AE, Smith TJ, Yerke MC, Sammataro D (2013) Fungicide contamination reduces beneficial fungi in bee bread based on an area-wide field study in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. **Journal of toxicology and environmental health** 76:587-600.

Zaluski R, Justulin LA JR, Orsi RO (2017) Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports** 7:15217.

Zhu W, Schmehl DR, Mullin CA (2014) Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. **PLoS One** 9:e77547.

Capítulo 2 - Bixafen, protioconazol e trifloxistrobina alteram a expressão gênica em abelhas melíferas com suplementação ou restrição alimentar

Resumo

Os riscos à saúde das abelhas inerentes aos efeitos dos fungicidas estão sendo potencializados, pois, produtos comerciais têm sido formulados com mais de um princípio ativo, para otimizar o controle de fungos patogênicos. Outro fator a se considerar é o nível nutricional das colônias, uma vez que a desnutrição pode tornar as abelhas mais suscetíveis a estes agrotóxicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de três princípios ativos (P. A.) que compõem um fungicida comercial na expressão gênica em abelhas melíferas que tiveram a alimentação suplementada ou restrita. Foram utilizadas 10 colônias de abelhas melíferas, com metade recebendo suplementação energético-proteica por 15 semanas. No mesmo período, as outras cinco colônias não tiveram sua alimentação suplementada e, para diminuir a entrada de alimento proteico, foram instalados coletores de pólen apícola no alvado destas colmeias. Após este período, foram coletadas abelhas campeiras dos alvados das colmeias, que foram contaminadas por contato com Bixafen (Bix), Protioconazol (Pro) e Trifloxistrobina (Tri) aplicados separadamente ou em conjunto mp tórax das abelhas, em doses de 1 ou 7 µg. Após 48 horas da contaminação, as abelhas foram dissecadas, obtendo-se o abdômen sem o intestino para análise da expressão dos genes SOD-1, CAT, GPX-1, GST-1, CYP306A1, Vitelogenina, Defensina-1, Abaecina, Himenopdaecina e Apidaecina, por meio de PCR em tempo real. Todos os P. A. promoveram alterações da expressão gênica, com destaque para Bix, que mais promoveu suprarregulação dos genes estudados. Em conjunto, a contaminação com os três P. A. resultou em suprarregulação dos genes ligados a processos de detoxificação e nutrição e infrarregulação dos genes estritamente ligados ao sistema imune. Com a maior dose dos três P. A. em conjunto houve acentuada infrarregulação de todos os genes. A suplementação alimentar implicou em menor número de alterações de expressão gênica em comparação com a alimentação restrita.

Palavras-chave: contaminação por contato, detoxificação, fungicida, imunidade, nutrição, PCR.

Bixafen, prothioconazole and trifloxystrobin alter gene expression in honeybees with supplemented or restricted feeding

Abstract

The risks to the health of bees inherent to the effects of fungicides are being enhanced, since commercial products have been formulated with more than one active ingredient, in order to optimize the control of pathogenic fungi. Another factor to consider is the nutritional level of the colonies, since malnutrition can make bees more susceptible to these pesticides. The objective of this work was to evaluate the effect of three active ingredients (A.I.) that make up a commercial fungicide on gene expression in honey bees that had supplemented or restricted feeding. Ten honey bee colonies were used, with half receiving energy-protein supplementation for 15 weeks. In the same period, the other five colonies did not have their food supplemented and, to reduce the intake of protein food, bee pollen traps were installed on the entrance of these hives. After this period, foraging bees were collected from the hives entrances, which were contaminated by contact with Bixafen (Bix), Prothioconazole (Pro) and Trifloxystrobin (Tri) applied separately or together on the thorax of the bees, in doses of 1 or 7 µg. After 48 hours of contamination, the bees were dissected, obtaining the abdomen without the intestine for analysis of the expression of genes SOD-1, CAT, GPX-1, GST-1, CYP306A1, Vitellogenin, Defensin-1, Abaecin, Hymenopdaecin and Apidaecin, through real-time PCR. All A. I. promoted changes in gene expression, with emphasis on Bix, which most promoted up-regulation of the studied genes. Together, contamination with the three A. I. resulted in up-regulation of genes linked to detoxification and nutrition processes and down-regulation of genes strictly linked to the immune system. With the highest dose of the three A. I. together, there was marked down-regulation of all genes. Feed supplementation resulted in fewer changes in gene expression compared to restricted feeding.

Key words: contact contamination, detoxification, fungicide, immunity, nutrition, PCR.

Introdução

As abelhas são suscetíveis a vários estressores ambientais e grande ênfase tem sido dada aos efeitos nocivos dos agrotóxicos, incluindo fungicidas, para os quais há pequena ou nenhuma restrição de uso relacionada à segurança ambiental desses insetos benéficos (Kubik et al., 1999; National Honey Bee Health Stakeholder, 2012; Fisher et al., 2023). Se doses letais dos fungicidas para abelhas podem ser consideradas altas, efeitos subletais podem ser observados com doses menores, com destaque para a contaminação com dois ou mais princípios ativos ao mesmo tempo, em virtude de aplicações simultâneas de dois agrotóxicos ou de apenas um produto comercial que contém dois ou mais princípios ativos (Biddinger et al., 2013; Rondeau e Raine, 2022).

O uso recorrente de fungicidas para controlar e prevenir a ocorrência de fungos patogênicos nas lavouras está associado à expansão dos cultivos de monoculturas. Nesse contexto, há condições para o desenvolvimento de cepas resistentes aos fungicidas, implicando na necessidade de desenvolvimento de novos fungicidas. Sendo assim, uma recente estratégia para o combate mais eficiente de fungos patogênicos nas lavouras tem sido a formulação de fungicidas contendo mais de um princípio ativo. Dessa forma, com princípios ativos com diferentes modos de ação, é possível combater o patógeno em diferentes estágios do ciclo de vida, favorecendo o desenvolvimento das plantas (Deising et al., 2008).

Este método de associação de princípios ativos com ação fungicida tem se mostrado promissor sob o ponto de vista agrônomo, porém, deve ser observado com atenção por pesquisadores e criadores de abelhas, em função do novo cenário que pode implicar em intoxicação das abelhas com mais de um princípio ativo simultaneamente, inclusive com doses subletais (Fisher et al., 2017; Traynor et al., 2021). Ainda sob o ponto de vista apícola, outro fator inerente à agricultura convencional que pode ser desvantajoso é a restrição alimentar. Os monocultivos em grandes áreas limitam a disponibilidade de pólen e néctar, que se tornam disponíveis apenas durante os períodos de floração das culturas agrícolas (Vaudo et al., 2015). Ademais, o perfil qualitativo do alimento oriundo das flores de uma única cultura, principalmente no que se refere a diversidade de aminoácidos, pode não atender a demanda das colônias (Behmer, 2009; Brodschneider e Crailsheim, 2010), implicando

em desnutrição e maior suscetibilidade a estressores ambientais (Tadei et al., 2020; Quinlan e Grozinger, 2023).

O pólen apícola que as abelhas campeiras trazem para a colônia, se contaminado com fungicidas, pode prejudicar a elaboração do pão das abelhas, além de prejudicar diretamente a saúde das crias (Mussen et al., 2004; David et al., 2016; Fisher et al., 2021), assim como das abelhas adultas que consomem este alimento contaminado, implicando em menor longevidade e maior propensão a doenças, como a Nosemose (Lambert et al. 2013; Pettis et al. 2013). Embora sejam consideradas menos prejudicadas pelos efeitos dos fungicidas, as abelhas campeiras também podem ser contaminadas por contato, no momento da aplicação (Fisher et al., 2023). Cada fungicida tem o seu modo de ação principal e o efeito esperado em fungos patogênicos pode ser observado em abelhas melíferas (Nicodemo et al., 2020).

Abelhas melíferas podem acumular fungicidas com características lipofílicas no seu corpo gorduroso e assim tornar os processos de detoxificação e de produção de energia menos eficientes, em virtude do comprometimento das funções mitocondriais (Simon-Delso et al., 2018). Os fungicidas podem gerar efeitos complexos e persistentes na infrarregulação de genes ligados a fosforilação oxidativa e regulação hormonal, prejudicando a ontogenia e o comportamento de operárias (Christen et al., 2019), e ao sistema imune (Cizelj et al., 2016), tornando estes insetos mais vulneráveis a agentes estressores.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito individual e conjunto de três princípios ativos que compõem um fungicida comercial na expressão de 10 genes importantes para a saúde das abelhas melíferas, considerando-se o manejo alimentar das colônias e o nível de contaminação das abelhas a partir da aplicação do fungicida de acordo com as recomendações agronômicas do fabricante do produto.

Material e Métodos

Local do experimento

O trabalho foi realizado na cidade de Dracena, estado de São Paulo (latitude 21°27'37" S e longitude 51°33'21" O, em altitude de 421 metros).

Determinação das doses experimentais

Para determinação das doses experimentais dos princípios ativos que compõem o fungicida comercial Fox Xpro, foi realizado um ensaio, utilizando-se plantas de algodão e abelhas melíferas. Foram utilizados 50 vasos com volume individual de 5L, preenchidos com solo de barranco corrigido com calcário e adubado de acordo com as recomendações agronômicas (Raij et al., 1996). Foram semeadas três sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), da cultivar IAC 24, mantidas em casa de vegetação com irrigação controlada. Três semanas após a germinação, foi a escolhida a planta com melhor desenvolvimento, sendo as demais retiradas dos vasos.

Quando entraram no estágio de floração, as plantas foram levadas para uma sala de pulverização controlada. As plantas foram dispostas em duas fileiras, em espaçamento de 70 x 20 cm (Figura 1). Não houve efeito de vento neste ambiente e as aplicações foram feitas em temperatura de $32\pm1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $57\pm4\%$.



Fig. 1 Vasos com plantas de algodão em sala de pulverização controlada.

No mesmo dia em que os vasos foram colocados na sala de pulverização, foram coletados *pools* de abelhas melíferas campeiras do alvado de três colmeias. As abelhas foram colocadas em potes plásticos de 0,25 L com tampa perfurada, que permitia a troca gasosa. Em seguida, as abelhas foram anestesiadas em freezer (-20°C) por alguns minutos (Nicodemo et al., 2014). As abelhas foram fixadas nas

plantas de algodão com auxílio de alfinetes entomológicos nº 0, perfurando de baixo para cima, primeiro a estrutura da planta (folhas ou flores) e finalmente a abelha, através do tórax. Os insetos foram colocados nos estratos superior e intermediário das plantas, visando identificar se a posição da abelha na planta interfere na sua contaminação.

O fungicida Fox Xpro foi aplicado por meio de um simulador de pulverização equipado com uma barra de quatro bicos espaçados em intervalos de 0,5 m, no volume de calda de 144 L. ha⁻¹, na dose de 0,5 L. ha⁻¹ do produto comercial Fox Xpro (Bayer, 2019), conforme recomendado na bula para a cultura do algodão. Como o produto é uma suspensão, o recipiente do produto foi agitado manualmente por três minutos antes da dosagem. Para avaliar o efeito do tamanho da gota na contaminação por abelhas, foram feitas aplicações com pontas de pulverização que produziram gotas finas (modelo XR110015) ou gotas grossas (modelo AIXR110015), com pressão de 200 kPa, mantida a uma altura de 0,50 m acima do topo das plantas, e o aparato de pulverização se moveu sobre trilhos com velocidade constante de 4 km.h⁻¹, para permitir a melhor sobreposição dos jatos de pulverização. As abelhas estavam vivas durante a aplicação do fungicida (Figura 2).



Fig. 2 Abelhas fixadas em folha (esquerda) e flor (direita) de algodão após a aplicação de calda com o fungicida Fox Xpro com gotas finas.

Quinze minutos após a aplicação da calda com fungicida, foram coletadas amostras com 20 abelhas melíferas ($77,7 \pm 7,7$ mg/indivíduo), com quatro repetições (duas posições nas plantas, dois tamanhos de gotas), totalizando 320 abelhas. As

abelhas foram desprendidas das agulhas sem contato manual. Para isso, um tubo Falcon de 50 ml foi colocado sob a abelha e, em seguida, o alfinete inseto foi puxado para baixo, com a abelha caindo diretamente no tubo. Após a coleta, os tubos identificados foram armazenados em ultrafreezer (-80°C).

Para a construção das curvas padrão, foram adquiridos padrões (Sigma) dos princípios ativos (P.A.) bixafen (Bix), protioconazol (Pro) e trifloxistrobina (Tri), que compõem o fungicida Fox Xpro. Estes P.A. foram utilizados nas análises químicas para determinar as quantidades desses componentes fungicidas nas abelhas que foram fixadas nas plantas de algodão.

Um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu Prominence-i LC-2050), equipado com uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 2,1x100 mm 3,5µm a uma temperatura de 35°C, foi usado para dosar a quantidade de cada P. A. nas abelhas. A taxa de fluxo foi mantida em 0,6 mL min⁻¹, e a detecção foi realizada em um detector UV-Vis a 210 nm. As fases móveis utilizadas foram: (A) ácido fosfórico 0,1M e (B) acetonitrila em modo gradiente.

O tempo de retenção, limite de detecção (DL) e limite de quantificação (QL) dos três ingredientes ativos (Mesquita et al., 2013; Serafim et al., 2021) foram determinados e observados em relatórios gerados por regressão linear feita com o software LabSolution (Shimadzu) para o sistema HPLC, sendo: para Bix, o tempo de retenção foi de 5,369 min, com DL e QL de 0,47 e 1,42 µg/mL, respectivamente; para Pro, o tempo de retenção determinado foi de 4,303 min, com DL e QL de 0,75 e 2,26 µg/mL, respectivamente; e, por fim, para Tri, o tempo de retenção foi de 12,679 min, com DL e QL de 0,80 e 2,43 µg/mL, respectivamente.

Após validação dos testes para determinação dos tempos de retenção dos P. A., as amostras de abelhas foram secas em liofilizador LioBras, modelo Liotop K107, por um período de 24 horas. Após a secagem, as amostras foram submetidas a processos de extração e limpeza utilizando o método QuEChERS (Rahman et al., 2022) com modificações descritas a seguir. Para a extração, foram adicionados 5 mL de acetonitrila, 0,4 g de MgSO₄, 0,1 g de NaCl, 0,1 g de citrato de sódio tribásico dihidratado (SCTD) e 0,05 g de citrato de sódio dibásico sesquihidratado (SCDS) para cada amostra contendo 20 abelhas. Para o processo de limpeza, foram utilizados 37,7 mg de MgSO₄, 6,3 mg de amina primária secundária (PSA) e 6,3 mg de C18.

Manejo alimentar das colônias de abelhas melíferas

O manejo alimentar foi realizado apiário no campus de Dracena, onde foram utilizadas 10 colônias de abelhas melíferas (*Apis mellifera*) africanizadas, instaladas em colmeias Langstroth, que foram divididas em dois grupos: colônias com suplementação alimentar (CSA) e colônias com restrição alimentar (CRA).

Durante 15 semanas, as CSA tiveram livre acesso para coletar alimento no campo e alimentação suplementada com 500 ml de xarope energético contendo água e açúcar em proporções iguais, duas vezes por semana, e 100g de pasta proteica que continha duas partes de pólen apícola e uma de mel, oferecida uma vez por semana. Para o outro grupo (CRA), não houve suplementação alimentar e foi colocado um coletor de pólen nos alvados de cada colmeia deste grupo para restringir a entrada de pólen apícola.

O pólen apícola foi coletado diariamente e pesado em balança semi-analítica. Foi calculada a quantidade de pólen coletada em cada colmeia semanalmente. Para determinar a eficiência dos coletores de pólen, foi observada a entrada de abelhas campeiras pelos coletores de pólen, em períodos de 30 minutos, carregando pólen apícola em suas pernas, por duas vezes em cada colmeia. Foi registrado o número de abelhas entrando com pólen e o número de bolotas de pólen que caíram na gaveta do coletor de pólen. A eficiência dos coletores foi calculada por meio da fórmula:

$$\text{Eficiência do coletor de pólen} = \text{nº de bolotas de pólen} / (2 \times \text{o nº de abelhas com pólen}) \times 100$$

Avaliação da expressão gênica

Para a avaliação da expressão gênica, foram coletados *pools* de abelhas campeiras do alvado de quatro colônias do grupo CSA e de quatro colônias do grupo CRA, após as 15 semanas de manejo alimentar. As abelhas foram colocadas em potes plásticos de 0,25 L com tampa perfurada. No laboratório, as abelhas foram anestesiadas em freezer (-20°C) por alguns minutos.

Em anestesia, as abelhas foram intoxicadas por contato, aplicando-se 0,5 microlitro de solução com um ou os três P.A. em acetona, no dorso do tórax de cada abelha, com uma microseringa (OECD, 1998). As doses foram estabelecidas a partir dos resultados obtidos no teste de determinação das doses de contaminação das

abelhas afixadas nas plantas de algodão. Para o controle, foi aplicada apenas acetona. Após a contaminação, 20 abelhas com o mesmo tratamento foram colocadas em novos potes plásticos e alimentadas *ad libitum* com xarope com duas partes de açúcar e uma parte de água (Suchail et al., 2009), permanecendo por um período de 48 horas em estufa com temperatura (33°-34 °C) e umidade (70-80 %) controladas.

As abelhas foram novamente anestesiadas e dissecadas com o auxílio de tesoura e pinças entomológicas e lupa, desprezando-se cabeças, tórax e o intestino, aproveitando-se apenas os abdomens. Cada amostra foi formada a partir de seis abdomens, obtendo-se quatro amostras por tratamento (2 manejos alimentares x 3 P. A. + 1 composto de P. A. x 2 doses + controle).

Extração de RNA e construção de biblioteca de cDNA

Foi realizada a análise do transcriptoma por qPCR em Real Time, dos primers descritos na Tabela 1.

Table 1. Genes, respective primer sequences (GenBank accession numbers) and references.

Genes	Sequência (5'-3')	Referências
Ribosomal Protein L32 (RPL32)*	F: CGTCATATGTTGCCAACTGGT R: TTGAGCACGTTCAACAATGG	Lourenço et al. (2008)
Superoxide Dismutase 1 (SOD-1)	F: GGTGGTGGTCATTTGAATCATTC R: AAGAAGTGCAGCGTCTGGTTTAC	
Catalase (CAT)	F: TGGAGCAAGTCCTGATAAAATGC R: TGGGCCAAGACGATGTCTATG	
Glutathione Peroxidase 1 (GPX-1)	F: CGACAACCTATAAGGAAGCGAAA R: AGATAGAAAAACGTCTTCGCCT	
Glutathione S-transferase 1 (GST-1)	F: TGCCGATCGATTTTTATCAACTT R: AGCCGTCAACGCAACTGC	
Cytochrome P450 306A1 (CYP306A1)	F: CGTCGATGGGAAGGATAAAA R: TCGGTGAAATATCCCGATTC	
Vitellogenin	F: TCGACAACCTGCGATCAAAGGA R: TGGTCACCGACGATTGGATG	Simone et al. (2009)
Defensin-1	F: TGCGCTGCTAACTGTCTCAG R: AATGGCACTTAACCGAAACG	Siede et al. (2012).
Abaecin	F: AGATCTGCACACTCGAGGTCTG R: TCGGATTGAATGGTCCCTGA	
Hymenoptaecin	F: CTCTTCTGTGCCGTTGCATA R: 'GCGTCTCCTGTCATTCCATT	
Apidaecin	F: CTTTGTAGTCGCGGTATTTGG R: AGGCGCGTAGGTTCGAGTAG	

Para a extração de RNA foi utilizado 1 ml de Trizol® LS Reagent (Invitrogen™) e 200 µL de clorofórmio, que foi centrifugado a 12.000 x g, por 15 minutos a 4°C. A parte superior aquosa foi transferida para outro microtubo, no qual foi adicionado o isopropanol. As amostras foram agitadas com vórtex e centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. Por fim, os sobrenadantes foram descartados, os pellets de RNA foram lavados três vezes com 100 µL de etanol, centrifugados, descartados o sobrenadante e os pellets foram deixados secar por 15 minutos. Em seguida, foram suspensos com água molecular.

Após o isolamento do RNA, foi feita a quantificação por absorbância a 260 nm em ng utilizando o Nanodrop-1000 (Thermo Scientific). Uma alíquota de RNA foi

processada em gel de agarose a 1% e pós-corada com GelRed® (Sigma) para verificar a integridade do RNA.

A partir do RNA extraído foi construída a biblioteca de cDNA, por transcrição reversa (RT) usando 1 mg de RNA total e iScript™ III (Life Technologies). O cDNA resultante foi armazenado a -20°C até o uso. Em seguida, a sequência foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os primers alvos (selecionados em literatura para abelhas melíferas).

Determinação molecular da expressão de genes

A determinação molecular da expressão de genes será realizada pelo método da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR-RT) e os resultados serão analisados por quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl et al., 2004; Rebouças et al., 2013).

As reações para qPCR serão realizadas em placas de 96 poços usando iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). As reações serão realizadas de acordo com as instruções do fabricante com reações individuais de 20 µl consistindo em 10 µl de mistura principal de PCR SYBRGreen (2x), 8 µl de iniciadores 200 nM e 2 µl de molde de cDNA (amostras) (Rebouças et al., 2013).

Todas as reações foram realizadas no sistema de detecção de qPCR em tempo real iCycler iQ™ (Bio-Rad Laboratories), sob o protocolo: 95 °C por 5 min, 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 56 °C por 30 s, seguido por análise da curva de dissociação (curva de fusão) para verificar a amplificação de um único produto. As temperaturas para os ciclos desnaturação-hibridização-síntese utilizadas serão adequadas de acordo com a literatura, para resultar na síntese de centenas de milhões de cópias do fragmento de DNA amplificado (Pfaffl, 2004).

O limiar da fase exponencial denominado de Cycle Threshold (Ct), foi detectado durante os ciclos de temperatura, quantificando-se exatamente os produtos da reação de amplificação devido à emissão de fluorescência. Os dados de expressão foram usados para calcular o valor do ciclo limite (Ct). A eficiência da PCR e a taxa de expressão relativa de genes alvo em grupos experimentais versus grupos de controle foram calculadas de acordo com o método de (Pfaffl et al., 2004). O método comparativo de CT ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ método de CT) foi usado para analisar o nível de expressão

desses genes em relação ao EF-1 β . Todas as medições da expressão alvo foram normalizadas em relação ao gene RPL32 (Lourenço et al., 2008).

Análises estatísticas

Para analisar as quantidades de ingredientes ativos que contaminaram as abelhas, foi empregado um planejamento fatorial de dois fatores. Este delineamento envolveu os fatores: tamanho da gota (fina e grossa) e altura de colocação das abelhas nas plantas (altura superior e média). Cada análise foi realizada com quatro repetições e cada amostra de abelhas compreendeu 20 abelhas melíferas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, nos casos em que foi observado efeito significativo ($P < 0,05$), foram feitas comparações de médias pareadas por meio do teste de Tukey.

Para o grupo CRA, foi calculada a média de produção de pólen semanal de cada colônia. A eficiência dos coletores de pólen foi avaliada por meio da média de oito observações, em quatro colmeias. A dispersão dos dados foi determinada pelo erro padrão residual.

A expressão de cada gene foi avaliada por meio da comparação dos resultados de cada tratamento com o controle do grupo CSA. Como não houve distribuição normal dos dados, as comparações das medianas foram feitas por meio do teste não paramétrico de Kruskal Wallis ($P < 0,05$) (SAS Institute, 2013).

Resultados

Avaliação dos P. A. na calda de aplicação do fungicida

Na avaliação da solução preparada para a pulverização das plantas de algodão, os três P. A. foram detectados nas concentrações de 0,621 g de bixafen, 0,802 g de prothioconazol e 0,721 g de trifloxistrobina por litro de solução.

Contaminação das abelhas melíferas fixadas em plantas de algodão

A quantidade observada de Bix por abelha foi maior quando foram utilizadas gotas finas em comparação com o uso de gotas grossas ($P = 0,0240$) e quando as abelhas estavam no topo das plantas ($P < 0,001$), em comparação com aquelas colocadas à meia altura nas plantas (Tabela 2). Foi quantificado mais Pro com

pulverização da calda de fungicida com gotas finas ($P = 0,029$) em comparação com o uso de gotas grossas (Tabela 2).

Foram observados níveis mais altos de Tri em abelhas afixadas no topo das plantas em relação às aquelas instaladas à meia altura ($P = 0,004$; Tabela 2). O tamanho da gota influenciou na contaminação das abelhas com Tri, sendo mais a contaminação com gotas finas em relação às gotas grossas ($P = 0,021$, Tabela 2).

Table 2. Observed amount of bixafen (Bix), prothioconazole (Pro) and trifloxystrobin (Tri) ($\mu\text{g}/\text{bee}$) on honey bees placed on cotton plants sprayed with the fungicide Fox Xpro.

Effects		Bix	Pro	Tri
Drop size	Fine	1.24 A	0.93 A	8.56 A
	Coarse	1.19 B	0.87 B	4.71 B
Height on plant	Top	1.27 a	0.91	9.24 a
	Mid	1.15 b	0.90	4.03 b
	Fine x Top	1.29	0.93	9.87
	Coarse x Top	1.25	0.88	8.60
Interaction	Fine x Mid	1.18	0.93	7.24
	Coarse x Mid	1.12	0.86	0.82
Mean standard error		0.02	0.02	1.43
Source of variation		Probability		
Drop size		0.024	0.029	<0.021
Height on plant		<0.001	>0.200	0.004
Interaction		>0.200	>0.200	0.095

Means followed by the same letter for the same effect (drop size or position on the plant or an interaction between these factors) for each active ingredient do not differ significantly from each other ($P < 0.05$), according to the Tukey test.

Considerando-se os dados obtidos no experimento de contaminação das abelhas com os P. A. que compõem o fungicida Fox Xpro, foram estabelecidas as doses de 1 μg e 7 μg de P. A. por abelha. Foram preparadas soluções com cada um dos três P. A. e com os três P. A. em conjunto, contendo a menor ou a maior quantidade dos P. A. em acetona, para contaminação por contato de cada abelha, em volume de 0,5 μl .

Manejo alimentar das colônias

Durante as 15 semanas de manejo alimentar, as cinco colônias com suplementação alimentar consumiram totalmente os 100g de suplemento proteico e

os 1000ml de xarope energético oferecidos semanalmente. Uma colônia do grupo CRA definhou na décima primeira semana e não foi substituída. Então, para ter o mesmo número de colônias entre os dois grupos, uma das colônias do grupo CSA foi retirada do experimento.

Para o grupo com restrição alimentar (CRA), foram coletados $33,8 \pm 4,9$ g semanalmente por colmeia de pólen apícola (Figura 3). Ao analisar a passagem de abelhas forrageiras trazendo pólen apícola para as respectivas colmeias, observou-se que a eficiência dos coletores de pólen foi de $57,9 \pm 5,1\%$. Sendo assim, de todo o pólen coletado pelas abelhas das colônias com alimentação restrita, apenas 42,1% ficou disponível para a manutenção das colônias.

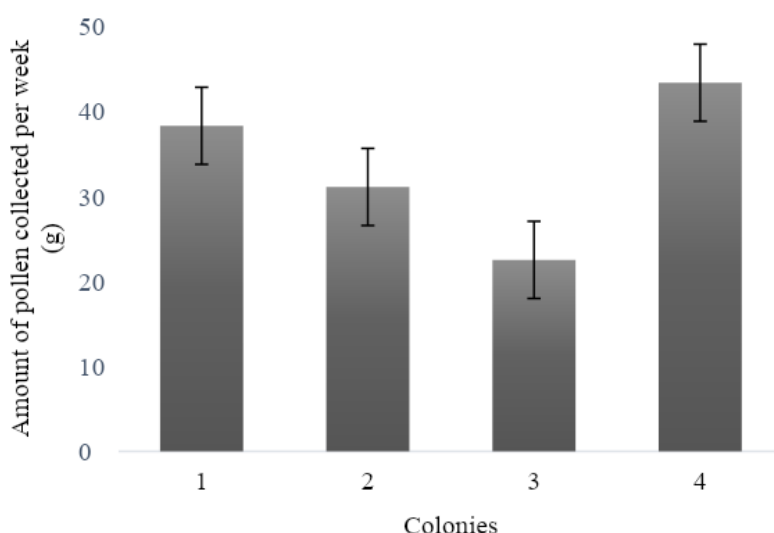


Fig 3. Weekly amount of bee pollen collected from four hives for 15 weeks (mean + standard error of mean).

Para todos os genes estudados, houve pronunciada infrarregulação quando as abelhas foram intoxicadas com a maior dose dos três P. A. em conjunto, para abelhas dos dois grupos de manejo alimentar (Figura 4). Não houve diferença na expressão de todos os genes estudados, na comparação dos grupos controle de abelhas oriundas de colônias com suplementação alimentar e com restrição alimentar.

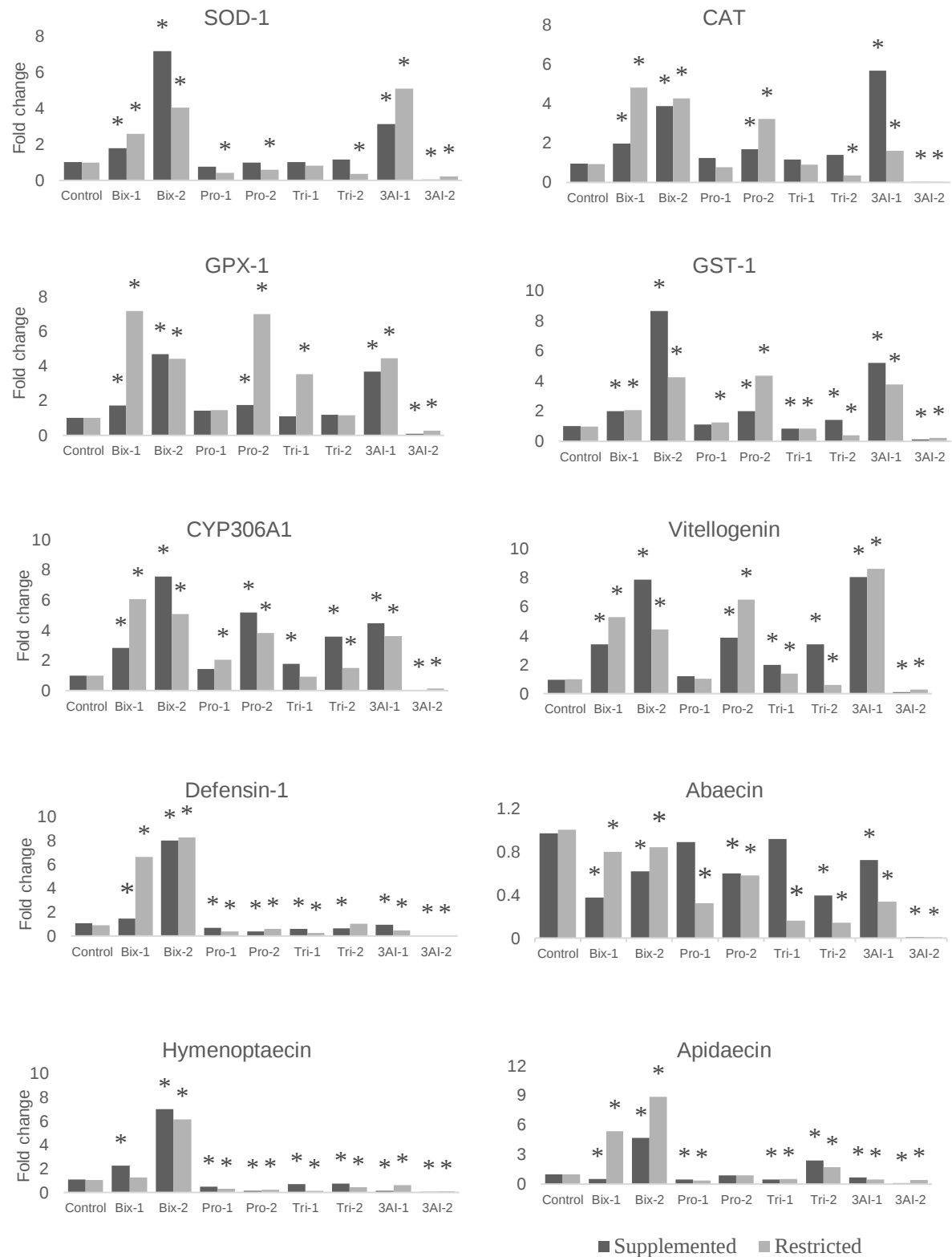


Fig. 4. Genes fold change in the fat body of honey bee foragers from colonies with supplemented or restricted feeding. Shown are the medians of four biological samples per treatment in triplicate.

* Different from control with food supplementation. Dose 1 = $1\mu\text{g A. l. bee}^{-1}$; dose 2 = $7\mu\text{g bee}^{-1}$.

A expressão do gene Superóxido Dismutase 1 (SOD-1) foi suprarregulada com uma das duas doses de Bix e quando se utilizou em conjunto a menor dose de cada um dos três P. A., em abelhas de ambos os manejos alimentares. Houve infrarregulação deste gene apenas para abelhas do grupo CRA quando os indivíduos foram contaminados com as duas doses de Pro e com a maior dose de Tri.

Para o gene Catalase, foi observada aumento da expressão gênica com o uso das duas doses de Bix, a maior dose de Pro e com a menor dose dos três P. A. aplicados em conjunto, em abelhas que se desenvolveram em CSA ou CRA. Houve infrarregulação de Cat quando as abelhas receberam a maior dose de Tri.

A expressão de Glutathione Peroxidase 1 (GPX-1) foi suprarregulada com o uso isolado de Bix em menor e maior doses, maior dose de Pro e com a menor dose em conjunto dos três P. A., em abelhas dos dois grupos de manejo alimentar. O P. A. Tri em menor dose promoveu maior expressão deste gene em abelhas do grupo CRA.

O gene Glutathione S-transferase 1 (GST-1) foi suprarregulado com o uso de 1 ou 7 µl de Bix ou de Bix + Pro + Tri em menor dose, em abelhas dos grupos CSA e CRA. A contaminação exclusiva de Pro promoveu suprarregulação em todas as abelhas, exceto quando foi usada a menor dose em abelhas do grupo CSA. Tri promoveu infrarregulação com as duas doses para as abelhas de ambos os grupos, exceto para abelhas do grupo CSA contaminadas com o maior dose deste P. A.

A expressão do gene Citocromo P450 306A1 (CYP306A1) foi suprarregulada com o uso de todos os P. A., exceto para Pro e Tri em menor dose, para abelhas do grupo CSA e CRA, respectivamente. O gene Vitelogenina teve sua expressão aumentada quando as abelhas foram intoxicadas com um ou os três P. A., exceto com a utilização de Pro em menor dose para abelhas de ambos os grupos de manejo alimentar e Tri em maior dose para abelhas do grupo CRA.

O gene Defensina-1 foi suprarregulado com a contaminação das abelhas com o uso de Bix, exceto para abelhas do grupo CSA que foram contaminadas com a menor dose. Com os demais P. A., isolados ou em conjunto, houve infrarregulação deste gene. Todos os P. A. promoveram infrarregulação do gene Abaecina, exceto Pro e Tri com a menor dose para abelhas do grupo CSA.

A expressão gênica de Himenoptaecina foi suprarregulada quando as abelhas foram contaminadas com Bix, exceto para abelhas do grupo CRA que receberam a

menor dose deste P. A. Com o uso de todos os outros P. A., isolados ou em conjunto, em abelhas dos grupos CSA e CRA, ocorreu infrarregulação do gene Himenoptaecina.

O gene Apidaecina foi suprarregulado quando as abelhas do grupo CRA foram contaminadas com uma das duas doses de Bix e a maior dose de Tri. As abelhas do grupo CSA tiveram aumento da expressão de Apidaecina quando foram contaminadas com a maior dose de Bix ou de Tri. Para as demais comparações inerentes à Apidaecina, houve infrarregulação deste gene para abelhas de ambos os grupos de manejo alimentar, exceto para Pro em maior dose, que não diferiu do controle.

Discussão

Contaminação das abelhas melíferas fixadas em plantas de algodão

O produto comercial avaliado, de acordo com a sua bula, contém 125 g.L^{-1} de Bix, 175 g.L^{-1} de Pro e 150 g.L^{-1} de Tri. Considerando-se essas concentrações, ao diluir 0,5 L deste produto em 144 L de água (diluição adotada neste trabalho), deveriam ser obtidos: $0,434 \text{ g.L}^{-1}$ de Bix, $0,608 \text{ g.L}^{-1}$ de Pro e $0,521 \text{ g.L}^{-1}$ de Tri. Todos os três P. A. foram detectados na solução de pulverização usada em proporções semelhantes às descritas no rótulo. No entanto, a concentração equivalente observada na solução de cada princípio ativo superou a concentração teórica em 43, 31,9 e 38,4%, para Bix, Pro e Tri, respectivamente.

O fungicida Fox Xpro é classificado pelo fabricante como uma suspensão concentrada (Bayer, 2019). Uma suspensão é uma mistura heterogênea, com uma ou mais substâncias sólidas dispersas que não são igualmente distribuídas em um determinado líquido (Atkins et al., 2016). Devido a essa instabilidade, tende a ocorrer segregação ao longo do tempo, sob a influência da gravidade, tanto na embalagem quanto no tanque de pulverização, mesmo quando o produto já está diluído (Luckham, 1989); isso pode afetar a quantidade de P. A. que chega ao alvo e nas abelhas que visitam a cultura em tratamento fitossanitário.

Em nosso estudo, a embalagem do produto foi devidamente agitada antes da coleta de cada amostra. Além disso, as soluções colocadas no tanque do pulverizador foram agitadas imediatamente antes de cada aplicação. Contudo, considerando as características químicas do produto avaliado, variações também podem ocorrer no campo, mesmo quando as recomendações são seguidas criteriosamente no preparo

das caldas de aplicação (Hazra e Purkait, 2019). Este problema pode ser minimizado se o sistema de agitação da calda do pulverizador estiver disponível e funcionando durante todo o processo de pulverização.

No produto comercial, Pro é o P. A. presente em maior quantidade, teoricamente. Entretanto, ele foi observado em menor quantidade nas amostras de abelhas. A solubilidade de Pro é influenciada pelo pH da água. A um pH de 8,0, a solubilidade para este P. A. é de 0,3 g L⁻¹ de solução (IBAMA, 2019). Em nosso experimento, o pH da água utilizada foi de 7,8. Assim, teoricamente, a solução apresentava 0,608g deste P. A. L⁻¹ na calda de aplicação, considerando a diluição utilizada na aplicação. Portanto, em função da baixa solubilidade de Pro, é provável que sua diluição não tenha ocorrido adequadamente, implicando em desuniformidade da distribuição no ambiente tratado.

Tri foi detectado em todas as amostras de abelhas e as quantidades foram sempre maiores em relação aos demais P. A. A detecção de maiores quantidades de Tri pode ser explicada por sua alta estabilidade, que pode ser observada mesmo após a absorção pelas plantas (EFSA et al., 2017).

As abelhas visitam flores e outras estruturas que liberam exsudatos açucarados, mas também costumam descansar nas folhas (Thompson, 2010). No caso do algodoeiro, as abelhas coletam o néctar tanto das flores quanto dos nectários extraflorais, que ficam nas folhas (Rhodes, 2002). No momento da aplicação de agrotóxicos, as abelhas podem ser encontradas nessas partes das plantas ou se movimentando entre elas. Portanto, neste trabalho as abelhas foram fixadas em partes das plantas onde podem ser encontradas nesta cultura agrícola, a fim de obter informações sobre a contaminação das abelhas em situações realistas de interação com as plantas.

O uso de gotas finas resultou em maior contaminação das abelhas com os três P. A., em comparação com gotas grossas. Para um mesmo volume, à medida que diminui o tamanho das gotas, aumenta o número de gotas geradas e, consequentemente, aumenta o potencial de cobertura da pulverização (Guler et al., 2012), aumentando as chances de uma gota atingir o inseto.

Houve maior contaminação das abelhas que estavam nas partes superiores das plantas, exceto para Pro. Essa maior contaminação das abelhas posicionadas no

topo das plantas se deve ao fato de mais produto atingir essas folhas, conforme observado por Prado et al. (2019), que encontraram maiores níveis de deposição nas folhas superiores das plantas de soja (69%), seguidas pelas partes intermediárias (22%) e inferiores (9%), em ensaios de pulverização controlada.

Os estudos sobre o impacto de pesticidas na saúde das abelhas geralmente carecem de informações sobre as doses de produtos que realmente afetam as espécies não-alvo, mesmo assumindo que todas as recomendações agrônomicas acerca dos equipamentos de aplicação e condições ambientais sejam seguidas (Dhananjayan et al., 2019). Além disso, estimar os riscos de contaminação de espécies não-alvo tende a ser impreciso porque a forma como os agrotóxicos são efetivamente utilizados na agricultura muitas vezes tende a não refletir a realidade. A contaminação letal das abelhas pode ocorrer devido à aplicação incorreta e não recomendada de agrotóxicos no campo (Wauchope, 2022).

Manejo alimentar das colônias

No grupo de CRA, a instalação de coletores de pólen diminuiu a disponibilidade deste alimento proteico para as abelhas. A quantidade total de pólen apícola coletada por colmeia durante as 15 semanas foi de 507g, quantidade equivalente a 57,9% do total de pólen apícola trazido para as colmeias pelas abelhas deste grupo. Esta quantidade é relativamente pequena, se considerar-se que podem ser obtidos até 20 kg por colmeia por ano (Campos et al., 2010). A manutenção dos coletores de pólen por várias semanas pode implicar em redução das quantidades coletadas de pólen em virtude do ajuste populacional feito pelas colônias (Couto e Couto, 2006; Mattos et al., 2015), porém, neste trabalho, a quantidade de pólen apícola colhida foi relativamente pequena desde os primeiros dias de restrição alimentar, indicando baixa disponibilidade de pólen no campo (Vaudo et al., 2015).

Diferente de outras culturas zootécnicas, a apicultura não demanda alimentação rotineira das colônias, exceto em períodos de chuvas intensas, inverno rigoroso e escassez de néctar e pólen para forrageamento das abelhas campeiras (Somerville, 2005).

As colônias submetidas à restrição alimentar, no final apresentaram populações visualmente reduzidas, com o néctar e o pólen apícola que conseguiram levar para

dentro das colmeias, passando pelos coletores de pólen. Para o outro grupo (CSA), ter fornecido pasta proteica à base de mel e pólen apícola, alimentos que as abelhas consomem naturalmente, pode ter contribuído para a aceitação do alimento, que foi totalmente consumido pelas abelhas. Dietas adequadas podem contribuir para a imunocompetência e resistência a patógenos (Alaux et al., 2010; Di Pasquale et al., 2013) e tolerância agrotóxicos (Schmehl et al., 2014).

As abelhas do grupo CSA consumiram todo o xarope energético oferecido duas vezes por semana. Este substituto do néctar, em associação com o suplemento proteico, pode favorecer a procura por mais alimento proteico no campo, a taxa de postura da rainha e o comportamento higiênico (Somerville, 2005).

Expressão de genes importantes para a saúde das abelhas

Segundo a ficha de informações de segurança de produtos químicos do fungicida comercial (Bayer, 2022), a DL_{50} de contato para abelhas melíferas é superior a $200 \mu\text{g indivíduo}^{-1}$. No presente estudo, para os tratamentos com a mistura dos três P.A, as doses estabelecidas (1 e $7 \mu\text{g indivíduo}^{-1}$ de cada P. A.) podem ser consideradas subletais, pois são cerca de 10 e quatro vezes menores que a dose letal divulgada pelo fabricante, respectivamente.

Christen et al. (2019), avaliaram o efeito tóxico da Azoxistrobina, fungicida que pertence ao grupo das estrobilurinas, assim como o P. A. Tri, avaliado neste trabalho. Os autores observaram regulação negativa da transcrição de genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo, fosforilação oxidativa e regulação hormonal, podendo prejudicar a produção de energia, ontogenia e comportamento das abelhas. Tri foi detectado em pólen apícola obtido de plantas cultivadas (cultura alvo) e no pólen apícola oriundo das plantas marginais (David et al., 2016). Bix foi detectado em amostras de pão das abelhas (Bokšová et al., 2021), e Pro já foi detectado em várias amostras de pólen apícola (Roszko et al., 2016; Prado et al., 2019; Raimets, 2020). As informações acerca de contaminação de abelhas por contato são escassas.

O estudo da expressão gênica em abelhas pode favorecer a compreensão dos efeitos à exposição a agentes estressores como os agrotóxicos. Neste estudo, foram escolhidos genes inerentes ao estresse oxidativo e detoxificação (SOD-1, CAT, GPX-1, GST-1 e CYP306A1), nutrição e longevidade (Vitелогенина) e imunidade

(Defensina-1, Abaecina, Hymenoptaecina e Apidaecina). O metabolismo da abelha, assim como de qualquer outra espécie aeróbica, implica na formação de radicais livres. Quando não há controle dessas moléculas prejudiciais à saúde das células, ocorre o estresse oxidativo (Weirich et al., 2002).

Durante o uso e metabolismo do oxigênio levado para dentro do organismo, formam-se moléculas agressivas conhecidas como radicais livres e o organismo não consegue manter esses radicais sob controle e ocorre o estresse oxidativo, que, por sua vez, é inibido pelo sistema antioxidante. Esse processo é natural em virtude do metabolismo do oxigênio e de outras substâncias coletadas pelas abelhas, porém, agentes estressores bióticos e abióticos podem desbalancear a homeostase celular, gerando mais espécies reativas de oxigênio do que o indivíduo consegue neutralizar e eliminar (Yan et al., 2012; Olgun et al., 2020).

Doses subletais de inseticidas como organoclorados e organofosforados (Rehman e Waliullah, 2012; Chakrabarti et al., 2015) e neonicotinóides (Balieira et al., 2018) podem implicar em maior produção de enzimas antioxidantes como SOD-1, CAT e GPX, com o objetivo de manter a homeostase celular. Contudo, a dose e as características do xenobiótico podem prejudicar a produção destas enzimas (Bus, 2017). Os P. A. Bix e Tri são inibidores da cadeia respiratória e a sua ação pode ser desfavorável à produção de enzimas antioxidantes (Casida e Durkin, 2016; D'Hose et al., 2021).

No presente estudo, as duas doses de Bix promoveram suprarregulação de SOD-1, CAT, GPX-1 e GST-1, de ambos os manejos alimentares. A expressão gênica de SOD-1 foi infrarregulada e se manteve semelhante ao controle, respectivamente para abelhas CRA e CSA. A expressão de CAT e GPX-1 foi semelhante para abelhas com os dois manejos alimentares, sendo alterada apenas com as maiores doses dos P. A., por meio de suprarregulação. A expressão de GST-1 foi suprarregulada quando as abelhas foram contaminadas com as duas doses de Pro, exceto em abelhas do grupo CRA com o uso da menor dose. Com o P. A. Tri, SOD-1 e CAT não tiveram suas expressões alteradas, exceto com a maior dose em abelhas do grupo CRA. Este P. A. promoveu aumento da expressão de GPX-1 quando abelhas do grupo CRA foram contaminadas com a menor dose. A expressão de GST-1 foi alterada em todos

os tratamentos com Tri, em abelhas oriundas de colônias de ambos os manejos alimentares.

O gene CYP306A1 pertence à família dos citocromos P450, que está envolvida em vários processos de biossíntese e detoxificação celular em virtude da exposição a xenobióticos. A suprarregulação de genes CYP6 está associada a resistência à piretróides e neonicotinóides em outros insetos. Sugere-se que estes genes podem ser úteis para que as abelhas consigam responder positivamente, no que diz respeito a detoxificação, em situações de contaminação com agrotóxicos (Claudianos et al., 2006). Neste estudo, a expressão do gene CYP306A1 foi suprarregulada com todos os P. A. utilizados isoladamente, exceto para Pro e Tri em menores doses, para abelhas dos grupos CSA e CRA, respectivamente.

A Vitelogenina é uma proteína de estocagem e sua expressão está atrelada ao nível nutricional do indivíduo. Pode ser considerado um gene pleiotrópico, pois, além de auxiliar no transporte de lipídios, está relacionada com a longevidade, imunomodulação e regulação do estresse oxidativo (Salmela et al., 2022). A contaminação com os três P. A. separadamente, promoveu suprarregulação da Vitelogenina, exceto com Pro em menor dose e Tri em maior dose para abelhas do grupo CRA.

No que diz respeito aos genes estudados que são estritamente ligados ao sistema imune das abelhas, houve evidente alteração da expressão gênica. Para Defensina-1, apenas não ocorreu infrarregulação com o uso de Bix, que resultou em suprarregulação deste gene. Em abaecina, a infrarregulação só não foi observada com o uso de Pro e Tri em menor dose, em abelhas do grupo CSA, que não diferiram do controle CSA. Em Himenoptaecina, a infrarregulação ocorreu com todos os P. A., exceto Bix, que gerou suprarregulação, exceto com a menor dose, para abelhas do grupo CRA, que não diferiram do controle CSA. Para Apidaecina, apenas não ocorreu alteração da expressão deste gene com o uso isolado de Pro em menor dose.

A suprarregulação gênica tem por objetivo o reequilíbrio do funcionamento celular, visando eliminar substâncias ou microrganismos que podem prejudicar a sua homeostase. Neste trabalho, a contaminação das abelhas com os três P. A. em conjunto resultou em respostas diferentes em relação às doses estudadas. Com o uso de 1 µg de cada P. A. por abelha ocorreu suprarregulação gênica, exceto para

abaecina, porém, com a maior dose (7 µg de cada P. A. por abelha), houve acentuada infrarregulação de todos os genes.

A expressão gênica requer energia produzida nas células e quanto maior a necessidade da expressão dos genes, maior será a demanda por energia (Frumkin et al., 2017). Entretanto, mesmo havendo maior demanda pela expressão dos genes para que os efeitos prejudiciais dos xenobióticos seja o menor possível, a disponibilidade de energia pode ser um fator determinante para a resposta celular frente ao desafio de intoxicação. Dos três P. A., Bix e Tri são conhecidos por atuarem como inibidores da produção de energia celular (Casida e Durkin, 2016; D'Hose et al., 2021). Com a contaminação das abelhas com estes P. A. com a maior dose avaliada, a demanda energética celular pode não ter sido atendida e, sendo assim, a expressão gênica foi prejudicada. Dessa forma, as abelhas podem se tornar mais suscetíveis a outros agentes estressores, dada a fragilidade decorrente da exposição ao fungicida com os três P. A.

A resposta frente ao desafio com os P. A. isolados ou em conjunto foi semelhante entre abelhas que tiveram alimentação suplementada ou restrita para a maioria das comparações. Entretanto, a expressão gênica de abelhas do grupo CSA não diferiu do grupo controle para SOD-1, com o uso de Pro em ambas as doses, Cat (Tri em maior dose), GPX-1 (Tri em menor dose), GST-1 (Pro em menor dose) e CYP306A1 (Pro em menor dose). Para as mesmas comparações, abelhas do grupo CRA tiveram expressão gênica diferente do controle CSA.

Conclusão

Os P. A. Bix, Pro e Tri em promoveram alteração da expressão gênica em abelhas melíferas. A contaminação com os três P. A. em conjunto, com a menor dose, resultou em suprarregulação dos genes estudados, exceto para Defensina 1, Abaecina, Himenoptaecina e Apidaecina.

O uso das maiores doses dos três P. A. em conjunto resultou em expressiva infrarregulação de todos os genes estudados, independente do manejo alimentar das colônias nas quais as abelhas se desenvolveram.

Abelhas oriundas de colônias que tiveram alimentação restrita apresentaram mais alterações gênicas que abelhas oriundas de colônias com alimentação suplementada.

Referências

Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y (2010) Diet effects on honeybee immunocompetence. **Biology Letters** 6:562-565.

Atkins P, Jones L, Laverman L (2016) **Chemical principles: the quest for insight**. New York: W. H. Freeman and Company.

Balieira KVB, Mazzo M, Bizerra PFV, Guimarães ARDJS, Nicodemo D, Mingatto FE (2018) Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine. **Apidologie** 49:562-572.

Bayer (2019) **Fox Xpro: Fungicida**. Disponível em: <<https://www.agro.bayer.com.br/essenciais-do-campo/protecaodecultivos/fox-xpro>>. Acesso em: 17 Ago. 2023

Bayer (2022) **Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ). Fox Xpro**. Disponível em: <<https://www.bayerfispq.com.br/Downloads/DownloadFile?idForm=4608>>. Acesso em: 17 Ago. 2023.

Behmer ST (2009) Insect herbivore nutrient regulation. **Annual Review of Entomology** 54:165-187.

Biddinger DJ, Robertson JL, Mullin C, Frazier J, Ashcraft SA, Rajotte EG, Joshi NK, Vaughn M (2013) Comparative toxicities and synergism of apple orchard pesticides to *Apis mellifera* (L.) and *Osmia cornifrons* (Radoszkowski). **PLoS One** 8(9): e72587.

Bokšová A, Kazda J, Stejskalová M, Šubrt T, Uttl L, Mráz P, Bartoška J (2021) Findings of herbicide and fungicide residues in bee bread. **Plant, Soil and Environment** 67:343–352.

Brodschneider R, Crailsheim K (2010) Nutrition and health in honey bees. **Apidologie** 41:278–294.

Bus JS (2017) "The dose makes the poison": key implications for mode of action (mechanistic), research in a 21st century toxicology paradigm. **Current Opinion in Toxicology** 3:87e91.

Campos MGR, Frigerio C, Lopes J, Bogdanov S (2010) What Is the future of bee-pollen? **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science** 2:131-144.

Casida JE, Durkin KA (2016) Pesticide chemical research in toxicology: lessons from nature. **Chemical Research Toxicology** 30:94-104.

Chakrabarti P, Rana S, Sarkar S, Smith B, Basu P (2015) Pesticide-induced oxidative stress in laboratory and field populations of native honey bees along intensive agricultural landscapes in two Eastern Indian states. **Apidologie** 46:107-129.

Christen V, Krebs J, Fent K (2019) Fungicides chlorothanolin, azoxystrobin and folpet induce transcriptional alterations in genes encoding enzymes involved in oxidative phosphorylation and metabolism in honey bees (*Apis mellifera*) at sublethal concentrations. **Journal of Hazardous Materials** 5:215-226.

Cizelj GG, Bozic J, Oven I, Mrak V, Narat M (2016) Prochloraz and coumaphos induce different gene expression patterns in three developmental stages of the Carniolan honey bee (*Apis mellifera carnica* Pollman). **Pesticide Biochemistry Physiology** 128: 68-75.

Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, Berenbaum MR, et al (2006) A deficit of detoxification enzymes: Pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect Molecular Biology** 15:615–636.

Couto RH, Couto LA (2006) Apicultura: manejo e produtos. Jaboticabal: Funep, 193p.

David A, Botías C, Abdul-sada A, Nicholls E, Rotheray EL, Hill EM, Goulson D (2016) Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. **Environment International** 88:169-178.

Deising HB, Reimann S, Pascholati SF (2008) Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology** 39:286-95.

Dhananjayan V, Jayakumar S, Ravichandran B (2020) Conventional methods of pesticide application in agricultural field and fate of the pesticides in the environment and human health. **Springer** 1-40.

D'Hose D, Isenborghs P, Brusa D, Jordan BF, Gallez B (2021) The Short-Term Exposure to SDHI Fungicides Boscalid and Bixafen Induces a Mitochondrial Dysfunction in Selective Human Cell Lines. **Molecules** 26, 5842.

Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, Suchail S, Brunet J-L, Alaux C (2013) Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? **PLoS ONE** 8:e72016.

European Food Safety Authority (EFSA), Arena M, Auteri D, Barmaz S, Bellisai G, Brancato A, et al (2017) Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance trifloxystrobin. **EFSA Journal** 15:e4989.

Evans JD (2006) Beepath: an ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. **Journal of Invertebrate Pathology** 93:135-139.

Fisher A, Coleman C, Hoffmann C, Fritz B, Rangel J (2017) The synergistic effects of almond protection fungicides on honey bee (Hymenoptera: *Apidae*) forager survival. **Journal of Economic Entomology** 110:802-808.

Fisher A, DeGrandi-Hoffman G, Smith BH, Johnson M, Kaftanoglu O, Cogley T, Fewell JH, Harrison JF (2021) Colony field test reveals dramatically higher toxicity of a widely-used mito-toxic fungicide on honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Pollution** 269:115964.

Fisher A, DeGrandi-Hoffman G, Liao LH, Tadei R, Harrison JF (2023) The challenge of balancing fungicide use and pollinator health. **Advances in Insect Physiology** p.117-190.

Frumkin I, Schirman D, Rotman A, Li F, Zahavi L, Mordret E, Asraf O, Wu S, Levy SF, Pilpel Y (2017) **Gene architectures that minimize cost of gene expression.** **Molecular Cell** 65:142–153.

Guler H, Zhu H, Ozkan HE, Ling P (2012) Characterization of hydraulic nozzles for droplet size and spray coverage. **Atomization Sprays** 22(8):627-645.

Hazra DK, Purkait A (2019) Role of pesticide formulations for sustainable crop protection and environment management: a review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry** 8:686-693.

IBAMA (2019) **Protioconazol: perfil ambiental.** Disponível em: > <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/arquivos/perfis-ambientais/2019/2019-08-16-Ibama-Perfil-Ambiental-Protioconazol.pdf/view>>. Acesso em: 18 Ago. 2023.

Kubik M, Nowacki J, Pidek A, Warakomska Z, Michalczyk L, Goszyński W (1999) Pesticide residues in bee products collected from cherry trees protected during blooming period with contact and systemic fungicides. **Apidologie** 30:521–532.

Lambert O, Piroux M, Puyo S, Thorin C, L'Hostis M, Wiest L, Bulete A, Delbac F, Pouliquen H (2013) Widespread occurrence of chemical residues in beehive matrices from apiaries located in different landscapes of western France. **PLoS One** 8:e67007.

Lourenço AP, Mackert A, Cristino AS, Simões ZLP (2008) Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. **Apidologie** 39:372–385.

Luckham PF (1989) The physical stability of suspension concentrates with particular reference to pharmaceutical and pesticide formulations. **Pest Management Science** 25:25-34.

Mattos IM, Souza J, Soares AEE (2015) Analysis of the effects of colony population size and feeding supplementation on bee pollen production, **Journal of Apicultural Research** 54:411-419.

Mesquita PL, Afonso RJCF, Aquino SF, Leite GS (2013) Validação de Método de cromatografia líquida para a determinação de sete ácidos graxos voláteis intermediários da digestão anaeróbia. **Engenharia Sanitaria e Ambiental** 18:295–302.

Mussen EC, Lopez JE, Peng CY (2004) Effects of selected fungicides on growth and development of larval honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: *Apidae*). **Environmental Entomology** 33:1151-1154.

National Honey Bee Health Stakeholder. Conference Steering Committee (2012) **Report on the National Stakeholders Conference on Honey Bee Health. US Department of Agriculture**, Washington, DC.

Nicodemo D, Maioli MA, Medeiros HCD, Guelfi M, Balieira KVB, De Jong D, Mingatto FE (2014) Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. **Environmental Toxicology Chemistry** 33:2070–2075.

Nicodemo D, Mingatto FE, De Jong D, Bizerra FVB, Tavares MA, Bellini WC, Vicente EF, Carvalho A (2020) Mitochondrial respiratory inhibition promoted by pyraclostrobin in fungi is also observed in honey bees. **Environmental Toxicology Chemistry** 39:1267-1272.

OECD (1998) Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals** 2:2-4.

Olgun T, Dayioğlu M, Özsoy-Tağkiran N (2020) Pesticide and Pathogen Induced Oxidative Stress in Honey Bees (*Apis mellifera* L.). **Mellifera** 20:32-52.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel - based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters** 26:509-515.

Pettis JS, Lichtenberg EM, Andree M, Stitzinger J, Rose R, Vanengelsdorp D (2013) Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS One** 8:e70182.

Prado EP, Raetano CG, do Amaral Dal Pogetto MHF, de Souza Christovam R, Lopes PRM, Tomaz RS, Ferreira-Filho PJ, Zied DC, Guerreiro JC, de Cerqueira DTR (2019) Spray volume deposits and fungicide efficacy on soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). **Australian Journal of Experimental Agriculture** 13:1698–1705.

Prado A, Pioz M, Vidau C, Requier F, Jury M, Crauser D, Brunet JL, Le Conte Y, Alaux C (2019) Exposure to pollen-bound pesticide mixtures induces longer-lived but less efficient honey bees. **Science of the Total Environment** 650:1250-1260.

Quinlan GM, Grozinger CM (2023) Honey bee nutritional ecology: from physiology to landscapes. **Advances in Insect Physiology** 64:289-345.

Raimets R, Bontšutšnaja A, Bartkevics V, Pugajeva I, Kaart T, Puusepp L, Pihlik P, Keres I, Viinalass H, Mänd M, Karise R (2020) Pesticide residues in beehive matrices are dependent on collection time and matrix type but independent of proportion of foraged oilseed rape and agricultural land in foraging territory. **Chemosphere** 238 p.

Rahman A, Ali MA, Xavier C, Santos DM, Daam MA, Azevedo EB, Castele JB, Viera EM (2022) Modified-QuEChERS method for extracting thiamethoxam and imidacloprid from stingless bees: development, application, and green metrics. **Environmental Toxicology Chemistry** 41:2365-2374.

Raij BV, Canterella H, Quaggio JA, Furlani AMC (1996) **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2ed., Campinas: Instituto Agrônômico.

Rebouças EDL, Costa JJDN, Passos MJ, Passos JRDS, Hurk RVD, Silva JRV (2013) Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 56:143-154.

Rehman S, Waliullah MIS (2012) Chlorpyrifos-induced neuro-oxidative damage in bee. **Toxicology and Environmental Health Sciences** 4:30-36.

Rhodes J (2002) Cotton pollination by honeybees. **Australian Journal of Experimental Agriculture** 42:513-518.

Rondeau S, Raine NE (2022) Fungicides and bees: a review of exposure and risk. **Environment International** 165:107311.

Roszek ML, Kamińska M, Szymczyk K, Jędrzejczak R (2016) Levels of selected persistent organic pollutants (PCB, PBDE) and pesticides in honey bee pollen sampled in Poland. **PLoS One** e0167487.

Salmela H, Harwood GP, Münch D, Elisk CG, Herrero-Galán E, Vartiainen MK & Amdam GV (2022) Nuclear translocation of vitellogenin in the honey bee (*Apis mellifera*). **Apidologie** 53:13.

SAS Institute (2013) SAS 9.2 online documentation. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Schmehl DR, Teal PEA, Frazier JL, Grozinger CM (2014) Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Insect Physiology** 71:177-190.

Serafim JA, Silveira RF, Vicente EF (2021) Fast Determination of Short-Chain Fatty Acids and Glucose Simultaneously by Ultraviolet/Visible and Refraction Index

Detectors via High-Performance Liquid Chromatography. **Food Analytical Methods** 4:1387–1393.

Siede R, Meixner MD, Buchler R (2012) Comparison of transcriptional changes of immune genes to experimental challenge in the honey bee (*Apis mellifera*). **Journal Apicultural Research** 51:320–328.

Simon-Delso N, San Martin G, Bruneau E, Hautier L (2018) 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** 7241p.

Simone M, Evans JD, Spivak, M (2009) Resin collection and social immunity in honey bees. **Evolution** 63:3016-3022.

Somerville D (2005) Fat bees skinny bees: a manual on honey bee nutrition for beekeepers. p. 1-142.

Tadei R, Menezes-Oliveira V, Silva-Zacarin ECM (2020) Silent effect of the fungicide pyraclostrobin on the larval exposure of the non-target organism Africanized *Apis mellifera* and its interaction with the pathogen *Nosema ceranae* in adulthood. **Environmental Pollution** 267:115622.

Thompson HM (2010) Risk assessment for honey bees and pesticides—recent developments and ‘new issues’. **Pest Management Science** 66:1157-1162.

Traynor KS, vanEngelsdorp D, Lamas ZS (2021) Social disruption: sublethal pesticides in pollen lead to *Apis mellifera* queen events and brood loss. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 214:112105.

Vaudo AD, Tooker JF, Grozinger CM, Patch HM (2015) Bee nutrition and floral resource restoration. **Current Opinion in Insect Science** 10:133–141.

Wauchope RD (2022) Pesticide Dissipation and Fate in Agricultural Settings: a Review of Research. **Modeling Processes and Their Interactions in Cropping Systems** p. 203-250.

Weirich GF, Collins AM, Williams VP (2002) Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. **Apidologie** 33:3-14.

Yan H, Meng F, Jia H, Guo X, Xu B, (2012). The identification and oxidative stress response of a zeta class glutathione S-transferase (GSTZ1), gene from *Apis cerana cerana*. **Journal of insect physiology** 58:782-791.