



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS

Suelen Matos da Silva

Influência de fungicidas utilizados na cultura da macieira sobre o comportamento higiênico e a sanidade de colmeias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

Florianópolis-SC.

2022

Suelen Matos da Silva

Influência de fungicidas utilizados na cultura da macieira sobre o comportamento higiênico e a sanidade de colmeias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Agroecossistemas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestra em Agroecossistemas
Orientador: Prof. Alex Sandro Poltroniri, Dr.
Coorientadora: Dr^a. Marcia Regina Fanta

Florianópolis-SC.
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

da Silva, Suelen Matos

Influência de fungicidas utilizados na cultura da
macieira sobre o comportamento higiênico e a sanidade de
colmeias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) / Suelen
Matos da Silva ; orientador, Alex Sandro Poltronieri,
coorientadora, Márcia Regina Fanta, 2022.

96 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Agroecossistemas, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Agroecossistemas. 2. Abelhas. 3. Fungicidas. 4.
Sanidade. 5. Subletalidade. I. Poltronieri, Alex Sandro.
II. Fanta, Márcia Regina. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Agroecossistemas. IV. Título.

Suelen Matos da Silva

Influência dos fungicidas utilizados na cultura da macieira sobre o comportamento higiênico e a sanidade de colmeias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 15 de setembro de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. André Amarildo Sezerino, Dr.
Instituição Epagri

Prof. João Paulo Pereira Paes, Dr.
Instituição IFSC/Campus Canoinhas

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Agroecossistemas.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Alex Sandro Poltronieri, Dr.
Orientador

Florianópolis - SC, 2022.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais, de onde tirei a determinação para nunca desistir dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar forças, paciência e sabedoria para lidar com essa trajetória árdua e linda ao mesmo tempo que se chama “Mestrado”, nos momentos mais difíceis foi a ti que recorri para suportar esse processo, sempre em meus pensamentos e falas, acordo e durmo contigo senhor. Agradeço a mim por nunca ter pensado em desistir, em acreditar sempre no meu potencial e determinação. Agradeço aos colegas e amigos Dylan Thomas Telles, Leticia Gomes, Renata Krauchuki e Tatiana Mello Damasco por ajudar na padronização e coletas das abelhas do apiário. Agradeço a amiga, companheira e cúmplice de trajetória científica Adriana Chaves pela paciência, solidariedade e sabedoria em compartilhar as colmeias para meus estudos. Agradeço a colaboração e determinação da amiga Emily Scheffer Sabbi por me ajudar nas coletas e análises laboratoriais da minha pesquisa. Agradeço ao meu amado orientador o professor Alex Sandro Poltronieri por ter me aceito como orientada e pela paciência, sabedoria e altivez que sempre teve comigo, nos momentos certos sempre me aconselhou, orientou e brigou com toda delicadeza e brio que ele tem, com seu olhar doce e sorriso faceiro me deixou confortável para suportar essa trajetória, obrigada pela amizade e todo o conhecimento que pode me repassar. Agradeço por último, mas não menos importante a Dr^a. Márcia Regina Fanta, pela amizade, paciência, conhecimentos e profissionalismo a mim repassado, obrigada por ter sido uma exímia professora, com você aprendi com maestria a ser uma profissional em apicultura e a amar ainda mais as abelhas, desejo ter pelo menos 1/3 do seu conhecimento.

Sou extremamente grata a vocês, Márcia e Alex por tudo!!!

A persistência é o caminho do êxito.

Charles Chaplin

RESUMO

No sul do Brasil a produção de maçãs é dependente da polinização, destacando-se a abelha *Apis mellifera* como o polinizador principal na polinização dirigida da cultura. Devido a doenças fúngicas, a pulverização de fungicidas é utilizada para evitar a perda da produção, esse procedimento faz com que *A. mellifera* entre em contato com o produto, ocasionando efeitos subletais e desconhecidos. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento higiênico, infestação de *Varroa destructor*, força das colmeias e índice de *Vairimorpha* ssp. em *A. mellifera* expostas aos fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®], utilizados em pomares de macieiras. O bioensaio foi composto por três repetições, representadas pelas colmeias e quatro tratamentos. Cada colmeia foi exposta a dietas alimentares correspondentes aos tratamentos: Controle, Captan[®]SC, Zignal[®] e Mistura. As colmeias foram avaliadas nos tempos 0, 60, 90, 180, e 240 dias, quanto ao comportamento higiênico (CH), infestação do ácaro *V. destructor* (IVD) e índice de *Vairimorpha* ssp. A força das colmeias foi avaliada nos tempos 0, 45, 135 e 180 dias. Os resultados demonstraram aumento no índice de ácaro *V. destructor*, redução no CH e força das colmeias tratadas, evidenciando um efeito dos tratamentos que foi dependente do tempo. O tratamento mistura apresentou os piores resultados, com redução no CH de 18,4 % nos tempos 0 e 60 dias após o início dos bioensaios e redução na força das colmeias, comprometendo principalmente a área de cria e população de adultas. A análise da prevalência para *Vairimorpha* spp. indicou que os tratamentos e o tempo interferiram no número de abelhas infectadas. O tempo diferiu 60 dias após a exposição entre os tratamentos Captan[®]SC e Mistura. Nos tratamentos foi observada diferença 120 dias entre os tratamentos Zignal[®] e Mistura. Nossos resultados indicaram que doses de campo dos fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®] exercem efeitos subletais em colmeias de *A. mellifera*, causando prejuízos em várias gerações ao longo das análises.

Palavras chaves: Mortalidade, subletalidade, *Vairimorpha* ssp, pomar de macieira, poliniza

ABSTRACT

In southern Brazil, apple production is dependent on pollination, highlighting the *Apis mellifera* bee as the main pollinator in the directed pollination of the crop. Due to fungal diseases, spraying fungicides is used to avoid production loss. This procedure makes *A. mellifera* come into contact with the product, causing sublethal and unknown effects. Therefore, this study aimed to evaluate the hygienic behavior, *Varroa destructor* infestation, hive strength and *Vairimorpha* ssp. rate in *A. mellifera* exposed to Captan[®]SC and Zignal[®] fungicides used in apple orchards. The bioassay consisted of three repetitions, represented by the hives, and four treatments. Each hive was exposed to food diets corresponding to the treatments: Control, Captan[®]SC, Zignal[®] and Mixture. The hives were evaluated at 0, 60, 90, 180, and 240 days for hygienic behavior (HB), *V. destructor* mite infestation (VDI), and *Vairimorpha* ssp. rate. Hive strength was evaluated at 0, 45, 135, and 180 days. The results showed an increase in the *V. destructor* mite rate, a decrease in HB and strength of the treated hives, evidencing a time-dependent effect of the treatments. The mixture treatment had the worst results, with an 18.4% decrease in the HB at 0 and 60 days after the beginning of the bioassays and a decrease in the strength of the hives, mainly compromising the brood area and the adult mite population. Prevalence analysis for *Vairimorpha* spp. showed that treatments and time interfered with the number of infected bees. Time differed 60 days after exposure between Captan[®]SC and Mixture. A difference was noticed at 120 days between the Zignal[®] and Mixture treatments. Our results indicated that field doses of the fungicides Captan[®]SC and Zignal[®] have sublethal effects on *A. mellifera* hives, causing damage in several generations throughout the analyses.

Keywords: Mortality, sublethality, *Vairimorpha* ssp, apple orchard, pollinators.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Colmeias de <i>A. melliferas</i> no apiário experimental da Cidade das Abelhas, Florianópolis - SC.....	41
Figura 2. (A) Xarope de açúcar (alimento energético), (B) coletor de pólen na entrada da colmeia.....	42
Figura 3. Perfuração da área tratada para avaliação do Comportamento Higiênico (CH).....	45
Figura 4. Quadro de crias para a avaliação do CH, com delimitação, lado (A) controle, células de crias intactas, lado (B) tratamento, células de crias perfuradas. Setas amarelas indicam as celular abertas.....	46
Figura 5. (A) Amostras para quantificação de ácaros em abelhas adultas. (B) Movimentação das amostras por agitação mecânica manual. (C) Abelhas despejadas em bandeja branca para a contagem. (D) lavagem das amostras com álcool 70%. (E) Coleta dos ácaros. (F) Contagem das abelhas. (G) Contagem dos ácaros. (H) Fêmeas adultas de <i>V. destructor</i>	48
Figura 6. (A) Corte de uma área com 50 crias fechadas para a contagem dos ácaros <i>V. destructor</i> em crias de <i>A. mellifera</i> . (B) Corte de crias desoperculados para a contagem de <i>V. destructor</i> . Setas em amarelo indicando os ácaros.....	50
Figura 7. Análise da força das colmeias.....	60
Figura 8. Avaliação do CH indicando colmeias altamente higiênicas. (A) Área tratada. (B) Área controle.....	53
Figura 9. Colmeia não higiênica. Setas em branco indicam celular de cria vazia, setas em amarelo indicam celular com cria morta, seta em vermelho indicam células com alimento.....	55
Figura 10. Corte do favo com crias para análise de <i>Varroa</i> , seta em amarelo indica a presença do ácaro sobre a cria.....	57
Figura 11. (A) Coleta das operárias forrageiras. (B) Amostras de operárias coletadas. (C) Abdômens seccionados de operárias para maceração. (D) Líquido resultado da maceração dos 60 abdômens. (E) Líquidos sendo homogeneizado. (F) Câmara de Neubauer. (G) Observação dos	

esporos em microscópio. **(H)** Contagem dos quadrantes 1, 2, 3, 4 e 5 com esporos em câmara de Neubauer.....85

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Porcentagem média (\pm erro padrão) comportamento higiênico de colônias de *Apis mellifera* expostas, por contaminação de dieta alimentar, as concentrações de campo dos fungicidas Captan[®]SC, Zignal[®] e mistura (Captan[®] SC +Zignal[®]).....54
- Tabela 2.** Índice de infestação (%) de *V. destructor* (\pm EPM) em adultos e crias de *A. mellifera* oriundos de colônias expostas, por contaminação de dieta alimentar as concentrações de campo dos fungicidas Captan[®]SC, Zignal[®] e mistura (Captan[®]SC +Zignal[®])56
- Tabela 3.** Valores de qui-quadrado (χ^2) e a respectiva probabilidade (*p*) de comparação entre os tratamentos, para os parâmetros preditores de força das colmeias, 180 dias após as exposições (Ctrl: Controle; Cap: Captan[®]SC; Zig: Zignal[®] e Mis: Zignal[®] + Captan[®]SC).....58
- Tabela 4.** Percentual de *Apis mellifera* infectadas com esporos de *Vairimorpha* spp., a partir do teste de prevalência, dos tratamentos Captan[®] SC, Zignal[®] e mistura (de Captan[®] SC + Zignal[®]), coletadas em diferentes tempos, após o início dos bioensaios.....86
- Tabela 5.** Efeito de fungicidas e tempo de exposição sobre o número médio de esporos de *Vairimorpha* sp em *Apis mellifera* expostas via alimento contaminado a 0,75 mL de Captan[®] SC, 0,3 mL de Zignal[®] e mistura (0,75 mL de Captan[®] SC + 0,3 mL de Zignal[®])87
- Tabela 6.** Número médio de esporos de *Vairimorpha* spp em *Apis mellifera* expostas via alimento contaminado a 0,75 mL de Captan[®]SC, 0,3 mL de Zignal[®] e mistura (0,75 mL de Captan[®]SC + 0,3 mL de Zignal[®]) após 0, 60, 120, 180 e 240 dias da exposição.....87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A = Número de células de cria operculadas no controle antes do teste de limpeza

ANOVA = Análise de variância

ATP = Adenosina tri-fosfato

B = Número de células vazias na área do tratamento antes do favo ter sido submetido ao teste de limpeza

C = Número de células vazias na área controle após o favo ter sido submetido ao teste de limpeza

CH (0h) = Número de células vazias antes da perfuração

CCA= Campus Centro De Ciências Agrarias

CH (após 24h) = Número de células vazias 24 horas após a perfuração

CH = Comportamento Higiênico

CO = Número de células operculadas antes da perfuração

FATOR Z = Taxa de remoção de crias no controle

IVD = Índice de *Varroa destructor*

MLG = Meio de modelos lineares generalizados

NA= Número de abelhas

NAa = Números de ácaros adultos

NCd = Número de crias desoperculadas

NV= Número de ácaros *V. destructor*

TIA% = Taxa de infestação por *V. destructor* em abelhas adultas

TIC%= Taxa de infestação por *V. destructor* em crias de abelhas

UFSC = Universidade Federal de Santa Catarina

VAT = Valores coletados antes da aplicação dos tratamentos

VDT = Valores coletados depois da aplicação dos tratamentos

VE = Valores para a realização das análises estatísticas

X² = Qui-quadrado

Y = Número de células na qual a cria foi removida naturalmente no controle, sendo que para obtenção de Y empregou-se a fórmula

Z = Percentual (%) de células onde a cria operculadas foi removida naturalmente no controle

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS GERAL	17
3.	ESPECÍFICOS.....	17
4.	HIPÓTESES:	17
CAPITULO I		18
5.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
5.1	CULTIVOS DE MACIEIRAS (<i>Malus domestica</i> Borkh).....	18
5.2	ABELHAS <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: apidae).....	19
5.3	FUNGICIDAS	21
5.4	FUNGICIDA Captan® SC (Captana).....	22
5.5	FUNGICIDA Zignal® (Fluazinam)	23
5.6	SANIDADE APÍCOLA.....	24
5.6.1	COMPORTAMENTO HIGIÊNICO	25
5.6.2	ÁCARO <i>Varroa destructor</i>	26
5.6.3	MICROSPORÍDIOS <i>Varimorpha</i> spp.....	27
6.	REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO II.....		45
EFEITOS DOS FUNGICIDAS CAPTAN® & ZIGNAL® NO COMPORTAMENTO HIGIÊNICO E ÍNDICE DE <i>Varroa destructor</i> EM <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera: Apidae) 45		
	Resumo 46	
	Abstract 47	
7.	INTRODUÇÃO	48
8.	MATERIAL E MÉTODOS	49
8.1	APIÁRIO	49
8.2	PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS	50
8.3	PREPARO DO ALIMENTO OFERECIDO ÀS COLMEIAS.....	51
8.4	BIOENSAIOS	51

8.5	AVALIAÇÕES DO TEMPO PARA O COMPORTAMENTO HIGIÊNICO, INFESTAÇÃO POR <i>V. destructor</i> E FORÇA DAS COLMEIAS.....	52
8.6	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO HIGIÊNICO.	52
8.7	AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE INFESTAÇÃO POR <i>V. destructor</i> EM ABELHAS ADULTAS DE <i>A. mellifera</i>	55
8.8	AVALIAÇÃO DE INFESTAÇÃO POR <i>V. destructor</i> EM CRIAS DE <i>A. mellifera</i>	57
8.9	FORÇA DAS COLMEIAS	59
8.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	60
9.	RESULTADOS	61
9.1	COMPORTAMENTO HIGIÊNICO	61
9.2	ÍNDICE DE INFESTAÇÃO DE <i>V. destructor</i> EM ADULTOS E CRIAS DE <i>A. mellifera</i>	63
9.3	FORÇA DAS COLMEIAS	65
10.	DISCUSSÃO	66
11.	CONCLUSÃO.....	69
12.	REFERÊNCIAS.....	70
CAPITULO III		76
EFEITOS DOS FUNGICIDAS CAPTAN [®] SC & ZIGNAL [®] NO NÍVEL DE INFECÇÃO POR <i>Vairimorpha</i> spp. EM <i>Apis mellifera</i> Linnaeu (Hymenoptera: Apidae).....		76
13.	INTRODUÇÃO	79
14.	MATERIAL E MÉTODOS	80
14.1	APIÁRIO	80
14.2	PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS	80
14.3	PREPARO DO ALIMENTO OFERECIDO ÀS COLMEIAS.....	81
14.4	BIOENSAIO.....	81
15.	AVALIAÇÃO.....	81
15.1	DETERMINAÇÕES DA INFECÇÃO POR <i>Vairimorpha</i> spp.....	81
16.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	83

17.	RESULTADO	84
18.	DISCUSSÃO	86
19.	CONCLUSÃO.....	88
20.	REFERÊNCIAS.....	89

1. INTRODUÇÃO

A atividade agrícola intensa, aliada ao uso de produtos fitossanitários, aumentou consideravelmente a produção de alimentos nas últimas décadas (MATSON et al., 1997), ocasionando danos irreparáveis ao meio ambiente, como a destruição de habitats naturais, que é considerada uma das principais causas para o declínio nas populações de polinizadores em todo o mundo (WINFREE et al., 2009; POTTS et al., 2010; ALVES-DOS-SANTOS et al., 2014; NOVAIS et al., 2019). Outros fatores ambientais colaboram com a redução do tamanho populacional ou desaparecimento de espécies polinizadoras, como; mudanças climáticas, infestações de pragas, doenças causadas por patógenos e introdução de espécies exóticas, têm sido identificadas como causas do declínio (BUCHMANN, NABHAN, 1996; KEARNS, et al., 1998; WINFREE et al., 2009; FREITAS et al., 2012).

Eossistemas agrícolas beneficiam-se amplamente dos serviços prestados por polinizadores, como as abelhas, principamnete aqueles que cultivam culturas da alimentação humana (GARIBALDI et al., 2011). A cultura da macieira é dependente de polinizadores para a adequada frutificação, pois mesmo apresentando flores completas (cálice, corola, androceu e gineceu), necessita da polinização cruzada, realizada por animais, principalmente abelhas (IUCHI, 2006). Uma das fases mais importantes do cultivo da macieira é a época da florada, quando o pomar recebe polinizadores que asseguram a produtividade e qualidade do fruto (DONG et al., 1998). A polinização realizada por abelhas é considerada um serviço ecossistêmico importante para a manutenção da biodiversidade (PATRON, 2010), entretanto, as mudanças no ambiente promovidas por atividades antrópicas, tem causado a redução dos polinizadores naturais, aumentando a dependência dos pomares por sistemas de polinização dirigida, realizada por *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) (BALESTIERI et al., 2002; BPBES, 2019).

No sistema de polinização dirigida, as colmeias são encaminhadas de modo sistematizado aos pomares durante a floração das macieiras (COUTO; COUTO, 2002). Por sua facilidade de manejo e grande população de abelhas campeiras, *A. mellifera* é um importante componente nos processos de polinização dirigida (DONG et al., 1998; COUTO; COUTO, 2002). Entretanto, para preservação da sanidade das abelhas é necessário evitar sua exposição a produtos fitossanitários como fungicidas, que podem contaminar as colmeias (DONG et al., 1998). O emprego de fungicidas durante a floração é devido a ação de patógenos causadores de doenças, dentre eles estão fungos como *Venturia inaequalis* (Venturiales: Venturiaceae), causador da sarna da macieira, sua proliferação pode promover a perda de até 100% da produção de

mações (BONETI et al., 2002; NETO E SILVA et. al., 2011). Nesse sentido, são utilizados fungicidas como Captan[®] (Captana) e Zignal[®] (Fluazinam) (VALDEBENITO SANHUEZA, 2002; BECKER et al., 2021; FREITAS; PINHEIRO, 2010). O controle deste fitopatógeno é realizado com pulverizações sequenciais e preventivas com fungicidas (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002; BECKER et al., 2021). Apesar de ser eficiente no controle de doenças, o uso abusivo de fungicidas pode afetar organismos não alvo, como as abelhas (GOULSON, 2013; SÁNCHEZ-BAYO et al., 2017; TAVARES et al., 2019; ALMASRI et al., 2020).

Além disso, trabalhos com abelhas mostraram que quando expostas à fungicidas associados a outros produtos químicos, ocasionaram alterações comportamentais, contribuindo para elevadas infecções do microsporídio de *Vairimorpha* spp. (Microsporidia: Nosematidae) (PETTIS et al. 2013; WANG et al., 2021), e tornando-as, suscetíveis aos acaricidas usados no manejo do ácaro ectoparasita *Varroa destructor* (Arachnida: Varroidae) (JOHNSON et al., 2013). A longo tempo os fungicidas causam prejuízos na conservação da colmeia, alterando a imunidade social, podendo levar a infestações do ácaro *V. destructor* e infecções de *Vairimorpha* spp. (PETTIS et al. 2013; JOHNSON et al., 2013; DEGRANDI-HOFFMAN et al., 2015; TADEI et al., 2019). Estudos demostram que fungicidas agindo isoladamente ou em combinação com outros produtos químicos, podem alterar a fisiologia e comprometer o sistema nervoso, causando efeitos drásticos na sobrevivência após 20 dias de exposição a esses produtos (ALMASRI et al., 2020).

Diante disso, há necessidade de levantar mais informações sobre os efeito de fungicidas sobre colmeias de *A.mellifera*, com isso objetivo deste trabalho é avaliar o impacto causado pelos fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®] sobre a sanidade de colmeias, por meio da avaliação do comportamento higiênico, nível de infestação de *V. destructor*, força da colmeia e infecção por *Vairimorpha* spp.

2. OBJETIVOS GERAL

- Avaliar os efeitos dos fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®] de modo isolado e em mistura em colmeias de *A. mellifera*.

3. ESPECÍFICOS

- Avaliar o comportamento higiênico de *A. mellifera* em colmeias expostas a Captan[®]SC e Zignal[®] de modo isolado e em mistura.
- Avaliar a infestação do ácaro *V. destructor* em larvas e adultos de *A. mellifera* em colmeias expostas a Captan[®]SC e Zignal[®] de modo isolado e em mistura.
- Avaliar a presença dos microsporídios de *Vairimorpha* spp. em colmeias expostas e não expostas aos fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®] de modo isolados e em misturas.
- Avaliar a força da colmeia de *A. mellifera* em colmeias expostas a Captan[®]SC e Zignal[®] de modo isolado e em mistura.

4. HIPÓTESES:

- O comportamento higiênico de *A. mellifera* é afetado negativamente pelos fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®].
- Colmeias de *A. mellifera* expostas aos fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®] são mais suscetíveis a presença do ácaro *V. destructor*.
- Colmeias de *A. mellifera* expostas aos fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®] são mais suscetíveis a *Vairimorpha* spp.
- A força da colmeia é afetada negativamente quando exposta aos fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®].

CAPITULO I

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1 CULTIVOS DE MACIEIRAS (*Malus domestica* BORKH)

A macieira é uma frutífera pertencente à Ordem Rosales, família Rosaceae, subfamília Pomoideae, gênero *Malus* e espécie *Malus domestica* Borkhausen (IUCHI, 2006). Os primeiros cultivos de macieira no Brasil ocorreram por volta de 1926, em Valinhos-SP com mudas da Ohio Beauty (BREICHER, 2002). O País iniciou o desenvolvimento comercial da cultura da macieira na década de 70. Dentre os estados que realizam pesquisas com melhoramento genético de macieiras está Santa Catarina, destacando-se a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural (Epagri), que hoje é a única empresa de pesquisa pública que atua nessa área (PETRI et al, 2011; KVITSCHAL, 2018). Atualmente, a produção nacional de maçãs está concentrada nas regiões de Palmas, PR, Vacaria, RS e São Joaquim e Fraiburgo, SC (PETRI et al., 2018).

Santa Catarina é o maior produtor de maçãs do país, responsável pela produção de 575.759 toneladas da fruta. São Joaquim e Fraiburgo são os maiores produtores de maçãs no estado, onde ambos os municípios possuem clima favorável para a cultura (KIST 2019). Nesse contexto, o Brasil que era importador da fruta, se tornou em 20 anos autossuficiente, passando a exportá-la (PETRI et al., 2011). Planta lenhosa, com flores alternadas simples de cor branca ou rósea, possui raízes que exploram grande volume do solo. O fruto é constituído por um receptáculo carnudo que envolve os ovários. O endocarpo é formado por um pericarpo coriáceo e possui uma única semente, transformando-a em um pseudofruto, originada do receptáculo floral, sendo que o verdadeiro fruto é a parte interna que envolve as sementes (IUCHI, 2006).

As condições climáticas para a macieira são fundamentais, tanto para o processo fisiológico de dormência, quanto para os biológicos, como a polinização, fecundação de flores, crescimento e desenvolvimento de frutos (PETRI; COUTO, 2014). A macieira é uma espécie que contém uma grande variedade de cultivares, onde a maioria são autoincompatíveis (FREE, 1960, BROOthaerts et al., 2004). Desse modo, ela se torna altamente dependente da polinização cruzada, quando ocorre a fertilização das flores para obtenção de bons frutos (MCGREGOR, 1976). Para que isso aconteça, é necessário que as plantas polinizadoras possuam pólen compatíveis e que haja coincidência da floração no ciclo da cultura (WEIRTHEIM; SCHMIDT, 2005; WERTHEIM; WEBSTER, 2005). A polinização é o evento mais importante para a macieira e depende diretamente de agentes polinizadores (DAG et al., 2012; DONG et al., 1998).

Os insetos são os principais agentes polinizadores, em especial as abelhas, sendo *A. mellifera* essencial para uma boa polinização e produtividade dos frutos (VISCENS; BOSCH, SILVA 2000; DAG et al., 2012; SALOMÉ; ORTH 2014). A macieira é acometida por doenças e pragas, podendo causar muitas perdas ao produtor de maçãs, como a inutilização dos pseudofrutos para a comercialização (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2002).

No Brasil a principal doença que acomete a cultura da macieira é a Sarna da macieira ocasionada pelo fungo *V. inaequalis*, que se não controlada pode inutilizar toda a produção (PROTAS; SANHUEZA, 2003). A cultura é também atacada por pragas como o ácaro vermelho *Panonychus ulmi* (Koch1836) (KOVALESKI; RIBEIRO, 2002). A principal medida fitossanitária para esses problemas são os fungicidas, pois existe formulações a base de fluazinam, ingrediente ativo do Zignal[®], que também age como acaricida no combate do ácaro vermelho. (RIBEIRO et al., 1999; SANHUEZA; BETTI, 2005; BONETI; KATSURAYAMA; BLEICHER, 2006; STADNIK, 2009). Esses produtos são classificados em sua natureza química e modo de ação, contra os fitopatógenos: protetores ou de contato, erradicantes e sistêmicos (ZAMBOLIM et al., 1995; MINEIRO et al, 2015; KIMATI, 1995).

Nessa classificação temos os fungicidas protetores ou de contato, onde são eficientes somente quando aplicados antes da ocorrência da penetração do patógeno no hospedeiro (PICINNINI, 1994). Esses tipos de fungicidas agem como uma barreira toxica, impedindo a penetração do fungo através do bloqueio da germinação dos esporos, sendo o fungicida Captan[®]SC com esse modo de ação (PICINNINI, 1994). Essa classificação de fungicidas que penetram no interior dos microorganismos, torna-se eficaz por possuir características químicas para não se decompor facilmente pela ação de fatores ambientais (HORSFALL; BARRATT 1945; ZAMBOLIM et al., 1995; ANNOSCIA et. al, 2021).

5.2 ABELHAS *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: APIDAE).

As abelhas *Apis mellifera* são insetos sociais que pertencem ao reino Animalia, filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Hymenoptera, subordem Apocrita, superfamília Apoidea, família Apidae, gênero *Apis* (RUTTNER, 1988). Uma colônia de *Apis mellifera* é constituída por três castas: rainha, operárias e zangões (CAMARGO; PEDRO, 2013). A rainha é responsável por realizar posturas e manter a ordem social (HAMILTON, 1964; LAIDLAW; PAGE, 1984). As operárias são responsáveis por todos os trabalhos na colmeia (GALLO, 2002), sua divisão é de acordo com a idade das operárias (WINSTON, 2003). Por não possuírem ferrão e

nem corbícula para armazenamento de pólen os zangões não acumulam trabalhos, podendo viver até três meses, desde que não haja acasalamento ou se houver alimento na colmeia, sua função é fecundar rainhas de outras colmeias (VETTER; VISSCHER, 1997).

A apicultura nos estados do Sul do Brasil iniciou-se por volta de 1845, quando colonizadores alemães introduziram colmeias de *Apis mellifera mellifera* (Hymenoptera: Apidae) (CICCO, 2007). Em 1956, foram trazidas dezenas de colmeias de abelhas *Apis mellifera scutellata* (Hymenoptera: Apidae) da África para o município de Rio Claro – SP, com o intuito de iniciar um programa de seleção para obtenção de híbridos que tivessem a mansidão das europeias e a produtividade das africanas (KERR, 1967). Entretanto, em 1957, 26 rainhas de *Apis mellifera scutellata* enxamearam das colmeias, restando 47 colmeias com rainhas originais (KERR, 1967), a partir deste momento, iniciou-se a africanização das abelhas no Brasil, pela formação de híbridos como espécies de *Apis mellifera* Linnaeus, com as espécies europeias que haviam sido anteriormente introduzidas e as africanas (KERR, 1967; STORT; GONÇALVES, 1979; GONÇALVES, 1992; GONÇALVES; STORT, 1994; STORT; GONÇALVES, 1994).

As abelhas são de suma importância para a manutenção da vida e sustentabilidade do planeta (LOPES et al., 2014), sendo responsáveis por 66,35% da polinização, influenciando os índices produtivos de inúmeras culturas agrícolas (BPBES, 2019). As abelhas estão em processo gradativo de ameaça a extinção devido ao uso indiscriminado de defensivos agrícolas, seu desaparecimento afetaria diretamente a agricultura, pois 70% das culturas agrícolas dependem destes polinizadores (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012; BARBOSA et al., 2017). O valor preciso das abelhas como polinizadores de plantas em ambientes naturais ou agrícolas é incalculável devido a importância ao ecossistema (KREMEN et al., 2002; BIESMEIJER et al., 2006; GOMES, 2017).

A apicultura promove um incremento na renda familiar, fortalecendo a economia a partir do manejo para polinização dirigida e produtos apícolas como: mel, própolis, geleia real, pólen, cera, apitoxina e favo de mel no pote (NUNES; HEINDRICKSON, 2019; CARVALHO 2019). Dentre as espécies de abelhas descritas em todo o mundo, poucas são manejadas comercialmente para a polinização dirigida, como *A. mellifera* (BOSCH; KEMP, 2002). Por ser uma espécie generalista, as operárias de *A. mellifera* trabalham individualmente e de preferência sobre a mesma fonte de néctar e de pólen, tornando-se progressivamente mais eficientes no forrageio e, talvez por isso, a mais exposta a agrotóxicos (MALAGODI-BRAGA, 2005).

Devido ao uso abusivo de agrotóxicos no meio ambiente, seus resíduos são encontrados em diferentes locais, como, solo, água, pólen e néctar das plantas (JOHANSEN; MAYER, 1990; KRUPKE et al., 2012; LENTOLA et al., 2017; ŠKERL et al., 2009). Devido à estrutura social da espécie *A. mellifera*, os agrotóxicos são levados para a colônia por abelhas campeiras e seus resíduos são encontrados em diferentes produtos apícolas, como, mel e cera, bem como no corpo das abelhas e no alimento que está disponível para todos os indivíduos da colmeia (MALASPINA et al., 2008; KILJANEK et al., 2017; PANSERI et al., 2014; SIMON-DELISO et al., 2017), causando a contaminação de todas as fases de desenvolvimento do inseto, incluindo a rainha (ZHU et al., 2014; MILONE; TARPY, 2021).

Segundo Pettis et.al., (2013) a probabilidade de infecção por *Varimorpha* spp. aumentou com a presença de fungicida encontrado no pólen consumido. Fungicidas quando combinado com acaricidas utilizados no combate do ácaro *V. destructor* tiveram sua ação adversa na capacidade das abelhas de resistir à infecção do parasita (JOHNSON et al., 2013). No entanto, sua ação se dá ao longo do tempo e seus efeitos são prejudiciais para a colônia. As abelhas expostas a fungicidas apresentam alterações comportamentais, redução da longevidade e forrageamento, indivíduos deformados e autolimpeza excessiva, alterações na respiração e preferência por cores em flores (ALMEIDA et al. 2021), ocasionando o declínio da colmeia (TADEI et al., 2019). O fungicida Captan[®]SC exerce efeitos de repelência em abelhas, causando diminuição da habilidade de forrageamento, defeitos morfogênicos e mortalidade de indivíduos na fase larval (FREITAS; PINHEIRO, 2012).

5.3 FUNGICIDAS

Fungicidas são compostos químicos utilizados para combater fungos que atacam plantações, controlando e impedindo a progressão do doença ou patógeno, podendo ser aplicado desde o tratamento de sementes até a pós-colheita, visando proteger de contaminações os frutos, vegetais, tubérculos e sementes armazenadas (REIS, 2015). Desde o plantio até a colheita, várias culturas estão sujeitas à ação de fitopatógenos, tornando a produção dependente de aplicações de produtos fitossanitários (BALBA, 2007). Os fungicidas devem possuir características relevantes que determinam sua eficácia (SILVA et al., 2011), como a fungitoxidade, determinada pela quantidade do produto fixado na folha durante a pulverização, que permanece após a ação de intempéries. Essas condições estabelece a quantidade de resíduo ativo nas superfícies foliares resultando no controle dos fitopatógenos (RICH, 1954).

Após a pulverização, resíduos de fungicidas podem ser encontrados sobre microrganismos do solo e água, além de promover alterações no metabolismo e fisiologia de plantas (BRUCK, 2009). Enzimas que são ligadas a síntese de ATP podem ser afetadas por fungicidas, prejudicando a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, comprometendo a estrutura e função da membrana celular, transdução de sinais, respiração, mitose e divisão celular de microrganismos não alvo (YANG et al., 2011). Nos estudos de Ruddick e Khera (1975) o etilenotiourea (ETU) ocasionou má formações em embriões de ratas, a baixa toxicidade deste fungicida, pode causar, entre outros efeitos, a hidrocefalia em animais (KHERA, 1989).

O cultivo da macieira enfrenta problemas fitossanitários relacionados ao ataque de pragas e doenças, podendo ocorrer depreciação na qualidade dos frutos (SANTOS; WAMSER, 2006). Dentre as principais doenças encontradas em pomares, estão as ocasionadas pelos fungos *Venturia inaequalis*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Glomerella cingulata* (BONETI et al., 2002). O emprego de fungicidas é uma das estratégias mais utilizadas em macieira para o controle de fungos na cultura (KOGAN, 1998). A necessidade de pulverização está relacionada com a sua eficiência, uma vez que os fungicidas não agem apenas em fungos, como é o caso do Zignal[®] que é utilizado também como um acaricida (RIBEIRO et al., 1999).

Estudos demonstraram que fungicidas podem prejudicar a imunidade de abelhas, aumentando a presença de vírus e pragas e diminuir a emergência de rainhas (DEGRANDI-HOFFMAN et al., 2015). Em uma colmeia as crias de abelhas são mais expostas aos fungicidas (MUSSEN et al., 2004; ZHU et al., 2014). A exposição de larvas a dieta contaminada com fungicidas pode ocasionar alterações morfogênicas e aumento na mortalidade, comprometendo o desenvolvimento de abelhas adultas, podendo levar ao colapso da colmeia (DEGRANDI-HOFFMAN et al., 2013). Segundo Zaluski (2017) o desenvolvimento das glândulas mandibulares e hipofaringianas são alteradas quando expostas a doses subletais de fungicidas. A manutenção realizada por fungos benéficos responsáveis em conservar e digerir o pólen da colmeia, são afetados pelo uso indiscriminado de fungicidas, diminuindo o valor nutricional do alimento (YODER et al., 2013).

5.4 FUNGICIDA CAPTAN[®] SC (CAPTANA)

O Captan[®]SC é um fungicida de amplo espectro, utilizado em diversas culturas no Brasil, como, batata, cebola, maçã, tomate e uva (EDNEV, 1956). Utilizado também para o tratamento de sementes, como, algodão, feijão, milho e soja (EAVES et al., 1958). O principal

ingrediente ativo do Captan[®] SC é a captana, muito utilizado no mundo (INGHAM et al. 1991), a captana reduz a atividade enzimática, respiração e altera a fisiologia e morfologia de fungos (LUKENS 2013). Resíduos de captana foram encontrados em maçãs, onde o produto obteve uma longa vida residual, sua perda foi de 17% evidenciando que parte do resíduo de captana foi absorvido pela cutícula da fruta (KOIVISTOINEN et al., 1965). A Food and Drug Administration (FDA) determinou um limite de tolerância de 100ppm para captana em produtos agrícolas, devida a sua baixa toxicidade (KOIVISTOINEN et al., 1965). Nos estudos de Piotrowska-Seget et al (2008) indicou que o preparo sucessivo do solo com captana (fungicida) e oxitetraciclina (antibiótico) afetou negativamente os microrganismos do solo alterando suas atividades. O efeito de captana em organismo não alvo como a *Saccharomyces cerevisiae* resultou em morte celular necrótica típica e perda da integridade da membrana celular (SCARIOT et al., 2017).

5.5 FUNGICIDA SIGNAL[®] (FLUAZINAM)

O fungicida Signal[®] é utilizado em diversas culturas no Brasil, como, batata, feijão, maçã, soja e tomate (ANEMA-BOUWMAN 1992). Sua eficiência não age apenas em doenças fúngicas, sendo também utilizado como acaricida na cultura da maçã (RIBEIRO et al., 1999). O principal ingrediente ativo do Signal[®] é o fluazinam, onde possui um amplo espectro (BUTZLER et al., 1998), devido isso a união europeia determinou limites de resíduos de fluazinam na maçã que foram legislados em 0,3 miligramas por quilograma (DOWLEY; OSULLIVAN, 1995). No Japão onde o fungicida foi desenvolvido (SMITH et al., 2008; MALHAT et al., 2013) os valores são de 0,5 miligramas por quilogramas (WU et al., 2014). Por ser um fungicida de contato seu modo de ação se dá na separação da fosforilação oxidativa mitocondrial, inibindo a síntese de ATP da célula fúngica (VITORATOS, 2014). Ao contrário dos fungicidas sistêmicos, o fluazinam quase não pode ser transportado pela planta (VITORATOS, 2014) é resistente a chuva (KOMYOJI et al., 1995; XU et al., 2006) e considerado um protetor, devendo ser aplicado antes do início da doença para um melhor resultado (BUTZLER et al., 1998). Nos estudos de Liang et al., (2015) a ação do controle preventivo do fluazinam foi maior do que a eficácia curativa, apresentando um nível maior de toxicidade em *Sclerotinia sclerotiorum*. Sua manipulação por um tempo prolongado é prejudicial à saúde humana, podendo causar dermatite e induzir reações imunológicas específicas nas vias aéreas (DRAPER et al. 2003).

5.6 SANIDADE APÍCOLA.

As doenças exercem efeitos deletérios no desenvolvimento e produtividade de *A. mellifera*, sua resistência a fatores antrópicos é maior se elas estiverem saudáveis e nutridas (POTTS et al., 2016). A proliferação de doenças em abelhas melíferas retrata um crescente problema, devido a uma multiplicidade de fatores, entre os quais, se pode salientar a compra e venda a nível mundial de abelhas e produtos apícolas (GONÇALVES, 2008; SANTOS et al., 2018). A introdução do ácaro *V. destructor* no Brasil, se deu devido a compra de rainhas importadas por apicultores do Paraguai, onde já havia ocorrência de infestações do parasita em colmeias de abelhas (MORSE; GONÇALVES 1979). A sanidade das abelhas *A. mellifera* é preocupante, pois além do ácaro *V. destructor* existem outras infestações que podem acometer a colmeia, como acarapiose, tropilaelaps, besouro da colmeia, infecções de loque americana, loque europeia e nosemose (OIE 2020).

No Brasil, as principais doenças que ocorrem em colmeias de *A. mellifera* são a nosemose e a varroose (KLEE et al., 2007; STRAPAZZON et al., 2009; LOPES et al., 2004). A nosemose tem contribuído com o desaparecimento e/ou morte de abelhas, sendo um dos principais patógenos para a apicultura (HIGES et al., 2010), é uma das doenças parasitárias que mais causa danos à apicultura, seja isolada ou associada a outras doenças apícolas (TENTCHEVA et al., 2006). Além das doenças, outros fatores podem comprometer a sanidade de abelhas, como mudanças climática, destruição de ambientes naturais, uso da terra para monocultivos/monocultura intensivos, uso indiscriminado de agrotóxicos, pragas, baixa disponibilidade de alimento e manejo inadequado (GIANNINI et al., 2017; IMPERATRIZ-FONSECA, 2017; BERINGER, 2019). Quando expostas a agrotóxicos a capacidade das abelhas de detectar e remover agentes infecciosos causadores de doenças de crias e abelhas adultas pode ser comprometida (WILSON-RICH et al., 2009).

Abelhas adultas, quando expostas a agrotóxicos apresentam mudanças comportamentais e cognitivas (SANTOS et al., 2018; ANNOSCIA et al., 2020), como dificuldade em retornar para a colmeia, danos nas habilidades de memória, orientação, comunicação, tremores, agitação e redução comportamentais (SÁNCHEZ-BAYO, et al., 2017; TISON et al., 2019). Estudos realizados por Almeida et al., (2021), demonstraram que quando expostas a fungicidas, abelhas campeiras tiveram uma redução nas taxas de respiração e preferências de cores em flores.

Os fungicidas, apesar de ter sua ação voltada para as doenças fúngicas em plantas, podem comprometer o comportamento das abelhas (ARNO et al., 2018; TADEI et al., 2019; ALMASRI et al., 2021).

5.6.1 COMPORTAMENTO HIGIÊNICO

O comportamento higiênico é um mecanismo de defesa natural das abelhas, sendo determinado geneticamente (SCHAFASCHEK et al., 2016; ROTHENBUHLER, 1964a-b; GRAMACHO, 1999). É uma condição genética controlada por dois pares de genes recessivos o gene *u* = uncapper (desoperculador) e o gene *r* = remover (removedor) que em homozigose (*uu/rr*), permitem que as abelhas portadoras de ambos os genes, sejam classificadas como higiênicas (ROTHENBUHLER, 1964). No entanto, foi sugerido um modelo de três loci indicando que o comportamento higiênico seria de fato, um mecanismo genético mais complexo (MORITZ, 1988).

O comportamento higiênico é considerado o principal mecanismo de resistência de abelhas melíferas, sendo classificadas de abelhas higiênicas aquelas que expressam o comportamento de detectar e remover parasitas (MESSAGE, 1979) e crias mortas ou doentes da colmeia, funcionando como um eficiente mecanismo comportamental de resistência a doenças da cria (GILLIAM et al., 1983; PALACIO et al., 2000; SPIVAK et al, 2001). Para ser considerada higiênica a colmeia deve ser capazes de detectar, desopercular e remover a cria doente antes da proliferação da doença, evitando o manuseio e a transmissão do patógeno (SCHAFASCHEK et al., 2019). Uma colmeia altamente higiênica deve removem 85% ou mais das crias mortas no prazo de 24 horas, aquelas que não conseguirem atingir este valor, são consideradas não-higiênicas (MASAQUIZA et al. 2021; GRAMACHO; GONÇALVES, 1994).

A sanidade de *A. mellifera* é afetada quando a colmeia não exerce o comportamento higiênico, impactando diretamente seu trabalho quando expostas a doenças causadas por vírus, bactérias, fungos, parasitas, desordens metabólicas, nutricionais e hormonais, além de intoxicações diversas (GONÇALVES, 2008). Parasitas, como *V. destructor*, microsporídios de *Variormorpha* spp. e produtos apícolas contaminados por agrotóxicos (SILVA et al, 2020), pode ocasionar perdas ou enfraquecimento de colmeias, comprometendo o comportamento higiênico (MALASPINA et al., 2008; CARVALHO et al., 2009; MALASPINA et al., 2010; BIZZOCCHI, 2014). Segundo Schöning et al. (2012) a presença do ácaro *V. destructor* na colmeia não é incentivo para a remoção da cria, sua remoção se dá a partir das lesões provocados nas larvas

e referente ao grau de infecção dos ácaros. Uma colmeia de *A. mellifera* deve garantir, além de uma grande produtividade, uma elevada capacidade de defesa contra doenças e parasitas (STRAPAZZON et al., 2009).

5.6.2 ÁCARO *Varroa destructor*.

O ácaro *Varroa destructor* é um ectoparasita de abelhas, que pertence à classe dos aracnídeos, ordem Mesostigmata, família Varroidae, gênero *Varroa*, espécie *V. destructor* (CRANE, 1978). Os primeiros relatos sobre o ácaro *V. destructor* foram realizados por Jacobsoni em 1904, que encontrou esses parasitas em *Apis cerana* (Hymenoptera: apidae) na ilha de Java, Indonésia (DELFINADO; BAKER et al., 1974). No entanto, a definição do ácaro foi realizada por Oudemans, apontando o detalhamento e classificando-o a princípio como *Varroa jacobsoni* Oudemans, 1904 (DELFINADO et al., 1989). Durante a primeira parte do século XX na Ásia o ácaro passou a parasitar colmeias de *A. mellifera*, se espalhando logo depois pelo continente, chegando à Europa na década de 70 devido a comercialização de colmeias parasitadas, espalhando - se rapidamente, atingindo a África, América do Sul e América do Norte (KRAUS et al., 1995).

O ciclo de vida do ácaro *V. destructor* possui fases distintas como: desenvolvimento, reprodução e fase forética, seu desenvolvimento e reprodução ocorrem dentro do alvéolo junto com a larva de abelha, desde a fase de ovo até o indivíduo ficar adulto e sexualmente maduro, este ciclo biológico leva de 13 a 14 dias (SILVA, 2010). As fêmeas adultas saem fecundadas das células de cria e aderidas a abelha, nesse momento se inicia a fase forética, os machos, por não possuírem um aparelho bucal para se alimentar, morrem ou são removidos pelas abelhas (MURILHAS; CASACA, 2004; CALDERÓN et al. 2010). Na fase forética, o ácaro é totalmente dependente da abelha, onde pode viver durante meses parasitando, se alimentando da hemolinfa e corpo gorduroso (TRAYNOR et al., 2020) de crias e adultos de *A. mellifera*, causando a varrose (MURILHAS; CASACA, 2004). A fêmea pode repetir a fase reprodutiva de duas a três vezes (ROSENKRANZ; ZIEGELMANN, 2009), com preferencias em crias de zangões (HARRIS et al., 2016), devido ao tamanho da célula e com o fato dele levar mais tempo para emergir, aumentando o sucesso reprodutivo do ácaro (CALDERÓN et al. 2010).

Acredita-se que diversos fatores estressantes, atuando isoladamente ou em conjunto, prejudicam a resposta imune do inseto e contribuem para o enfraquecimento de colmeias de *A. mellifera*, permitindo a ação de patógenos oportunistas e pragas, como o ácaro *V. destructor*

(COX-FOSTER 2007; VANENGELSDORP et al., 2009; DI PRISCO et al., 2013; BIZZOCCHI, 2014). A exposição a doses de agrotóxicos aumenta a susceptibilidade das abelhas a diversos parasitas e patógenos como os microsporídeos de *Varimorpha* (PETTIS et al. 2013), aumentando o gasto energético em atividades de desintoxicação e reduzindo a energia disponível para a defesa contra pragas como o ácaro *V. destructor* (RAND et al., 2015). Para o controle desse ectoparasita são aplicadas algumas técnicas sanitárias, com acaricidas (SAMMATARO et al., 2005), óleos essenciais (DAMIANI et al., 2009) e ácido oxálico dentre outros (PORRINI et al., 2017), porém a sanificação pode ser prejudicial a colmeia, devido a constituição química e o constante uso desses produtos, podendo tornar o ácaro ainda mais resistente (CASTAGNINO; ORSI, 2012). O ácaro *V. destructor* é vetor do vírus da asa deformada (PINTO et al., 2015), podendo levar a perda da colmeia (TORRES; BARRETO, 2013). A principal consequência da varrose em *A. mellifera* é o enfraquecimento da colmeia, devido a intensa desordem nutricional provocado pelo ácaro ao se alimentar do corpo gorduroso e hemolinfa da abelha (SAMMATARO et al., 2013; TRAYNOR et al., 2020).

5.6.3 MICROSPORÍDIOS *Varimorpha* spp.

Os microsporídios de *Vairimorpha* spp, pertencem ao reino Fungi, filo Microspora, ordem Dissociodihaplophasida, família Nosematidae, gênero *Vairimorpha* (CAVALIER; SMITH, 1998; TOKAREV et al., 2020). Entre as 1200 espécies de microsporídios de *Vairimorpha* spp. existentes no mundo (KEELING; FAST, 2002), apenas três são capazes de infectar *A. mellifera*, como, *Vairimorpha apis*, *Vairimorpha ceranae* e *Vairimorpha neumanni* (FRIES et al. 1996; HIGES et al., 2006; HUANG et al., 2007; CHEMUROT et al., 2017; SULBORSKA et al. 2019; TOKAREV et al., 2020). Esses microsporídios apesar de serem organismos eucariotes, possuem aspectos semelhantes aos procariontes, pois não apresentam mitocôndrias e peroxissomas (FRANZEN; MÜLLER, 1999), são parasitas intracelulares obrigatórios das células intestinais de *A. mellifera* adultas, causando infecção intestinal sistêmica grave (DE GRAAF et al., 1994). A infecção ocorre pela ingestão de esporos presentes no ar (SULBORSKA et al. 2019), alimento, por via oral (trofalaxia), via fecal, ou depois da limpeza dos pelos (SMITH, 2012).

As operárias de *A. mellifera* são as mais afetadas pelas infecções causadas pelos microsporídios de *Vairimorpha* spp, a infecção começa quando os esporos chegam ao aparelho digestivo da abelha, onde encontram circunstâncias ideais tanto físicas quanto químicas para

germinarem (PERNAL, 2012). A replicação dos esporos, ocorre quando o microsporídio introduz o esporoplasma infeccioso através de um filamento no citoplasma das células intestinais da abelha (LARSSON, 1986; FRIES et al., 1996; GISDER et al., 2011). Após a germinação, a estrutura vegetativa inicial (meronte fusiforme) se multiplica e, após 48 a 72 horas a infecção se estabelece no epitélio do ventrículo, sendo observados esporos em diferentes fases do ciclo de desenvolvimento (GISDER et al., 2011; HIGES et al., 2007). Os microsporídios de *Vairimorpha* spp. por não possuírem mitocôndrias necessitam do ATP sintetizado pelas abelhas, essa dependência é notória, principalmente na fase de germinação dos esporos, promovendo estresse nutricional e energético nos hospedeiros (CORNMAM et al., 2009). Ao lesar o sistema digestório as abelhas ficam mais susceptíveis a outras infecções, seja por vírus ou bactérias (GUIMARÃES-CESTARO et al., 2016). O nosemose pode promover a diminuição populacional das abelhas adultas, comprometendo o rendimento das abelhas forrageiras na coleta de alimento, tendo como consequência o declínio da colmeia (GOBLIRSCH et al., 2013).

6. REFERÊNCIAS

- ALMASRI, H.; TAVARES, D. A.; PIOZ, M.; SENÉ, D.; TCHAMITCHIAN, S.; COUSIN, M.; BRUNET, J. L.; BELZUNCES, L. P. 2020. Mixtures of an insecticide, a fungicide and a herbicide induce high toxicities and systemic physiological disturbances in winter *Apis mellifera* honey bees. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 203. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111013>.
- ALMEIDA, C. H. S.; K. HADDI, P. F.; S., TOLEDO, S. M.; REZENDE, W. C.; SANTANA, R. N. C.; GUEDE, P. L.; NEWLAND, E. O. Exposures to sublethal agrochemicals can alter the color preferences of honeybees and neotropical stingless bees, respiration rates and locomotor responses *Sci. Total Environ.*, 779 (2021). Artigo 146432
- ALVES, I. S.; AIZEN, M.; SILVA, C. I. CONSERVAÇÃO DOS POLINIZADORES. IN: RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I. C. *Biologia da polinização*. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, (2014). p. 493- 524.
- ANEMA, P. E.; BOUWMAN, J. J. (1992). Fluazinam a novel fungicide for use against *Phytophthora infestans* in potatoes. In: *Proceedings / Brighton crop protection conference, pests and diseases*. (pp. 663–668). Farnham, Surrey
- ANNOSCIA, D.; DI PRISCO, G.; BECCHIMANZI, A.; CAPRIO, E.; FRIZZERA, F.; LINGUADOCA, A.; NAZZI, F.; PENNACCHIO, F. Neonicotinoid clothianidin reduces honey bee immune response and contributes to *Varroa* mite proliferation. **Nature Communications**. 11 (1) (2020), p. 5887. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19715-8>
- BALBA, H. Review of strobilurin fungicide chemicals. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 42, n. 4, p. 441–451, (2007).
- BALESTIERI, J. B. P.; ALVES, J. NIOR, V. V.; Moraes-Alves, M. M. B.; Silva, A. C. G. Levantamento de abelhas Euglossinae ao longo do transecto Dourados Sidrolândia Campo Grande / MS, associado a linha de instalação do gasoduto. In: *Congresso Brasileiro De Apicultura*, 14. 2002, Campo Grande, MS, Anais... Campo Grande, MS: CBA, 2002. p. 45.
- BARBOSA, D.; CRUPINSKI, E.; SILVEIRA, R.; LIMBERGER, D.; (2017). As abelhas e seu serviço ecossistêmico de polinização. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**. 3. 694. 10.21674/2448-0479.34.694-703.
- BECKER, W. F.; KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. (2021). Sistema de previsão da mancha-foliar-da-Gala em macieira, cultivar Gala. **Agropecuária Catarinense**, 17(3), 64-67. <https://publicacoes.epagri.sc.gov.br/rac/article/view/1014>
- BEDASCARRASBURE, E. L. (2000). Changes in a population of *Apis mellifera* L. selected for hygienic behaviour and its relation to brood disease tolerance. **Apidologie** 31, 471-478.
- BERINGER, J.; MACIEL, F. L.; TRAMONTINA, F. F. (2019). O declínio populacional das abelhas: causas, potenciais soluções e perspectivas futuras. *Revista Eletrônica Científica Da UERGS*, 5(1), 18-27. <https://doi.org/10.21674/2448-0479.51.18-27>

BIZZOCCHI, L. Avaliação Dos Impactos Do Pólen De Milho Geneticamente Modificado (Bt) Sobre Colônias De *Apis mellifera* L. Dissertação de mestrado, 66 páginas. (2014). Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/128787/330573.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

BLEICHER, J. História da macieira. In: EPAGRI. A cultura da macieira. Florianópolis, 2002. 743p.

BONETI, J. I. S., KATSURAYAMA, Y.; BLEICHER, J. Doenças da macieira. In: A Cultura da Macieira. Florianópolis SC. Epagri, (2002), p. 527-555.

BONETI, J. I. S.; KATSURAYAMA, Y.; BLEICHER, J. Doenças da macieira: doenças fúngicas foliares. In: A CULTURA da macieira. Florianópolis, SC: Epagri, (2006). p. 527-555. Tipo: Capítulo em Livro Técnico Científico Circulação/Nível: Biblioteca(s): Epagri Sede.

BOSCH, J.; KEMP, W. P. Developing and establishing bee species as crop pollinators: the example of *Osmia* spp. (Hymenoptera: Megachilidae) and fruit trees. **Bull Entomol Res.** (2002) Feb. 92 (1):3-16. doi: 10.1079/BER2001139. PMID: 12020357.

BPBES, Relatório Temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil, (2019). https://www.bpbes.net.br/wpcontent/uploads/2019/03/BPBES_CompletoPolinizacao-2.pdf Acesso em 01/03/2021.

BROOHTHAERTS, W.; VANNERUM, I.; KEULEMANS, J. 2004. Update on and review of the incompatibility (S-) genotypes of apple cultivars. **HortScience**. 39, 943-947.

BRUCK, D. J. Impact of fungicides on *Metarhizium anisopliae* in the rhizosphere, bulk soil and in vitro. *BioControl*, Dordrecht, v. 54, n. 4, p. 597-606, (2009). <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9213-1>

BUCHMANN, S. L.; NABLAN, G. P. The Forgotten Pollinators. Washington, DC: Island, (1996).

BUTZLER, T. M.; BAILEY, J. E.; BEUTE, M. K. (1998). Integrated management of *Sclerotinia blight* in peanut: utilizing canopy morphology, mechanical pruning, and fungicide timing. *Plant Disease*, 82, 1312–1318. Integrated Management of Sclerotinia Blight in Peanut: Utilizing Canopy Morphology, Mechanical Pruning, and Fungicide Timing. *Plant Dis.* 1998 Dec;82(12):1312-1318. DOI: [10.1094/PDIS.1998.82.12.1312](https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.12.1312)

CALDERÓN, R. A.; VAN VEEN, J. W.; SOMMEIJER, M. J.; SANCHEZ; L. A. (2010). Reproductive biology of *Varroa destructor* in Africanized honey bees (*Apis mellifera*). **Springer, Exp Appl Acarol** n.50, p.281–297.

CALDERÓN, R. A.; VAN VEEN, J. W.; SOMMEIJER, M. J.; SANCHEZ; L. A. (2010). Reproductive biology of *Varroa destructor* in Africanized honey bees (*Apis mellifera*). **Springer, Exp Appl Acarol** n.50, p.281–297.

CAMARGO, J.; M.; F. (2013). Biogeografia Histórica dos Meliponini (Hymenoptera, Apidae, Apinae) da Região Neotropical. Em P. Vit; Pedro S.; R.; M.; Roubik, D.; W. (Eds.), Pot-Mel: Um legado de abelhas sem ferrão (pp. 19-34). Nova York: **Springer**. DOI: 10.1007/978-1-4614-4960-7_2

CARVALHO, D.; BEZERRA, A.; L.; SOUZA, C.; D.; COSTA, M.; P.; C. "Apicultura em São Raimundo Nonato, Piauí." **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável** Online doi: <https://doi.org/10.18378/rvads.v14i1.5889>, 14.1 (2019): 85 - 91. Web 17 Set. (2020).

CARVALHO, S. M.; CARVALHO, G. A.; CARVALHO, C. F.; BUENO FILHO, J. S. S.; BAPTISTA, A. P. M. Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 76, n. 4, 597–606, 2009.

CASTAGNINO, G. L. B.; ORSI, R. O. (2012). Produtos naturais para o controle do ácaro *Varroa destructor* em abelhas africanizadas. Pesquisa Agropecuária Brasileira 47 (6): 738-744.

CAVALIER-SMITH, T. A revised six-kingdom system of life. **Biol Rev Camb Philos Soc.** (1998) Aug;73(3):203-66. doi: 10.1017/s0006323198005167. PMID: 9809012.

CHEMUROT, M.; DE SMET, L.; BRUNAIN, M.; RYCKE, R.; GRAAF, D. (2017). *Nosema neumanni* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda. **European Journal of Protistology**. 61. 10.1016/j.ejop.2017.07.002.

CICCO, L.; H.; S. As abelhas e a história (2007). Disponível em: <http://www.saudeanimal.com.br/as-abelhas-e-a-historia/> acesso em: 16/09/2020.

CORNMAN, R. S.; CHEN, Y. P.; SCHATZ, M. C.; STREET, C.; ZHAO Y.; DESANY, B.; EGOLM, M.; HUTCHISON, S.; JEFFERY S.; PETTIS, W. LIPKIN, I.; EVANS, J. D. (2009) Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. **PLoS Pathog** 5: e1000466.

COUTO, R.; H.; N.; COUTO, L.; A. **Apicultura: manejo e produtos**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 191 p. (2002).

COX-FOSTER D. L.; CONLAN S.; HOLMES E. C.; PALACIOS G.; EVANS J. D.; MORAN N. A.; QUAN P. L.; BRIESE S.; HORNIG M.; GEISER D. M.; MARTINSON V.; VANEN-GELSDORP D.; KALKSEITN A. L.; DRYSDALE L.; HUI J.; ZHAI J.; CUI L.; HUTCHISON S.; SIMONS J. F.; EGHOLM M.; PETTIS J. S.; LIPKIN W.I.; (2007). A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. **Science**. 318: 283-287.

CRANE, E. (1978) Bibliography of Tropical Apiculture; also Satellite Bibliographies.
DAG, A.; Afik, O.; Stern, R. A.; Shafir, S. (2012). Selection and breeding of honey bee strains for pollination of tree crops. Proceedings of the 1st Api Eco Flora Symposium, San Marino, 15.

DAMIANI, N.; GENDE, L. B.; BAILAC, P.; MARCANGELI, J. A.; EGUARAS, M. J. (2009). Acaricidal and insecticidal activity of essential oils on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Parasitology Research** 106(1): 145-152.

DE GRAAF, D. C.; RAES, H.; SABBE L.; DE RYCKE P.H F.; JACOBS J. Early development of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) in the midgut epithelium of the honeybee (*Apis mellifera*). **Journal of Invertebrate Pathology**, Gent, v. 63, n. 1. p. 74–81, (1994).

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y.; DEJONG, E. W.; CÂMARAS M. L.; GEOFFREY H. Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. **Journal of Economic Entomology**. v.108, p. 2518-28, (2015).

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y.; SIMONDS, R. The Effects of Pesticides on Queen Rearing and Virus Titters in Honey Bees (*Apis mellifera* L.). **Insects**. (2013) Jan 4;4 (1):71-89. doi: 10.3390/insects4010071. PMID: 26466796; PMCID: PMC4553430.

DELFINADO, M. D.; BAKER, E. W. Varroidae, a new family of mites on honey bees (Mesostigmata: Acarina). **Journal of Washington Academic Science**, Washington, v. 64, n. 1, p. 4-10, (1974).

DELFINADO, M. D.; BAKER, E. W.; HOUCK, M. A. Geographical variation in *Varroa jacobsoni* (Acari, Varroidae): application of multivariate morphometric techniques. **Apidologie**, Tucson, v. 20, n. 4, p. 345-358, (1989).

DI PRISCO, G.; CAVALIERE, V.; ANNOSCIA, D.; VARRICCHIO, P.; CAPRIO, E.; NAZZI, F.; GARGIULO, G.; PENNACCHIO, F. (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. Proceedings of the **National Academy of Sciences** of the United States of America. 110. 10.1073/pnas.1314923110.

DONG, Y. H.; KVARNHEDEN, A.; YAO, J. L.; SUTHERLAND, P. W.; ATKINSON, R. G.; MORRIS, B. A.; GARDNER, R. C. Identification of pollination-induced genes from the ovary of apple (*Malus domestica*). **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v.11, p.277-283, (1998).

DOWLEY, J. L.; OSULLIVAN, E. Activity of Fluazinam against Late Blight of Potatoes **J. Agric. Food Res.**, 34, 33 (1995).

DRAPER, A.; CULLINAN, P.; CAMPBELL C.; JONES, M.; NEWMAN T.; A. Occupational asthma from fungicides fluazinam and chlorothalonil. **Environ. Med.**, 60, 76 (2003).

EAVES, C.; A., HOCKEY, J.; F.; ROSS, R.; C. Effects of orchard fungicides on store McIntosh apples, Canada. **Jour. Plant Sci.** 38 (2). Pp. 246-251. Apr. (1958).

EDNEV. K.; L. The rotting of apples by *Gloeosporium perennans* zeller & childs Ann. **Appl. Biol.** 44, 113 (1956).

FRANZEN, C.; MÜLLER, A. (1999). Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. **Clinical Microbiology Reviews**, Cologne, v. 12, n. 2, p. 243-285.

FREE, J.; B. 1993. Insect pollination of crops. 2. ed. London: Academic Press.

FREITAS, M.; B.; PINHEIRO, N.; J. Polinizadores e pesticidas: Princípios e manejo para os agroecossistemas brasileiros. – Brasília: MMA, (2012). 112 p.: il. Color; 29 cm.

FRIES, I.; FENG, F.; SILVA, A.; SLEMENDA, S., B.; PIENIAZEK, N., J. (1996). *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). **European Journal of Protistology**, 32: 356–365. doi:10.1016/S0932-4739(96)80059-9.

GALLO, D. Entomologia Agrícola. Piracicaba; FEALQ, (2002). XV. 920P.

GARIBALDI, L. A.; STEFFAN-DEWENTER, I.; KREMEN, C.; MORALES, J. M.; BOM-MARCO, R.; CUNNINGHAM, S. A.; KLEIN, A. M. Stability of pollination services decreases with isolation from natural areas despite honey bee visits. **Ecology Letters**, v. 14, n. 10, p. 1062-1072, (2011).

GIANNINI T.C.; MAIA-SILVA, C.; ACOSTA A.; JAFFÉ R.; CARVALHO T.; MARTINS C.; F.; ZANELA F.; CARVALHO, C. Protecting a managed bee pollinator against climate change: strategies for an area with extreme climatic conditions and socioeconomic vulnerability. **Apidologie** V 48, 784-794 (2017).

GILLIAM, M.; TABER, S.; RICHARDSON, G. V. (1983). Hygienic behaviour of honeybees in relation to chalkbrood disease. **Apidologie** 14, 29-39.

GISDER S.; MÖCKEL N.; LINDE A.; GENERSCH E.; A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. **Environ Microbiol.** (2011) Feb;13 (2):404-13. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02346.x. Epub 2010 Sep 30. PMID: 20880328.

GOBLIRSCH, M.; HUANG, Z. Y.; SPIVAK, M. (2013). Physiological and behavioral changes in honey bees (*Apis mellifera*) induced by *Nosema ceranae* infection. **PLoS ONE** 8(3): 58-165.

GOMES, I. N. Bioensaios em laboratório indicam efeitos deletérios de agrotóxicos sobre as abelhas *Melipona capixaba* e *Apis mellifera*. (2017). 51 p. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Viçosa.

GONÇALVES, J. C.; MESSAGE, D.; TEIXEIRA, A. B.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R. Comportamento higiênico em abelhas africanizadas. Teresina: Embrapa Meio-Norte, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento N° 82, (2008). 20 p.

GONÇALVES, L. S. Africanização das abelhas nas Américas, impactos e perspectivas de aproveitamento do material genético. **Naturalia**, p. 126–134, (1992). Edição Especial em Homenagem aos 70 anos do Dr. Warwick Estevam Kerr.

GONÇALVES, L. S.; STORT, A. C. A africanização das abelhas *Apis mellifera* nas Américas. II. In: BARRAVIERA (Ed.). Venenos Animais: Uma visão integrada. Rio de Janeiro, RJ: EPUC, **Editora de Publicações Científicas Ltda.** (1994). p. 49–63.

GOULSON, D. Review: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, v. 50, n. 4, p. 977–987, ago. (2013).

GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S. (1994). Estudo comparativo dos métodos de congelamento e perfuração de crias para avaliação do comportamento higiênico em abelhas africanizadas. In: CONGRESSO LATINOIBEROAMERICANO DE APICULTURA, 4. Anais. Córdoba -Argentina. p. 45.

GUIMARÃES-CESTARO, L.; MARTINS, M. F.; MARTÍNEZ, L. C.; ALVES, M. L. T. M. F.; GUIDUGLI-LAZZARINI, K. R.; NOCELLI, R. C. F.; TEIXEIRA, E. W. (2020). Occurrence of virus, microsporidia, and pesticide residues in three species of stingless bees (Apidae: Meliponini) in the field. **The Science of Nature** 107: 1-14.

HAMILTON, W. D. The genetical evolution of social behavior. I. **J. Theor Biol.** (1964) Jul; 7(1); 1- 16. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(64\)90038-4](https://doi.org/10.1016/0022-5193(64)90038-4)

HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., MEANA, A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. **Journal of Invertebrate Pathology**, Madrid, v. 92, n. 2. p. 93–95.

HIGES, M.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; MEANA, A. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. **Apidologie**, v. 41, p. 375–392, (2010).

HORSFALL, J. G., BARRATT, R.W. Na improved grading system for measuring plant disease. **Phytopathology** v.36, p.655, 1945 (abstract).

HUANG, W. F.; JIANG, J. H.; CHEN, Y. W.; WANG, C. H. (2007) A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. **Apidologie** 38: 30–37.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CANHOS, D. A. L.; ALVES, D. A.; SARAIVA, A. M. eds. (2012). Polinizadores no Brasil. Contribuição para a biodiversidade, uso sustentado, conservação e serviços ambientais. **Editora da Universidade de S. Paulo**, 488p.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; KOEDAM, D.; HRNCIR, M. A abelha jandaíra no passado, no presente e no futuro. Mossoró, RN: **Edufersa**, (2017).

INGHAM, E. R.; THIES, W. G.; LUOMA, D. L.; MOLDENKE A. R.; CASTELLANO M. A. (1991). Bioresponse of non-target organisms resulting from the use of chloropicrin to control laminated root rot in a Northwest conifer forest: Part 2. Evaluation of bioresponses. pp. 85-90. **International Bee Research Association**: London.

IUCHI, V. L. Botânica e fisiologia. In: EPAGRI. A cultura da macieira. Florianópolis: Epagri, (2006). p. 59-104.

JOHANSEN C.A.; MAYER D. F.; Pollinator Protection: A Bee and Pesticide Handbook, Wicwas Press, (1990). Cheshire, CT, USA.

JOHNSON R. M.; DAHLGREN L.; SIEGFRIED B. D.; ELLIS M. D. Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). **PLoS One**. (2013); 8 (1):e54092. doi: 10.1371/journal.pone.0054092. Epub (2013) Jan 29. PMID: 23382869; PMCID: PMC3558502.

KEELING, P. J.; FAST, N. M. (2002). Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. **Annual Review of Microbiology**, Vancouver, v. 56, p. 93-116.

KERR, W. E. (1967). The history of introduction of African bees to Brazil. **South African Bee Journal**, 39(2): pp. 3-5.

KHERA, K. S. Ethylenethiourea-induced hydrocephalus in vivo and in vitro with a note on the use of a constant gaseous atmosphere for rat embryo cultures. **Teratology**. (1989) Mar; 39(3):277-85. doi: 10.1002/tera.1420390309. PMID: 2727935.

KILJANEK, T.; NIEWIADOWSKA, A.; GAWEŁ, M.; SEMENIUK, S.; BORZECKA, M.; POSYNIK, A.; POHORECKA, K. (2017). Multiple pesticide residues in live and poisoned honeybees Preliminary exposure assessment. **Chemosphere**. DOI: 175.10.1016/j.chemosphere.2017.02.028.

KIMATI, H. Controle químico. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. ed. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. v.1, p.761-784,(1995).

KIST, B. B.; SANTOS, E. V.; CARVALHO E.; BELING R. R. Anuário Brasileiro Da Maçã, (2019), Santa Cruz do Sul: **Editora Gazeta Santa Cruz**, 2019. http://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wpcontent/uploads/2019/06/MA%C3%A7%C3%A2_2019_DU-PLA.pdf. Acesso em 01/03/2021.

KLEE, J.; BESANA A. M.; GENERSCH, E.; GISDER, S.; NANETTI, A.; TAM D. Q.; CHINH T. X.; PUERTA F.; RUZ J. M.; KRYGER P.; MESSAGE D.; HATJINA F.; KORPELA S.; FRIES I.; PAXTON R. J.; Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. **J Invertebr Pathol**. (2007) Sep; 96 (1):1-10. DOI: [10.1016/j.jip.2007.02.014](https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.014) Epub (2007) Mar 12. PMID: 17428493.

KOGAN M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. **Annu Rev Entomol**. (1998); 43:243-70. DOI: [10.1146/annurev.ento.43.1.243](https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.243).

KOIVISTOINEN. P.; KARINPÄÄ. A.; KÖNÖNEN. M.; ROINE P. Postharvest Preservatives, Magnitude and Stability of Captan Residues in Fresh and Preserved Plant Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** (1965). 13 (5), 468-473 <https://doi.org/10.1021/jf60141a024>

KOMYOJI, T.; SUGIMOTO, K.; MITANI, S.; MATSUO, N.; SUZUKI, K. (1995). Biological properties of a new fungicide, fluazinam. **Jornal of Pesticide Science**, 20 (2), 129-135.

KOVALESKI, A.; RIBEIRO, L. G. Manejo de pragas na produção integrada da maçã. EMBRAPA-CNPUV, (2002). 8 p. (Circular Técnica, 34).

KRAUS B.; HUNT G.; Diferenciação de *Varroa jacobsoni* Oud. Populações por amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD). **Apidologie**. (1995); 26: 283-290.

KREMEN, C. WILLIAMS, N. M.; THORP, R. W. (2002). Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. **Proc. Natl. Acad.Sci. USA**, 99, 16812-16816.

KRUPKE, C. H.; HUNT, G. J.; EITZER, B. D.; ANDINO G.; GIVEN, K. Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. **PLoS ONE**, São Francisco/EUA, v.7, n.1, e29268. (2012).

KVITSCHAL, M. V.; HAWERROTH, M. C.; BRIGHENTI, A. F. Novas variedades de maçã no Brasil: situação atual, tendências e perspectivas. Anais: Resumos das palestras, v. 1, p.126-132, (2018). Disponível em: https://www.senafrut.com.br/assets/uploads/ANAIS_AF_WEB.pdf Acesso em: 08/09/2020.

LAIDLAW. H. H. J; PAGE, R. E. J. Polyandry in Honey Bees (*Apis mellifera* L.): Sperm Utilization and Intracolony Genetic Relationships. **Genetics**. 1984 Dec;108(4):985-97. Doi:[10.1093/genetics/108.4.985](https://doi.org/10.1093/genetics/108.4.985) PMID: 17246245; PMCID: PMC1224278.

LARSSON, R. (1986). Ultrastructure, function, and classification of Microsporidia. **Progr. Protistol**. [S.l], v. 1, p. 325–390.

LENTOLA, A. A.; DAVID, A.; ABDUL-SADA, A.; TAPPARO, D.; GOULSON, E. M.; HILL D. Ornamental plants on sale to the public are a significant source of pesticide residues with implications for the health of pollinating insects. **Environ. Pollut.** 228 (2017), pp. 297 – 304.

LIANG, H. J.; DI, L. Y.; LI, J.; ZHU, X.F.; Baseline sensitivity and control efficacy of fluazinam against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Eur. J. Plant Pathol** 142 691-699 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0644-5>

LOPES, R.; T., M.; GONÇALVES, C., J.; MESSAGE, D.; PEREIRA, M. F.; CAMARGO, R. C. R. Doenças e inimigos naturais das abelhas. Teresina, Embrapa Meio-Norte, (2004). 26p. doi <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/68248/1/Doc103.pdf> acesso em 19/10/2020.

LUKENS, R. J. The chemistry of fungicidal action. **Springer-Verlag**, New York, (2013).

MALAGODI-BRAGA, K. S. (2005). Abelhas: por quê manejá-las para a polinização? *Mensagem Doce* 80: 19-20 [20] (introdução da colônia: Japão, experiências em estufa, polinização: morangos, citação).

MALASPINA, O.; NOVELLI, R. C. F.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; SOUZA, T. F.; Defesa de apiários e meliponários contra agrotóxicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 18, 2010. Cuiabá. Anais... Mato Grosso, (2010). 5 p.

MALASPINA, O.; SOUZA, T. F. Reflexos das aplicações de agrotóxicos nos campos de cultivo para a apicultura brasileira. In: Congresso Brasileiro De Apicultura, 27; E Meliponicultura, 3; Belo Horizonte, 2008. **Anais...** Belo Horizonte, (2008).

MALHAT, F.; KAMEL, E.; SABER, A.; HASSAN, E.; YOUSSEF, A.; ALMAZ, M.; HASSAN A.; FAYZ, A. E. Food Chem., Residues, dissipation and safety evaluation of chromafenozide in strawberry under open field conditions.140, 371 (2013).

MASAQUIZA, D.; VARGAS J.; ORTÍZ, N.; SALAZAR, R.; CURBELO, L.; PÉREZ, A.; ARENAL, A. Hygienic Behavior of *Apis mellifera* and Its Relationship with *Varroa destructor* Infestation and Honey Production in the Central Highlands of Ecuador. **Insects**. (2021) Oct 25;12(11):966. doi: 10.3390/insetos12110966.

MATSON, P. A.; PARTON, W. J.; POWER, A. G.; SWIFT, M. J. (1997). Agricultural intensification and ecosystem properties. **Science**, **277**, 504– 509.

McGREGOR, S. E. Insect pollination of cultivated crop plants. Washington, DC: USDA, **Agricultural Research Service**, 411p. (1976).

MESSAGE, D. (1979). Efeito de condições ambientais no comportamento higiênico em abelhas africanizadas *Apis mellifera*. MSc. tese, Faculdade de Medicina de Ribeirão, Universidade de São Paulo, Brasil

MILONE, J. P.; TARPY D. R. Effects of developmental exposure to pesticides in wax and pollen on honey bee (*Apis mellifera*) queen reproductive phenotypes. **Sci Rep**. (2021) Jan 13; 11(1):1020. DOI: [10.1038/s41598-020-80446-3](https://doi.org/10.1038/s41598-020-80446-3) PMID: 33441911; PMCID: PMC7806648.

MINEIRO, J. L. C.; SATO, M. E.; RAGA, A.; KOVALESKI, A. Ácaro-vermelho-da-macieira, *Panonychus ulmi* (Kock). In: Vilela, E.F.; Zucchi, R.A. Pragas introduzidas no Brasil: insetos e ácaros. Piracicaba: FEALQ, p.407-417, (2015). <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1023352/acaro--vermelho-da-macieira-panonychus-ulmi-koch>

MORITZ, R. F. A. A re-evaluation of the two locus model for hygienic behaviour in honeybees (*Apis mellifera* L.). **J. Hered.** v, 79, p. 257– 262, (1988).

MORITZ, R.; DE MIRANDA, J.; FRIES, I.; LE CONTE, Y.; NEUMANN, P.; PAXTON, R. Research strategies to improve honeybee health in Europe. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 227-242, (2010).

MORSE R. A.; GONÇALVES, L. S. (1979). *Varroa* disease, a threat to word beekeeping gleanings in bee culture, 107:179-191.

MURILHAS, A.; CASACA, J. (2004). Conviver com a *Varroa* em Portugal. Um contributo para a adopção de boas práticas apícolas de convivência com a *Varroa*. Universidade de Évora,

MUSSEN, E. C.; LOPEZ, J. E.; PENG, C. Y. S. Effects of selected fungicides on growth and development of larval honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Entomology**, v.33, n.5, p.151-1154, (2004).

NUNES, S. P.; HEINDRICKSON, M. (2019). A cadeia produtiva do mel no Brasil: análise a partir do sudoeste Paranaense. **Brazilian Journal of Development**. DOI: [10.34117/bjdv5n9-222](https://doi.org/10.34117/bjdv5n9-222) acesso em 17/09/2020.

OIE Código Sanitário para Animais Terrestre (2020) <https://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2020/> Acesso em 20/09/2020.

PALACIO, M. A.; FIGINI, E. E.; RUFFINENGO, S. R.; RODRIGUEZ, E. M.; DEL HOYO, M. L.; PANSER, I. S. L. M.; CHIESA, A.; ZECCONI, G.; SONCINI, I. De Noni Determination of Volatile Organic Compounds (VOCs) from wrapping films and wrapped PDO Italian cheeses by using HS-SPME and GC/MS Molecules, 19 (2014), pp. 8707-8724 <https://doi.org/10.3390/molecules19078707> acesso em: 17/09/2020.

PATRON, E. Polinización com abejas. In: BESSONE, J. F. (Ed.). **Editorial Campo & Abejas** - Edición especial: Polinización. Buenos Aires: Agencia Periodística CID, (2010). p. 4-15.

PERNAL, S. F. The biology and control of *Nosema*. Bee Masters (2012). Advanced Beekeeping Course, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada, p. 20-24.

PETRI, J. L.; COUTO, M.; GABARDO, G. C.; FRANCESCATTO, P. Comparação de formulações no raleio químico da macieira 'Fuji Suprema'. In: Congresso Brasileiro De Fruticultura, 23. (2014), Cuiabá, MT. Anais, Cuiabá, MT: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2014.

PETRI, J. L.; LEITE, G. B.; COUTO, M.; FRANCESCATTO, P. Avanços na cultura da macieira no Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura, v.33, p.48-56, (2011). DOI: 10.1590/S0100-29452011000500007.

PETRI, J. L.; SEZERINO, A. A.; MARTIN, M. S. de. Estado atual da cultura da macieira. Artigos exclusivos: maçã; (2018). Disponível em; <https://www.todafruta.com.br/wp-content/uploads/2018/03/MA%C3%87%C3%83.pdf> Acesso em 08/09/2020.

PETTIS, J. S.; LICHTENBERG, E. M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R.; VANEN-GELSDORP, D. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS One**. (2013) Jul 24; 8(7):e70182. doi: 10.1371/journal.pone.0070182 PMID: 23894612; PMCID: PMC3722151.

PETTIS, J. S.; LICHTENBERG, E. M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R.; VANEN-GELSDORP, D. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS One**. (2013) Jul 24; 8(7):e70182. doi: 10.1371/journal.pone.0070182. PMID: 23894612; PMCID: PMC3722151.

PICININI, E. C. Fungicidas inibidores da biossíntese de ergosterol Piridinas, pirimidinas e piperazinas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v 5, p.353-386, (1997).

PINTO, F. A.; PUKER, A.; BARRETO, L. M. R. C. (2015). Infestation rate of the mite *Varroa destructor* in commercial apiaries of the Vale do Paraíba and Serra da Mantiqueira, southeastern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 67(2): 631-635.

PIOTROWSKA-SEGET, Z.; ENGEL, R.; NOWAK, E.; KOZDROJ, J. Successive soil treatment with captan or oxytetracycline affects non-target microorganisms. **Word J Microbiol. Biotechnol** 24, 2843 (2008). <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9815-2>. PMID: 30845462.

PORRINI, M. P.; PORRINI, L. P.; GARRIDO, P. M.; PORRINI, D. P.; MULLER, F.; NUÑEZ, L. A.; EGUARAS, M. J. (2017). *Nosema ceranae* in South American native stingless bees and social wasp. **Microbial ecology** 74(4): 761-764. Portugal. 32 p.

POTTS S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W. E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends Ecol Evol.** (2010), 25:345-353.

POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NGO, H. T. O relatório de avaliação sobre polinizadores, polinização e produção de alimentos. **IPBES** (2016).

PROTAS, J. D. S.; SANHUEZA, R. V. Produção integrada de frutas: o caso da maçã no Brasil. [S.l.]: Embrapa Uva e Vinho, (2003). Citado na página 19.

RAND E. E.; SMIT, S.; BEUKES, M.; Z; PIRK, C. W. W.; NICOLSON, S. W. (2015). Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. **Apostolides, Sci. Rep.** 5: 1-11.

REIS, E. M. Redução da sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas e estratégia antiressistência. (2015). **Revista Plantio Direto** – Ed.141 21-27. <https://www.plantiodireto.com.br/storage/files/141/6.pdf>

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais – 5ª aproximação - Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, (1999). 360p.

RICH, S. Dynamics of deposition and tenacity of fungicides. *Phytopathology* 44:203-213. (1954).

ROSENKRANZ, P. AUMEIER, P., ZIEGELMANN, B. (2009). Biology and control of *Varroa destructor*. **Journal of invertebrate pathology.** 103 Suppl 1. S96-119. 10.1016/j.jip.2009.07.016.

ROTHENBUHLER W. C. (1964a) Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. **Anim. Behav.** 12, 578-583.

ROTHENBUHLER W. C. (1964b) Behaviour genetics of nest cleaning honey bees. IV. Responses of Fi and backcross generations to disease-killed brood. **Am. Zool.** 4, 111-123.

RUDDICK, J. A.; KHERA, K. S. Pattern of anomalies following single oral doses of ethylenethiourea to pregnant rats. *Teratology.* (1975) Dec; 12 (3):277-81. doi: 10.1002/tera.1420120309. PMID: 1198334.

RUTTNER, F. Biogeography and taxonomy of honeybees. **Springer Verlag**. Heidelberg, Berlin, New York, (1988). 284p.

SALOMÉ, J. A.; ORTH, A. I. Polinização em pomares de macieiras: Nova metodologia para o aumento da frutificação com o manejo correto de colmeias. **Agropecuária Catarinense**. Suplemento especial. V. 27, n. 2, (2014).

SAMMATARO, D.; OLAFSON, P.; GUERRERO, F.; FINLEY, J. (2005). The resistance of *Varroa* mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. **International Journal of Acarology**. 31. 10.1080/01647950508684419.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; BELZUNCES, L.; BONMATIN, J. M. Lethal and sublethal effects, and incomplete clearance of ingested imidacloprid in honey bees (*Apis mellifera*). **Ecotoxicology**, v. 26, n. 9, p. 1199–1206, nov. (2017).

SANHUEZA, R. M. V.; BETTI, J.; KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN F. A.; CAMARGO, L. E. A. (Org.). A. Doenças Da Macieira. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p.421-433.

SANTOS, A. C. C.; CRISTALDO P. F.; ARAÚJO, A. P. A.; MELO, C.R.; LIMA, A. P. S.; SANTANA, E. D. R.; OLIVEIRA, B. M. S.; OLIVEIRA J. W.S.; VIEIRA, J. S.; BLANK, A. F.; BACCI, L. *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera) in the target of neonicotinoids: A one-way ticket? Bioinsecticides can be an alternative. **Ecotoxicol Environ Saf.** (2018) Nov 15; 163: 28-36. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.07.048. Epub 2018 Jul 19. PMID: 30031942.

SANTOS, J. P.; WAMSER, A. F. Efeito do ensacamento de frutos sobre danos causados por fatores bióticos e abióticos em pomar orgânico de macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.2, p.168-171, (2006).

SCARIOT, F., J.; JAHN, L.; DELAMARE, A. P. L.; Echeverrigaray, S. Morte celular necrótica e apoptótica induzida por Captan em *Saccharomyces cerevisiae*. **World J Microbiol Biotechnol** 33, 159 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2325-3>

SCHAFASCHEK, T. P.; HICKEL, E. R.; OLIVEIRA, C. A. L. TOLEDO, V. A. A. (2019). Infestation and Reproduction of *Varroa destructor* Anderson and Trueman and Hygienic Behavior in Colonies of *Apis mellifera* L. (Africanized Honeybee) with Queens of Dierent Genetic Origins. **Sociobiology**, v. 66, n.3, p.448-456.

SCHAFASCHEK, T. P.; HICKEL, E. R.; PEREIRA, H. L.; LOPES DE OLIVEIRA, C. A.; ARNAUT DE TOLEDO, V.A. (2016). Performance of Africanized honeybee colonies settled by queens selected for different traits. Acta Scientiarum. **Animal Sciences**, 38:91-100.6

SCHÖNING, C.; GISDER, S.; GEISELHARDT, S.; KRETSCHMANN, I.; BIENEFELD, K.; HILKER, M.; GENERSCH, E. (2012). Evidence for damage-dependent hygienic behaviour towards *Varroa destructor* parasitised brood in the western honey bee, *Apis mellifera*. **J. Exp. Biol.** 215:264–271.

SILVA, C. M. R. Luta contra *Varroa destructor* Anderson & trueman: avaliação de estratégias biotécnicas e bioquímicas com o óleo de *Mentha cervina* L. (2010), 77p. Dissertação (Mestrado) Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa.

SILVA, J. V.; JULIATTI, F. C.; SILVA, J. R. V.; BARROS, F. C. Soybean cultivar performance in the presence of soybean Asian rust, in relation to chemical control programs. **European Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 131, n. 3, p. 409-418, (2011).

SILVA, R. A. G.; FARIA, A. M. Determinação de multirresíduos de agrotóxicos em méis produzidos na região do triângulo mineiro por UHPLC-MS/MS. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 307-313, Mar. 2020. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01004042202000030007&lng=en&nrm=iso>. Access on 20 Sept. 2020. Epub June 01, 2020. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170492>.

SIMON-DELISO, N.; SAN MARTIN, G.; BRUNEAU, E. DELCOURT, D.; HAUTIER, L.; The challenges of predicting pesticide exposure of honey bees at landscape level **Sci Rep** 7, 3801 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03467-5> acesso em: 17/09/2020.

SKERL, M. I. S.; VELIKONJA, B. S.; BASA C. H.; GREGORC, A. (2009). Residues of Pesticides in honeybee (*Apis mellifera* carnica) bee bread and in pollen loads from treated apple orchards **Bull Environ Contam Toxicol**. 2009 Sep;83(3):374-7. doi: 10.1007/s00128-009-9762-0. Epub 2009 May 12. PMID: 19434347.

SMITH, D. L., GARRISON, M. C., HOLLOWELL, J. E., ISLEIB, T. G.; SHEWA, B. B. (2008). Evaluation of application timing and efficacy of the fungicides fluazinam and boscalid for control of *Sclerotinia* blight of peanut. **Crop Protection**, 27, 823– 833.

SPIVAK, M.; REUTER, G. S. (2001). Resistance to American foulbrood disease by honeybee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. **Apidologie** 32, 555-565.

STADNIK, M. J. Manejo integrado de doenças da macieira. Florianópolis: UFSC-CCA, 2009. 229p.

STORT, A. C.; GONÇALVES, L. S. A africanização das abelhas *Apis mellifera* nas Américas. In: BARRAVIERA (Ed.). Venenos Animais: Uma visão integrada. 1a ed. Rio de Janeiro, RJ: EPUC, **Editora de Publicações Científicas Ltda.**, (1994). p. 33–47.

STORT, A. C.; GONÇALVES, L., S. A abelha africanizada e a situação atual da apicultura no Brasil. *Ciência e Cultura*, v. 1, n. 31, p. 32–43, (1979).

STRAPAZZON, R.; CARNEIRO, F.; GUERRA J. J.; MORETTO, G. Genetic characterization of the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) collected from honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) in the State of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 3, p. 990-997, (2009).

SULBORSKA, A.; HORECKA, B.; CEBRAT, M.; KOWALCZYK, M.; SKRZYPEK, T.; KAZIMIERCZAK, W.; TRYTEK, M.; GRZEGORZ, B.; (2019). Microsporidia *Nosema* spp. – obligate bee parasites are transmitted by air. **Scientific Reports**. 9. 10.1038/s41598-019-50974-8.

TADEI, R.; DOMINGUES, C. E. C.; MALAQUIAS, J. B.; CAMILO, E. V.; MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN E. C. M. Efeitos tardios da co-exposição larval a doses realísticas do inseticida clotianidina e do fungicida piraclostrobina: avaliação da longevidade das operárias adultas de *Apis mellifera* africanizada. *SciRep* 9, 3277 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39383-z>

TARNO, H.; WICAKSONO, K. P.; BEGLIOMINI, E. Floral Stimulation and Behavior of Insect Pollinators Affected by Pyraclostrobin on Arabica Coffee. **Agrivita Journal of Agricultural Science**, (2018).

TAVARES, D. A.; ROAT, T. C.; MATHIAS SILVA-ZACARIN, E. C.; FERREIRA NO-CEELLI, R. C.; MALASPINA, O. Exposure to thiamethoxam during the larval phase affects synapsin levels in the brain of the honey bee. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, n. April 2018, p. 523–528, (2019).

TENTCHEVA, D.; GAUTHIER, L.; BAGNY, L.; FIEVET, J.; DAINAT, B.; COUSSERANS, F.; COLIN, M. E.; BERGOIN, M. (2006). Comparative analysis of deformed wing virus (DWW) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. **Apidologie**, 37: 41-50.

TISON, L., RÖBNER, A.; GERSCHEWSKI, S.; MENZEL, R.; (2019). The neonicotinoid clothianidin impairs memory processing in honey bees. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 180. 139-145. 10.1016/j.ecoenv.2019.05.007.

TOKAREV, Y. S.; HUANG, W. F.; SOLTER, L. F.; MALYSH, J. M.; BECNEL, J. J.; VOSSBRINCK, C. R. A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics **J. Invertebr. Pathol.** 169 (2020), p. 107279, [10.1016/j.jip.2019.107279](https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107279)

TORRES, R. D. N. S.; BARRETO, M. R. 2013. Incidence of *Varroa destructor* (Anderson and Trueman) in stinging bees in the Sinop region, Mato Grosso, Brazil. **Entomo Brasilis** 6(1): 3033.

TRAYNOR, K. S.; MONDET, F.; DE MIRANDA J. R.; TECHER, M.; KOWALLIK, V.; ODDIE, MAY.; CHANTAWANNAKUL, P. *Varroa destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. McAfee A. **Tendências Parasitol.** (2020) julho; 36 (7):592-606. doi: 10.1016/j.pt.2020.04.004.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; BECKER, W.; BONETI, J. I. S.; KATSURAYAMA, Y.; CZERMAINSKI, A. B. C. Manejo das doenças de verão na produção integrada de maçã. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, (2002). 12p. (Circular técnica. Embrapa, 36). <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/538630/1/cir036.pdf> acesso em 01/10/2020.

VANENGELSDORP, D.; EVANS, J.D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B.K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. S. Colony collapse disorder: a descriptive study. **PLoS One**. (2009). Aug 3;4 (8):e6481. doi: 10.1371/journal.pone.0006481. PMID: 19649264; PMCID: PMC2715894.

VETTER, R. S; VISSCHER, P. K. Influence of age on antennal response of male honeybees, *Apis mellifera*, to queen mandibular pheromone and alarm pheromone componente. **Journal of Chemical Ecology**, Riverside, v. 23, n. 7, p. (1997).

VICENS, N.; BOSCH J. (2000). Weather-dependent pollinator activity in an apple orchard, with special reference to *Osmia cornuta* and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Megachilidae and Apidae). **Environmental Entomology** 29:413-420.

VITORATOS, A. G. (2014). Mode of action and genetic analysis of resistance to fluazinam in *Ustilago maydis*. **Journal of Phytopathology**, 162, 737–746.

WANG, Y.; ZHU, C. Y.; LI, W.; YAO, J.; REDDY, G. V. P.; LV, L. Binary and ternary toxicological interactions of clothianidin and eight commonly used pesticides on honey bees (*Apis mellifera*), **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Volume 223, (2021), 112563, ISSN 0147-6513, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112563>.

WEIRTHEIM, S. J.; SCHMIDT, H. Flowering, pollination and fruit set. In: Fundamentals of temperate zone tree fruit production. Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands, p. 216-239, (2005).

WERTHEIM, S. J.; WEBSTER, A. D. Manipulation of growth and development by plant bio-regulators. In: Fundamentals of temperate zone tree fruit production. Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands, p. 267- 294, (2005).

WILSON-RICH, N.; SPIVAK, M.; FEFFERMAN, N. H.; STARKS, P. T. (2009). Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. **Annual Review of Entomology**, v.54, p. 405, 23.

WINFREE, R.; AGUILAR, R.; VÁZQUEZ, D. P.; LEBUHN, G; AIZEN, M. A. A metaanalysis of bees responses to anthropogenic disturbance. **Ecology**, v. 90, n. 8, p. 2068-2076, (2009).

WINSTON, M. L. A Biologia da Abelha. Porto Alegre: Magister, (2003). p.72-7.

WU, J.; LIU, Z.; PAN, C.; ZHAO, Y.; ZHANG, H. (2014). Residue analysis and dissipation of fluazinam in apple under field conditions. **Asian Journal of Chemistry**, 26(20), 6758–6760.

XU, H.; LI, Z.; HUA, Z.; WU, M.; HU, X. (2006). Dynamics of ZJ0712 Residue in Cucumber and Soil. **Journal of Agro-Environment Science**. 25, 595-598

YANG, C.; HAMEL, C.; VUJANOVIC, V. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. **ISRN Ecology**, v.2011, n.130289, p.1-8, (2011).

YODER, J. A.; JACK, A. J.; ROSSELOT, A. E.; SMITH, T. J.; YERKE, M. C.; SAMMATARO, D. (2013). Fungicide contamination reduces beneficial fungi in beebread based on an area-wide field study in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. **J Toxicol Environ Health**. 76, 587–600.

ZALUSKI, R.; JUSTULIN, L. A. J. R.; ORSI, R. O. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v.7, n.15217, (2017).

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. DO; CHAVES, G. M. Controle químico de doenças de plantas. Brasília: ABEAS, (1995), 307p.

ZHU, W.; SCHMEHL, D. R.; MULLIN, C. A.; FRAZIER, J. L. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. **PLoS One**. 2014 Jan 8;9(1):e77547. DOI: [10.1371/journal.pone.0077547](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077547) PMID: 24416121; PMCID: PMC3885384.

CAPÍTULO II

EFEITOS DOS FUNGICIDAS CAPTAN[®] & SIGNAL[®] NO COMPORTAMENTO HIGIÊNICO E ÍNDICE DE *Varroa destructor* EM *Apis mellifera* (HYMENOPTERA: API-DAE)

RESUMO

Os pomares de macieiras sofrem com doenças ocasionadas por fungos, para seu combate é necessário utilizar produtos fitossanitários, como fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®]. Essa pulverização é realizada no período da floração, período em que os pomares estão recebendo os polinizadores, como *Apis mellifera*, sendo considerada um dos polinizadores mais importantes para a cultura. Seus efeitos são desconhecidos para a colmeia quando expostas a esses produtos a doses de campo. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento higiênico, infestação de *Varroa destructor* e força das colmeias de *A. mellifera* expostas aos fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®], utilizados em pomares de macieiras. O bioensaio foi composto por quatro tratamentos, com três repetições, representadas pelas colmeias. Cada colmeia foi exposta a dietas alimentares correspondentes aos tratamentos: Controle, Captan[®]SC, Zignal[®] e Mistura. As colmeias foram avaliadas nos tempos 0, 60, 90, 180, e 240 dias após a exposição, quanto ao comportamento higiênico (CH) e índice do ácaro *V. destructor* (IAV). A força das colmeias foi avaliada nos tempos 0, 45, 135 e 180 dias após a exposição. Os resultados indicaram uma diminuição no CH, aumento no índice de *V. destructor* e redução na força das colmeias tratadas com os fungicidas isolados e em mistura, evidenciando um efeito dos tratamentos dependente do tempo. A mistura foi a mais prejudicial dentre as colmeias tratadas, com redução no CH de 18,4 % nos tempos 0 e 60 dias, após o início dos bioensaios e redução na força das colmeias, comprometendo principalmente a área de cria e população de adultas. Nossos resultados indicam que as exposições as doses de campo dos fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®] exercem efeitos subletais em *A. mellifera*, causando prejuízos em várias gerações no decorrer dos 240 dias analisados e assim o declínio da colmeia.

Palavras-chave: Efeito subletal, captana, fluazinan, força da colmeia, varroose.

Abstract

Apple orchards suffer from diseases caused by fungi, and to fight them, it is necessary to use phytosanitary products such as Captan[®]SC and Zignal[®]. This spraying is performed in the flowering period, the period when the orchards are receiving pollinators, such as *Apis mellifera*, which is considered one of the most important pollinators for the crop. Therefore, this study aimed to evaluate the hygienic behavior, *Varroa destructor* infestation and strength of *A. mellifera* hives exposed to Captan[®]SC and Zignal[®] fungicides used in apple orchards. The bioassay consisted of four treatments, with three replications, represented by the hives. Each hive was exposed to food diets corresponding to the treatments: Control, Captan[®]SC, Zignal[®] and Mixture. The hives were evaluated at 0, 60, 90, 180, and 240 days after exposure for hygienic behavior (HB) and *V. destructor* mite rate (Índice do ácaro *V. destructor*, IAV). Hive strength was evaluated at 0, 45, 135, and 180 days after exposure. The results indicated a decrease in HB, an increase in *V. destructor* rate and decrease in the strength of the hives treated with fungicides alone and in a mixture, highlighting a time-dependent effect of the treatments. The mixture was the most harmful among the treated hives, with an 18.4% decrease in the HB at 0 and 60 days after the beginning of the bioassays and a decrease in the strength of the hives, mainly compromising the brood area and the adult mite population. Our results show that field doses of the fungicides Captan[®]SC and Zignal[®] have sublethal effects on *A. mellifera* hives, causing damage to several generations over 240 days and thus the decline of the hive.

Keywords: Sublethal effect, captan, fluazinan, hive strength, varroosis.

7. INTRODUÇÃO

A maçã (*Malus domestica* Borkh) é uma fruta de clima temperado, com sua produção concentrada no Sul do Brasil (PETRI et al., 2018). Seu cultivo possui importância social e econômica, gerando emprego e renda para milhares de pessoas (KRETZSCHMER e RUFATO, 2020). A alta produtividade da macieira é dependente da entomofilia (da ROSA et al., 2017). A abelha *Apis mellifera* Linnaeu (Hymenoptera: Apidae) é utilizada na polinização dirigida em macieiras (SALOMÉ, 2014; WIESE; SALOMÉ, 2020). Seu uso é devido ao fácil manejo, elevada população por colmeia, eficiência na polinização e facilidade de transporte para pomares (BIZOTTO et al., 2018).

O transporte das colmeias para os pomares inicia quando há entre 5 e 10% de flores abertas (SALOMÉ, 2014). Esse procedimento tem por objetivo evitar que as abelhas busquem fontes alimentares alternativas no entorno do pomar (ABROL, 2012). Entretanto, durante a floração ocorrem doenças fúngicas nas macieiras, sendo utilizados fungicidas para evitar perdas de produção (BONETI et al., 2002; NETO e SILVA et al., 2011). Apesar de insetos não serem alvo de fungicidas, o contato direto ou residual, ou a exposição via néctar ou pólen contaminado sugerem que estes produtos afetam abelhas (GULLEN et al., 2019; ZIOGA et al., 2020).

A exposição de abelhas a fungicidas pode causar efeitos subletais, dentre os quais destacam-se, o comprometimento de funções fisiológicas e comportamentais (SCARIOT et al., 2017; TARNO et al., 2018; TADEI et al., 2019), como: alterações no padrão de voo, lesões no intestino médio, redução da sobrevivência de adultos, enfraquecimento da colmeia (DEGRANDI-HOFFMAN et al., 2015; CIZELJ et al., 2016; TADEI et al., 2019; ZALUSKI et al., 2020) e o comprometimento do comportamento higiênico (ALMEIDA 2017).

O comportamento higiênico é um mecanismo de defesa de abelhas a doenças. Abelhas com esse comportamento detectam e removem crias mortas ou doentes da colmeia (ROTHENBUHLER, 1964a-b; SCHAFASCHEK et al., 2019). Para ser considerada higiênica, as abelhas devem remover 85% ou mais das crias mortas em até 24 horas (MASAQUIZA et al. 2021; GRAMACHO; GONÇALVES, 1994). O comportamento higiênico é controlado por genes recessivos e expresso em abelhas homozigóticas (ROTHENBUHLER, 1964; MORITZ, 1988). Entretanto, a exposição a fungicidas pode comprometer a expressão do comportamento higiênico (CIZELJ et al., 2016; TADEI et al., 2019; SILVA, 2021), favorecendo a varroose em colmeias (GUERRA et al., 2010; RAND et al., 2015; ANNOSCIA et al 2020). Além disso, a exposição a fungicidas promove um gasto energético para desintoxicação, reduzindo o vigor de

A. mellifera na defesa contra parasitas (PETTIS et al., 2013; RAND et al., 2015), tornando as colmeias mais suscetíveis a *Varroa destructor* (Arachnida: Varroidae).

O ácaro *V. destructor* é um importante ectoparasita de *A. mellifera* (CRANE, 1978; TRAYNOR et al 2020), que se alimenta da hemolinfa e do corpo gorduroso de *A. mellifera* (MURILHAS e CASACA, 2004; RAMSEY et al., 2019; TRAYNOR et al., 2020). Essa alimentação reduz o metabolismo de proteínas essenciais ao sistema imune do inseto (ALAUX et al., 2011; DEGRANDI-HOFFMAN; CHEN, 2015), o que pode acelerar o declínio da colmeia. Nesse contexto, a exposição a fungicidas, pode comprometer a resposta imune de *A. mellifera*, contribuindo para o enfraquecimento da colmeia e potencializando a ação de *V. destructor* (DI PRISCO et al., 2013; ALMASRI et al 2020).

A introdução de *A. mellifera* em pomares durante a floração da macieira possibilita o contato com fungicidas. Essa exposição pode afetar o comportamento higiênico, potencializar a ação de *V. destructor* e diminuir a força da colmeia, causando a perda de colmeias (GENERSCHE et al., 2010). Deste modo, diante da lacuna sobre os efeitos de fungicidas em colônias de *A. mellifera*, há a necessidade de estudos que subsidiem agricultores e técnicos para o emprego de estratégias de aplicação que preservem estes polinizadores. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento higiênico, infestação de *V. destructor* e força das colmeias de *A. mellifera* expostas aos fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®], utilizados em pomares de macieiras.

8. MATERIAL E MÉTODOS

8.1 APIÁRIO

O experimento foi conduzido em apiário experimental da Cidade das Abelhas, localizado na Ilha de Santa Catarina, Brasil (27°32'13.2" S; 48°30'09.5"O), (Figura 1). O clima é classificado como Cfa (Classificação climática de Köppen-Geiger), mesotérmico úmido, com verões quentes e chuvas distribuídas durante o ano e temperatura média anual 21,15 °C (ROCHA et al., 1993). A área experimental é circundada por uma unidade de conservação ambiental (4,92 Km²), não sendo permitido o uso agrícola e emprego de agrotóxicos em um raio de até 10 km da área experimental. As colmeias de *A. mellifera* foram mantidas em caixas do tipo Langstroth com dez quadros cada, sendo manejadas e monitoradas de julho de 2020 a março de 2021, para padronização quanto a postura da rainha, quantidade populacional de abelhas adultas, área de cria e alimento estocado, de acordo com o método subjetivo de Delaplane et al. (2013).

Adicionalmente, foram realizados manejos sanitários para controle de parasitas com a introdução de fitas de ácido oxálico.

Figura 1. Colmeias de *A. mellifera* no apiário experimental da Cidade das Abelhas, Florianópolis – SC.



8.2 PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS

Foram utilizados os fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®] recomendados para a cultura da macieira (MAPA, 2022). O fungicida Captan[®]SC é uma suspensão concentrada (SC) contendo 480 g/L de Captana (ingrediente ativo (I.A.)). Utilizou-se 0,75 ml de Captan[®]SC diluídos em 300 g de alimento, correspondendo a 1,2 mg I.A. por mL⁻¹ de calda, representando a concentração recomendada pelo fabricante para o uso no controle do patógeno *Venturia inaequalis* (Venturiales: Venturiaceae). O fungicida Zignal[®] é uma suspensão concentrada (SC) contendo 500 g/L de Fluazinam (I.A.). Utilizou-se 0,3 mL de Zignal[®] diluídos em 300 g de alimento, correspondendo a 0,5 mg I.A por mL⁻¹ de calda, sendo a concentração recomendada para o controle de *Panonychus ulmi* (KOCH, 1836) (Trombidiformes: Tetranychidae) e *V. inaequalis*.

8.3 PREPARO DO ALIMENTO OFERECIDO ÀS COLMEIAS

Durante os bioensaios, as colmeias receberam semanalmente 300 g de alimento, composto por 200 ml de xarope de açúcar (alimento energético) e 100 g de pólen multifloral (alimento proteico) (Figura 2). O alimento energético foi preparado utilizando açúcar cristal orgânico (5 Kg) e água (2 L). A mistura foi aquecida e, ao levantar fervura, 5g de ácido cítrico foi adicionado para conversão da sacarose em frutose e glicose, mantendo-se em fogo baixo por mais cinco minutos. O pólen ofertado às colmeias foi obtido a partir da instalação de coletores de pólen na entrada das caixas, sendo recolhido e pesado diariamente. Deste modo, a entrada de abelhas com pólen foi impedida e garantido que consumissem o alimento ofertado (Figura 2).

Figura 2. (A) Xarope de açúcar (alimento energético), (B) coletor de pólen na entrada da colmeia.



8.4 BIOENSAIOS

O bioensaio foi composto por quatro tratamentos, correspondentes às dietas alimentares, e três repetições, representadas pelas colmeias. Os tratamentos eram compostos por: controle, que recebeu 300 g alimento; Captan[®]SC, que recebeu 0,75 mL de produto comercial em 300 g de alimento; Zignal[®] que recebeu 0,3 mL do produto comercial em 300 g de alimento; e Mistura, que recebeu 0,3 mL de Zignal[®] e 0,75 mL de Captan[®]SC em 300 g de alimento, para avaliar o efeito da interação dos produtos nas colmeias. Os diferentes tratamentos alimentares foram fornecidos semanalmente às colmeias durante um mês, sendo ofertados por meio de alimentadores internos de cobertura. Após o período de exposição às dietas alimentares, as col-

meias foram monitoradas por 240 dias, sendo avaliadas com intervalos de 60 dias para as análises do comportamento higiênico, índice de infestação de *V. destructor* e força das colmeias, conforme especificado a seguir.

8.5 AVALIAÇÕES DO TEMPO PARA O COMPORTAMENTO HIGIÊNICO, INFESTAÇÃO POR *V. destructor* E FORÇA DAS COLMEIAS

As avaliações do comportamento higiênico (CH) e índice de infestação por *V. destructor* (IVD) foram realizadas em crias e adultas. Foi realizada uma avaliação antes da exposição das abelhas aos tratamentos e 60, 90, 180, e 240 dias após a exposição aos fungicidas. As avaliações da força das colmeias foram realizadas em quatro momentos. A primeira (tempo 0), antes da exposição das colmeias aos fungicidas; a segunda, 45 dias depois da exposição (tempo 1); a terceira, 135 dias após a exposição (tempo 2); e a quarta, 180 dias após a exposição (tempo 3).

8.6 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO HIGIÊNICO.

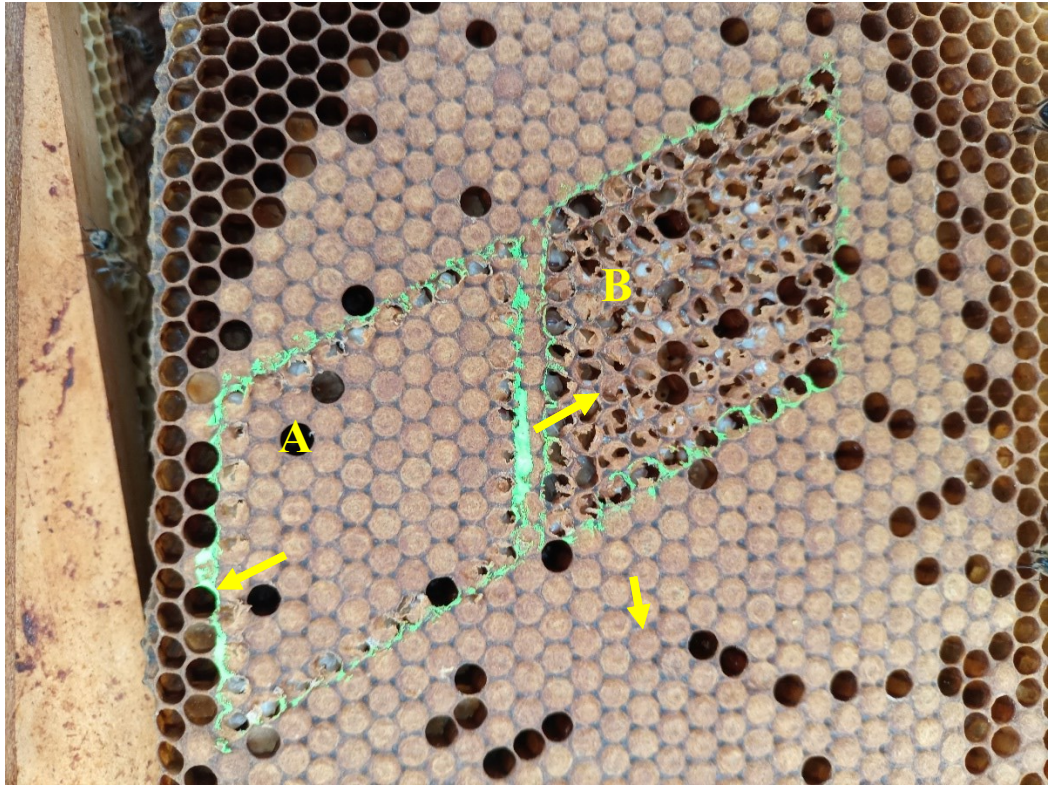
As avaliações do CH das abelhas foram realizadas utilizando o método descrito por Newton e Ostasiewski (1986) e modificado por Gramacho e Gonçalves (1994). Para isso, de cada colônia, foi retirado um quadro com crias operculadas com idade entre dez e quatorze dias. Em cada quadro foi delimitada duas áreas paralelas (tratamento e controle) com 100 células, onde foram contadas as células de cria operculadas, desoperculadas, com alimento e as vazias. Na área do tratamento, as crias foram perfuradas no centro dos opérculos pela introdução de um garfo desoperculador adaptado (Figura 3).

Figura 3. Perfuração da área tratada para o CH.



A área definida para a perfuração dos opérculos foi aquela que apresentou o menor número de crias vazias (Figura 4). Na área controle as células de cria operculadas ficaram intactas. Após a delimitação das áreas e a perfuração das células operculadas os quadros foram identificados e devolvidos as suas respectivas colmeias para que as abelhas operárias realizem a desoperculação e remoção das crias mortas das áreas controle e tratamento.

Figura 4. Quadro de crias para a avaliação do CH, com delimitação, lado (A) controle, células de crias intactas, lado (B) tratamento, células de crias perfuradas e setas amarelas indicam as celular abertas.



Após 24 horas os quadros foram retirados das colmeias e o número de células vazias das áreas de tratamento e controle foram novamente contadas. Para realização do cálculo da porcentagem do CH, foi utilizado o fator de correção “Z”. O fator de correção “Z” corresponde a taxa de limpeza natural do controle (remoção natural de crias), sendo calculado e descontado do valor das crias removidas na área tratamento, sendo obtido pela fórmula:

$$Z = \frac{Y}{A} * 100 \quad (1)$$

Onde:

- Z = Percentual (%) de células onde a cria operculadas foi removida naturalmente no controle.
- A = Número de células de cria operculadas no controle antes do teste de limpeza.
- Y = Número de células na qual a cria foi removida naturalmente no controle, sendo que para obtenção de Y empregou-se a fórmula:

$$Y = C - B \quad (2)$$

Onde:

- C = Número de células vazias na área controle após o favo ter sido submetido ao teste de limpeza.
- B = Número de células vazias na área do tratamento antes do favo ter sido submetido ao teste de limpeza.

O valor estimado para o CH da colmeia foi considerado somente quando o fator de correção “Z” da área controle foi igual ou menor que 10%. Caso ocorra uma remoção superior a 10% das células a repetição deve ser descartada, pois remoções acima de 10% podem estar associadas a outros fatores que não a perfuração, como doenças existentes na colônia (Machado, 2013). Para avaliar o CH foi utilizada a fórmula descrita por Gramacho & Gonçalves (1994):

$$CH = \frac{CH(\text{após}24h) - CH(0h)}{CO} * 100 - \text{Fator Z} \quad (3)$$

Onde:

- CH = Comportamento higiênico;
- CH (após 24h) = Número de células vazias 24 horas após a perfuração;
- CH (0h) = Número de células vazias antes da perfuração;
- CO = Número de células operculadas antes da perfuração
- Fator Z = Taxa de remoção de crias no controle (remoção natural).

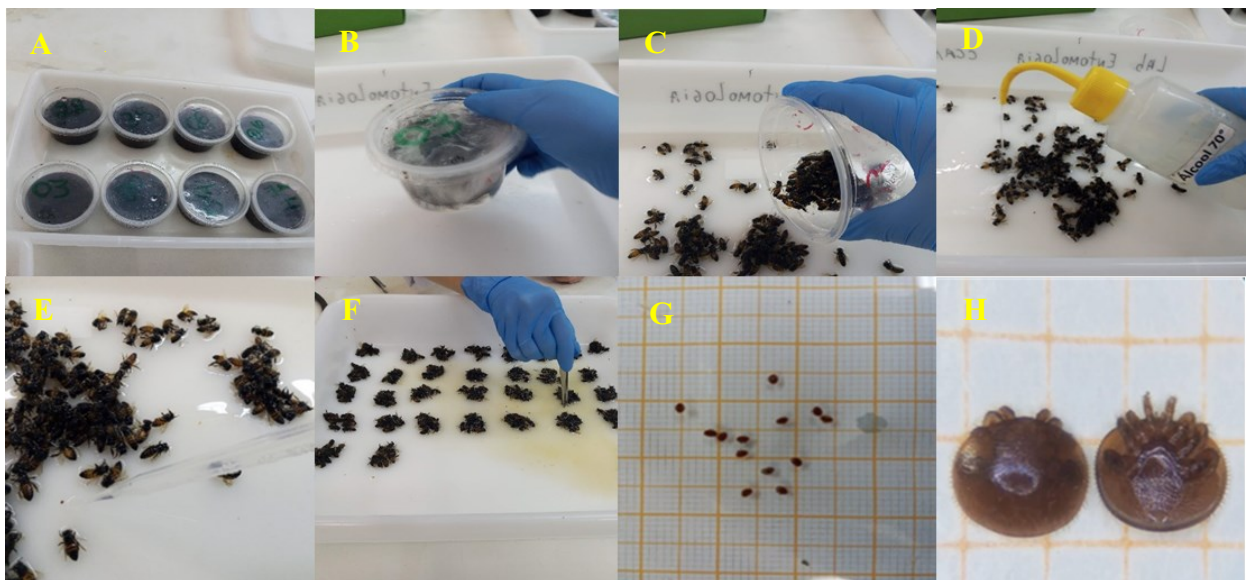
A partir dos resultados obtidos, as colmeias receberam diferentes classificações, sendo: não-higiênicas, quando a remoção de crias mortas for menor que 60%; intermediárias quando a remoção de crias mortas for entre 60,1 a 85% e altamente higiênicas, quando a remoção de crias mortas for superior a 85% (MASAQUIZA et al. 2021).

8.7 AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE INFESTAÇÃO POR *V. destructor* EM ABELHAS ADULTAS DE *A. mellifera*

As avaliações do nível de infestação pelo ácaro *V. destructor* em abelhas adultas foi realizada utilizando o método proposto por Dietemann et al., (2013). Para isso, foram coletadas com a ajuda de uma vassoura espanadora apícola, aproximadamente 300 abelhas de cada colmeia, presentes sobre três ou mais quadros diferentes e acondicionadas em recipientes contendo

álcool 70%, previamente identificados. As amostras foram levadas ao Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Santa Catarina - LABENTO, permanecendo em álcool 70% por 24 horas. Após esse período, o conteúdo dos frascos foi agitado por pelo menos três vezes para que fossem desprendidos os ácaros dos corpos das abelhas e despejado em bandejas de plástico branco para contagem de ácaros e abelhas (Figura 5).

Figura 5. (A) Amostras para quantificação de ácaros em abelhas adultas. (B) Movimentação das amostras por agitação mecânica manual. (C) Abelhas despejadas em bandeja branca para a contagem. (D) lavagem das amostras com álcool 70%. (E) Coleta dos ácaros. (F) Contagem das abelhas. (G) Contagem dos ácaros. (H) Fêmeas adultas de *V. destructor*.



Para estimar o nível de infestação de ácaros sobre abelhas adultas, os valores obtidos foram aplicados na seguinte fórmula:

$$TIA\% = \frac{NV}{NA} * 100 \quad (4)$$

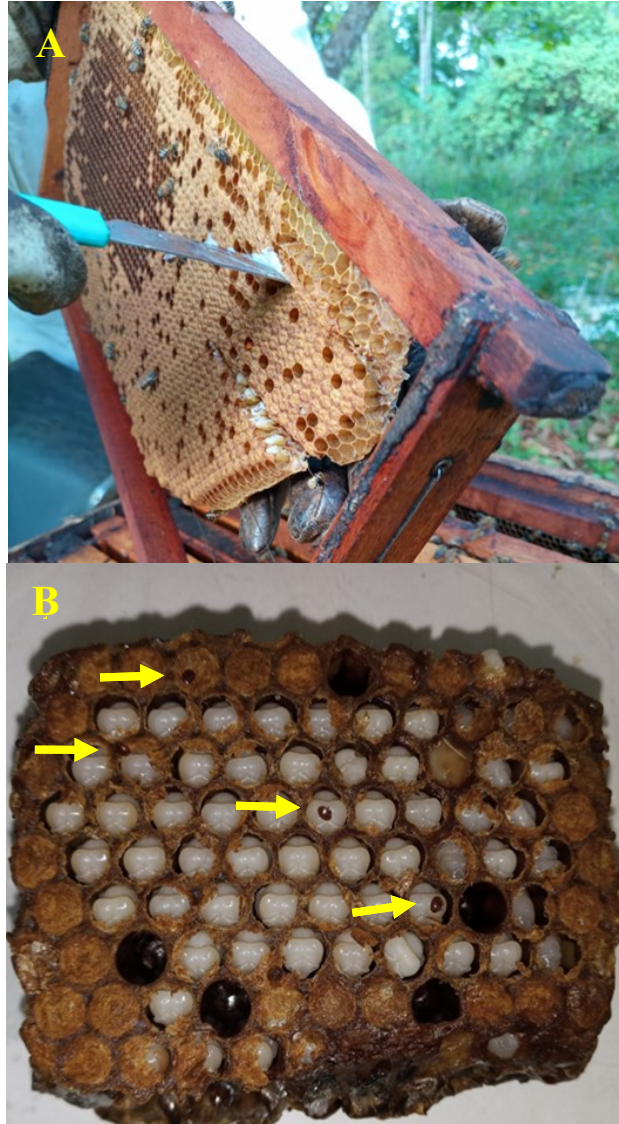
Onde:

- TIA%= Taxa de infestação por *V. destructor* em abelhas adultas.
- NV= Número de ácaros *V. destructor*.
- NA= Número de abelhas

8.8 AVALIAÇÃO DE INFESTAÇÃO POR *V. destructor* EM CRIAS DE *A. mellifera*

As avaliações do nível de infestação de *V. destructor* em crias de abelhas *A. mellifera* foi realizada utilizando o método proposto por De Jong e Gonçalves, (1981). Para isso foi coletado de cada colmeia um fragmento de favo com 50 crias operculadas na fase de pupas em ambos os lados (Figura 6). Os fragmentos coletados foram armazenados em sacos de papel devidamente identificados, transportados para laboratório e mantidos a 4° C até a avaliação. Com o auxílio de uma pinça, as células de crias foram desoperculadas para retiradas de 50 pupas de cada lado do favo totalizando 100 crias, para a contagem dos ácaros presentes em cada célula. Retiradas as pupas os favos foram postos sobre uma bandeja de plástico branco, onde cada célula de cria foi lavada com água, após a lavagem foram dadas leves batidas no favo para ajudar a remover os ácaros das células de crias.

Figura 6. (A) Corte de uma área com 50 crias fechadas para a contagem dos ácaros *V. destructor* em crias de *A. mellifera*. (B) Corte de crias desoperculadas para a contagem de *V. destructor*. Setas em amarelo indicando os ácaros.



Para estimar a taxa de infestação de ácaros sobre crias de abelhas foi utilizado a fórmula:

$$\text{TIC\%} = \frac{\text{NAa}}{\text{NCd}} * 100 \quad (5)$$

Onde:

- TIC%= Taxa de infestação por *V. destructor* em crias de abelhas.
- NAa= Números de ácaros adultos.
- NCd= Número de crias desoperculadas.

8.9 FORÇA DAS COLMEIAS

A força das colmeias foi avaliada de acordo com o método subjetivo proposto por Delaplane et al. (2013). Os parâmetros avaliados foram determinados pelo número de quadros: contendo abelhas adultas em ambos os lados; com área de ninhada aberta e fechada; contendo alimento armazenado. Esta avaliação consiste em estimar visualmente a área do quadro coberto com abelhas, ninhada aberta e fechada, mel e pólen de cada colmeia, realizada no início da manhã, por dois observadores humanos previamente treinados (Figura 7).

Figura 7. Análise da força das colmeias



Para cada parâmetro foi descrito e estimado sua porcentagem. As informações foram repassadas para um auxiliar que registrou as observações. Posteriormente, os valores das porcentagens dos parâmetros avaliados foram somados para se conhecer a força das colmeias.

8.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os tratamentos foram realizados em 12 colmeias, onde cada colmeia é uma população de abelhas e não em um único indivíduo, sendo assim às unidades amostrais não foram consideradas homogêneas por se tratar da variabilidade genética existente em uma população. Deste modo para que não haja interferência das variações nos resultados, foram realizadas coletas de dados antes e depois da aplicação dos fungicidas. A realização das análises estatísticas foi aplicada a partir da seguinte formula:

$$VE = VDT - VAT \quad (6)$$

Onde:

- VE = valores para a realização das análises estatísticas.
- VDT = valores coletados depois da aplicação dos tratamentos.
- VAT = valores coletados antes da aplicação dos tratamentos.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com os quatro tratamentos; controle, Captan[®]SC, Zignal[®], e a mistura e com as cinco análises de tempo. A média final foi obtida por meio das cinco análises consecutivas de tempo em cada tratamento, realizados em intervalos de 60 dias, sendo a primeira avaliação executada antes da exposição das colmeias aos tratamentos. As variáveis analisadas foram índice de comportamento higiênico e índice de infestação do ácaro *V. destructor* em operárias adultas e crias.

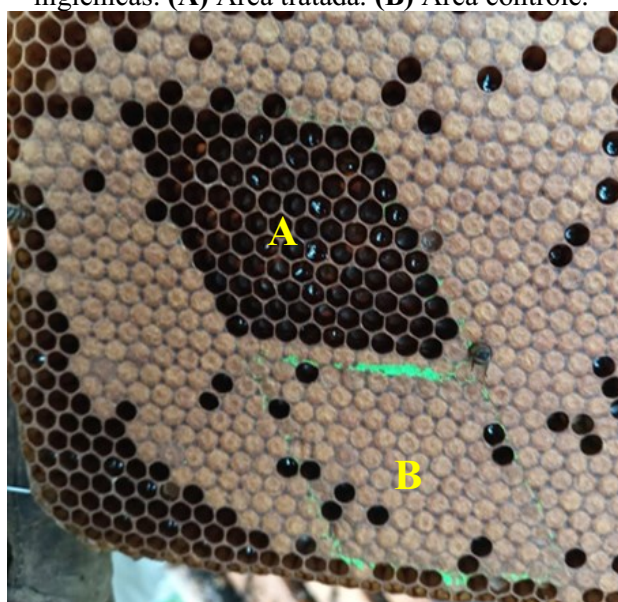
Após os resultados os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) por meio de modelos lineares generalizados (MLG). Quando ocorreu diferença significativa entre os tratamentos, foi utilizado o teste de comparações múltiplas para raqueamento das médias (Tukey, $p < 0,05$). As análises foram realizadas empregando-se o software estatístico Minitab (18.0). A associação ou a independência entre a exposição e a não exposição aos fungicidas foi testada para cada um dos quatro componentes da força das colmeias. Foram utilizadas tabelas de contingências e estimada a significância estatística dos valores dos desvios do teste de qui-quadrado (X^2).

9. RESULTADOS

9.1 COMPORTAMENTO HIGIÊNICO

Na avaliação do CH realizada antes da introdução dos tratamentos, as colmeias foram classificadas como altamente higiênicas, refletindo as características expressas por estas populações (Figura 8). O padrão do CH entre as colmeias apresentou variações após a administração das dietas alimentares de cada tratamento, com diferenças significativas sendo observadas 180 dias após a exposição (Tabela 1).

Figura 8. Avaliação do CH, indicando colmeias altamente higiênicas. (A) Área tratada. (B) Área controle.



Na primeira avaliação após a administração dos tratamentos, as colmeias foram reclassificadas como altamente higiênicas, com exceção do grupo Mistura, que teve uma queda de 18,4 % e foi classificada com o CH intermediário (Tabela 1). Nas avaliações seguintes, apenas uma colmeia deste tratamento apresentava área de cria operculada para realização do teste de CH. Deste modo, a ausência de variabilidade impediu a realização da análise estatística dos dados (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem média (\pm erro padrão) comportamento higiênico de colônias de *Apis mellifera* expostas, por contaminação de dieta alimentar, as concentrações de campo dos fungicidas Captan®SC, Zignal® e mistura (Captan® SC +Zignal®).

Tratamento	Dias após a exposição a dieta alimentar contaminada					F-valor	p-valor
	0	60	120	180	240		
Controle	89,3 (\pm 2,2)	92,2 (\pm 3,3)	96,2 (\pm 0,9)	86,0 (\pm 1,4) ab	93,6 (\pm 3,3)	2,98	0,08
Captan®SC ¹	86,9 (\pm 2,6) AB	92,0 (\pm 2,1) A	81,3 (\pm 10,2) AB	54,4 (\pm 11,0) B/b	72,1 (\pm 5,6) AB	3,92	0,04
Zignal® ²	93,3 (\pm 1,7)	95,1 (\pm 2,5)	91,2 (\pm 1,3)	91,3 (\pm 1,5) a	74,7 (\pm 12,5)	3,04	0,08
Mistura ³	89,8 (\pm 1,8)	73,3 (\pm 11,1) ⁴				2,15	0,22
F-valor	1,56	2,75	1,60	7,21	2,08		
p-valor	0,27	0,11	0,28	0,03	0,27		

¹ Captan® SC (1,2 mg Ingrediente Ativo (I.A.) por mL⁻¹ de calda);

² Zignal® (0,5 mg I.A por mL⁻¹ de calda);

³ Mistura (1,2 mg I.A. Captan® SC + 0,5 mg I.A. Zignal® por mL⁻¹ de calda).

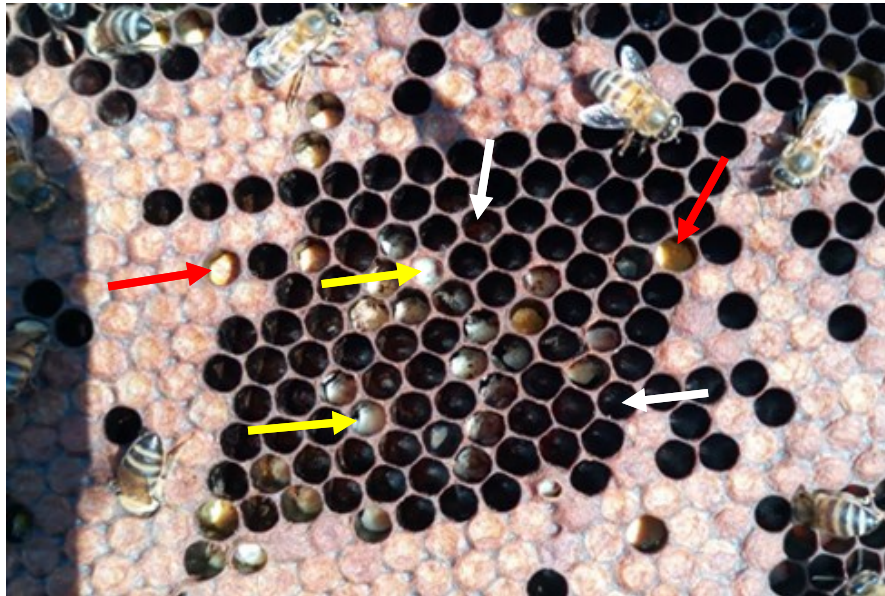
⁴ Os dados foram excluídos das análises com 120, 180 e 240 dias por não haver variabilidade.

⁵ Letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si por Tukey (p-valor<0,05).

Fonte: elaborado pelos autores

Na avaliação de 120 dias após o início dos bioensaios, os tratamentos não apresentaram diferenças no CH, onde as colmeias do tratamento Controle e Zignal® foram classificadas como altamente higiênica e Captan®SC como intermediárias (Tabela 1). Após 180 dias o tratamentos Zignal® diferiu do tratamento Captan®SC, nesta avaliação as colmeias do tratamento Captan®SC foram classificadas como não higiênica e apresentaram redução de 39,4 % no seu CH em relação a avaliação realizada aos 120 dias (Figura 9). Na avaliação realizada aos 240 dias, não foram observadas diferenças no CH entre os tratamentos. Apenas as colmeias Controle foram classificadas como altamente higiênicas, enquanto nos tratamentos Captan®SC e Zignal®, foram classificadas como intermediárias (Tabela 1).

Figura 9. Colmeia não higiênica. Setas em branco indicam células de cria “vazia”. Setas em amarelo indicam células com cria morta. Setas em vermelho indicam células com alimento.



9.2 ÍNDICE DE INFESTAÇÃO DE *V. destructor* EM ADULTOS E CRIAS DE *A. mellifera*

Na primeira avaliação (tempo 0), o índice de infestação em todas as colmeias estava abaixo de 5% em abelhas adultas. A infestação por *V. destructor* apresentou variações ao longo do tempo, com diferenças entre os tratamentos na primeira e terceira avaliação após a exposição (tempos 60 e 180), enquanto que nas crias, a diferença foi observada na última avaliação (tempo 240) (Tabela 2).

Tabela 2. Índice de infestação (%) de *V. destructor* (\pm EPM) em adultos e crias de *A. mellifera* oriundos de colônias expostas, por contaminação de dieta alimentar as concentrações de campo dos fungicidas Captan[®]SC, Zignal[®] e mistura (Captan[®]SC + Zignal[®]).

Tratamento em adultos	Dias após a exposição a dieta alimentar contaminada					F-valor	p-valor
	0	60	120	180	240		
Controle	1,8 (\pm 1,0)	2,5 (\pm 0,9)b	2,2 (\pm 0,8)	5,9 (\pm 1,0)b	5,8 (\pm 2,3)	3,18	0,07
Captan [®] SC ¹	3,1 (\pm 0,9)	3,5 (\pm 1,2)b	6,6 (\pm 2,6)	8,6 (\pm 1,3)ab	4,1 (\pm 0,1)	2,27	0,14
Zignal [®] ²	1,3 (\pm 1,3)B	11,2 (\pm 1,5)a/A	7,9(\pm 0,5)AB	14,1 (\pm 2,4)a/A	10,2(\pm 2,3)A	9,05	0,03
Mistura ³	2,3 (\pm 0,7)	6,3 (\pm 2,1)ab	3,6 (\pm 0,6)	4,2 (\pm 2,4)b	3,7 (\pm 2,1)	0,86	0,53
F-valor	0,63	6,86	2,92	5,72	2,37		
p-valor	0,61	0,01	0,11	0,03	0,21		

Tratamento em crias	Dias após a exposição a dieta alimentar contaminada					F-valor	p-valor
	0	60	120	180	240		
Controle	8,7 (\pm 6,7)	1,7 (\pm 1,2)	4,3 (\pm 1,9)	11,0 (\pm 6,7)	5,0 (\pm 0,0)b	0,65	0,64
Captan [®] SC ¹	4,7 (\pm 3,2)	4,3 (\pm 1,5)	9,7 (\pm 4,3)	35,3 (\pm 16,7)	11,0 (\pm 3,0)b	2,36	0,13
Zignal [®] ²	6,7 (\pm 6,7)	8,7 (\pm 2,9)	6,3 (\pm 3,0)	16,0 (\pm 0,0)	27,0 (\pm 3,0)a	3,58	0,06
Mistura ³	1,7 (\pm 0,3)	6,3 (\pm 2,0) ⁴				5,16	0,84
F-valor	0,36	2,20	0,70	1,24	21,56		
p-valor	0,78	0,17	0,53	0,36	0,02		

¹ Captan[®] SC (1,2 mg Ingrediente Ativo (I.A.) por mL⁻¹ de calda);

² Zignal[®] (0,5 mg I.A. por mL⁻¹ de calda);

³ Mistura (1,2 mg I.A. Captan[®] SC + 0,5 mg I.A. Zignal[®] por mL⁻¹ de calda).

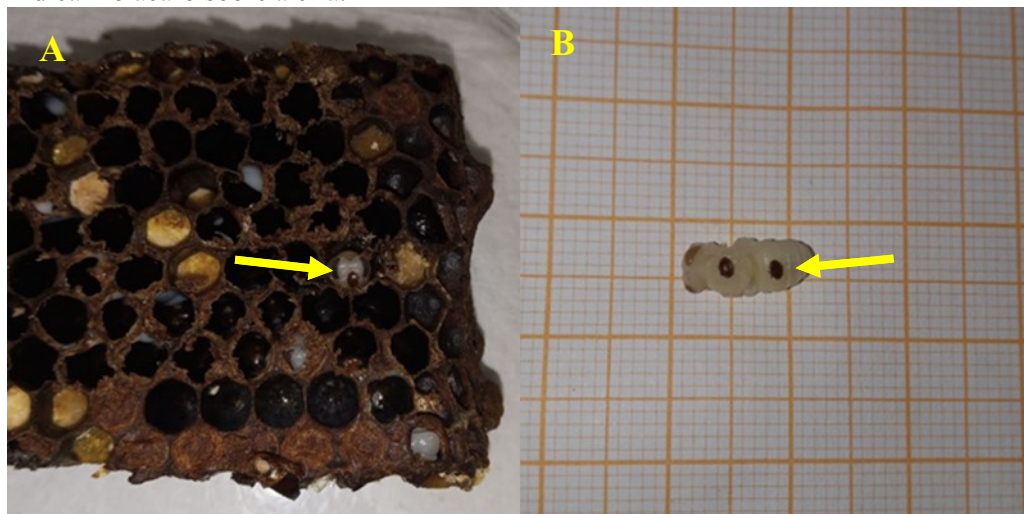
⁴ Os dados foram excluídos das análises com 120, 180 e 240 dias por não haver variabilidade.

⁵ Letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si por Tukey (p-valor<0,05).

Fonte: elaborado pelos autores

As colmeias expostas ao fungicida Zignal[®] mostraram-se mais comprometidas em relação ao índice de infestação, após o início dos bioensaios principalmente em adultos, foi observado aumento nas avaliações de 60 e 180 dias de 9,9 % e 12,8 %, respectivamente, quando comparadas com a taxa de infestação no tempo 0 (Tabela 2). Evidenciando um efeito do tratamento dependente do tempo, onde o tempo 240 diferiu sobre o tempo 0 em Zignal[®], assim como observado para o CH. Em crias, o aumento foi de 20,3 % na avaliação de 240 dias, em relação a primeira (Figura 10).

Figura 10. (A) Corte do favo com crias para análise de *Varroa*. (B) Setas em amarelo indicam o ácaro sobre a cria.



No tratamento mistura, não foi possível avaliar o índice de infestação em crias a partir de 120 dias após o início dos bioensaios devido a redução da área de cria, o que interferiu no índice de infestação em abelhas adultas, devido à baixa disponibilidade de local para reprodução dos ácaros. O índice médio de infestação nas colmeias do tratamento controle, nas avaliações de 180 e 240 dias, foi superior a 5%, o que provavelmente foi causado pela produção de células de zangão, observadas nas colmeias.

9.3 FORÇA DAS COLMEIAS

A exposição das colmeias aos diferentes tratamentos interferiu na população de abelhas adultas, área de cria e alimento estocado, com redução significativa destes parâmetros naquelas expostas ao tratamento mistura, que combinou os fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®] (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de qui-quadrado (χ^2) e a respectiva probabilidade (p) de comparação entre os tratamentos, para os parâmetros preditores de força das colmeias, 180 dias após as exposições (Ctrl: Controle; Cap: Captan[®]SC; Zig: Zignal[®] e Mis: Zignal[®] + Captan[®]SC).

Tratamentos	Parâmetros avaliados							
	População de abelhas adultas		Cria aberta		Cria fechada		Alimento estocado	
	χ^2	p valor	χ^2	p valor	χ^2	p valor	χ^2	p valor
Ctrl vs Cap	0.2048	0.9768	0.0216	0.9992	0.0576	0.9964	0.4514	0.9294
Ctrl vs Zig	0.0247	0.9999	0.1486	0.9854	0.0197	0.9993	0.3297	0.9543
Ctrl vs Mis	2.4356	0.4870	1.1293	0.7700	1.6456	0.6491	1.7803	0.6192
Cap vs Zig	0.1619	0.9835	0.1820	0.9804	0.0425	0.9977	0.2887	0.9621
Cap vs Mis	1.9020	0.5930	1.1827	0.7572	1.8144	0.6118	2.4467	0.4850
Zig vs Mis	2.0063	0.5711	1.2462	0.7419	1.6219	0.6544	2.1109	0.5497

Fonte: elaborado pelos autores

Nos parâmetros avaliados, os valores de χ^2 foram maiores para as colmeias expostas ao tratamento mistura quando comparadas aos demais tratamentos. Estes resultados indicam que a presença de ambos fungicidas na alimentação das abelhas, contribuiu significativamente para a redução da força das colmeias dependente do tempo, inclusive, causando a morte de uma delas antes do término dos bioensaios. Para este mesmo tratamento, não foi possível realizar avaliações de CH e IVD a partir de 120 dias após o início dos bioensaios, devido a drástica redução na área de cria, inviabilizando as análises.

10. DISCUSSÃO

Os fungicidas Captan[®]SC, Zignal[®] afetaram as colônias de *A. mellifera*. A exposição das colmeias ao alimento contendo Captan[®]SC, Zignal[®] isolados e em mistura, mostrou que as concentrações utilizadas para manejos fitossanitários das plantas causaram a queda no CH, aumento no índice de *V. destructor* e redução da força das colmeias. Nossos resultados contribuem para o entendimento dos efeitos adversos dos fungicidas sobre a complexidade de interações das colmeias que se assemelham aos reportados em estudos sobre inseticidas. A condução dos bioensaios em condições de campo permitiu identificar efeitos crônicos dependente do tempo semelhante ao observado em colmeias expostas a doses subletais de neonicotinoides (TENNEKES, SANCHEZ-BAYO 2012; SANDROCK et al., 2014).

A exposição das colmeias aos fungicidas ocasionou efeitos deletérios sobre o CH. Em *A. mellifera*, esse comportamento é uma característica hereditária (ROTHENBUHLER, 1964;

MORITZ, 1988) associada a capacidade das abelhas em reagir a estímulos olfatórios (MASTERMAM et al., 2000). Abelhas com idade entre 11 e 17 dias são capazes de identificar larvas e pupas mortas ou parasitadas (ARATHI et al., 2000), realizando a abertura da célula para a remoção da cria (MASTERMAM et al., 2000). É possível que a alteração do CH em abelhas expostas aos fungicidas esteja associada ao comprometimento da capacidade de reagir a odores. Herbicida a base de glifosato, acaricidas e inseticidas reduzem a resposta das abelhas no ensaio do reflexo de extensão da probóscide (GASHOUT et al., 2019; HERBERT et al., 2014; WILLIAMSON et al., 2013), comprometendo o CH (CARDOZO 2017; MORFIN et al., 2019; GASHOUT et al., 2019).

A exposição à mistura de fungicidas pode ter antecipado a atividade de forrageio. Essa antecipação pode ser atribuída ao envelhecimento precoce das glândulas hipofaríngeas, pois abelhas nutrizas expostas a herbicidas e fungicidas apresentaram alterações ultraestruturais e degeneração precoce nas glândulas hipofaríngeas, compatíveis com abelhas forrageiras (CHAVES, 2022; FAITA et al., 2018). Deste modo, é possível que a exposição das abelhas aos fungicidas tenha interferido na eficiência do CH tanto pelo prejuízo da sua capacidade olfativa, quanto pela antecipação da atividade de forrageio.

A população de *V. destructor* apresentou flutuação ao longo do tempo nas colmeias de todos os tratamentos. No início dos bioensaios, o índice de infestação em abelhas adultas estava abaixo de 5%, o que é considerado tolerável e incapaz de causar danos econômicos (HARRIS et al., 2016). No controle, os maiores índices de infestação ocorreram aos 180 e 240 dias após o início dos bioensaios. Estes índices coincidiram com o período da primavera, quando as colmeias estavam produzindo zangões. A presença de células de zangões e sua proporção em relação às células de operárias é relevante para regular o crescimento populacional de ácaros na colmeia, uma vez que os ácaros tem preferência por essas células (FRIES et al., 1994), sendo necessário medidas profiláticas quando 10 % ou mais dos zangões estiverem infestados (HARRIS et al., 2016).

Em colmeias expostas aos fungicidas, o aumento na população de *V. destructor* foi maior em colmeias que apresentaram redução no CH. O CH é um dos mecanismos de imunidade social que garante a homeostase da colmeia (LARSEN et al., 2019), auxiliando a controlar ácaro (BOECKING; DRESCHER 1992). As colmeias expostas aos fungicidas tiveram maior índice de infestação quando comparadas ao controle, tanto para abelhas adultas quanto para

crias. O tratamento Zignal[®] diferiu dos demais, apresentando os maiores índices de infestação por *V. destructor*, evidenciando um efeito do tratamento dependente do tempo.

Os danos causados por fungicidas sobre o sistema imunológico de abelhas não foram detalhadamente descritos. Entretanto, os danos ao sistema imunológico das abelhas já são conhecidos para inseticidas e herbicidas a base de glifosato (LEMAITRE; HOFFMANN 2007; DI PRISCO et al; 2013; ANNOSCIA et al., 2020). Inseticidas neonicotinoides afetam a sinalização de NF- κ B, um fator de transcrição que regula funções humorais e celulares em insetos (LEMAITRE; HOFFMANN 2007), suprimindo barreiras antivirais e promovendo a replicação do vírus da asa deformada (DI PRISCO et al; 2013). Estes inseticidas regulam negativamente a expressão do gene Amel102, responsável pela melanização e a encapsulamento de organismos no interior da hemocele (ANNOSCIA et al., 2020) e favorecem a proliferação de *V. destructor*, aumentando o IVD das colmeias (DI PRISCO et al., 2013; ALBURAKI et al., 2015; DIVELY et al 2015; MONCHANIN et al., 2019).

Os herbicidas a base de glifosato, por sua vez, reduzem a síntese da maior proteína da geleia real 3 (MRJP3) (FAITA et al., 2022), que desempenha importante função na imunidade social das colmeias, atuando sobre abelhas de diferentes idades e castas (MAORI et al., 2019b). Adicionalmente, por ser uma espécie eussocial, *A. mellifera* possui menor número de genes associados a imunidade (EVANS et al., 2006) e síntese de enzimas para desintoxicação (LARSEN et al., 2019). Deste modo, é possível que a exposição das abelhas aos fungicidas tenha prejudicado seu sistema imunológico, contribuindo para o aumento de *V. destructor*, conforme observado no presente estudo.

As colmeias expostas aos fungicidas apresentaram um declínio populacional. Este declínio pode indicar que Captan[®] SC e Zignal[®] interferem na força da colmeia, sendo este um efeito dependente do tempo e do tratamento. A redução na área de cria aberta e fechada foi mais evidente no tratamento mistura quando comparado aos fungicidas de forma isolada. A mistura pode indicar uma potencialização dos fungicidas quando combinados, caracterizado pelos maiores prejuízos às colmeias, como a redução da população de adultas, estoque de alimento e sobrevivência. Adicionalmente, quando expostas aos fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®], as abelhas *A. mellifera* apresentaram alterações ultraestruturais e degeneração precoce nas glândulas hiporingeanas (CHAVES et al., 2022). O comprometimento destas estruturas pode ter igualmente afetado as características da geleia real, a nutrição da rainha e da ninhada, com efeitos a

longo prazo sobre castas e gerações de abelhas (FAITA et. al, 2021), afetando diretamente a força das colmeias.

A força de uma colmeia é determinada pelo índice de população de adultos, área de cria aberta e fechada, além de alimento para sua manutenção (DELAPLANE, 2013). No entanto, a exposição aos agrotóxicos pode afetar estes parâmetros, causando o enfraquecimento das colmeias. Os fungicidas clorotalonil e propicanizol afetaram a força de colmeias de *A. mellifera*, promovendo redução no tamanho de rainhas e baixa produção de operárias (TRAYNOR et al., 2021). Colônias de *Bombus impatiens* expostas a clorotalonil tiveram redução significativa da população e prejuízo na produção de rainhas no outono (BERNAUER et al., 2015). Adicionalmente, colmeias expostas cronicamente a neonicotinoides tiveram redução de população, sendo incapazes de produzir rainhas (SANDROCK et al., 2014; TSVETKOV et al., 2017).

A ingestão de alimento contendo Captan[®]SC e Zignal[®], isolados e em mistura, comprometem a imunidade social e homeostase das colmeias. A redução da força das colmeias, pode ser compreendida como consequência da diminuição da área de cria e do número de operárias adultas, que acabam prejudicando a eficiência do CH e favoreceram o aumento do IVD. Os fungicidas são produtos fitossanitários, cuja a fórmula deveria afetar apenas fungos fitopatogênicos. No entanto, estudos vem demonstrando que eles causam prejuízos em organismos não alvo, como as abelhas. Considerando ainda que os fungicidas podem aumentar a toxicidade de inseticida formulados a base de piretróides em até 1000 vezes (PILLING; JEPSON, 1993), é possível que em um cenário realista, onde as abelhas são expostas a múltiplos agrotóxicos, a sanidade e força das colmeias sejam mais afetadas, comprometendo os serviços de polinização e produtos apícolas.

11. CONCLUSÃO

As colmeias expostas aos tratamento com os fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®] tiveram redução no CH, aumento do índice do ácaro *Varroa destructor* em abelhas adultas e crias e comprometimento na força da colmeia. No entanto os índices foram mais significativos no tratamento mistura, demonstrando redução da força e perda de colmeias. Isso demonstra que os fungicidas agiram ao longo do tempo nas colmeias, inviabilizando o desenvolvimento de novas crias e interrompendo o trabalho de abelhas adultas, demonstrando que quando combinados são mais perigosos para colmeia.

12. REFERÊNCIAS

- ABROL, D. P. Planned Honeybee Pollination for Crop Production. **Springer**, (2012). Disponível em: <link.springer.com/scihub.or/chapter/10.1007/978-94-007-1942_8>. Acesso em: 10-abril de 2022.
- ALAUX, C.; DANTEC, C.; PARRINELLO, H.; LE CONTE, Y. Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and *varroa*-parasitized bees. **BMC Genomics**, v.12, 2011. DOI: [10.1186/1471-2164-12-496](https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-496)
- ALBURAKI, M.; BOUTIN, S.; MERCIER P. L.; LOUBLIER Y. CHAGNON M. DEROME N. Neonicotinoid-Coated Zea mays Seeds Indirectly Affect Honeybee Performance and Pathogen Susceptibility in Field Trials. **PLoS One**. 2015 May 18;10(5):e0125790. doi: 10.1371/journal.pone.0125790. PMID: 25993642; PMCID: PMC4436261.
- ALMASRI, H.; TAVARES, D. A.; PIOZ, M.; SENÉ, D.; TCHAMITCHIAN, S.; COUSIN, M.; BRUNET, J. L.; BELZUNCES, L.P. (2020). Mixtures of an insecticide, a fungicide and a herbicide induce high toxicities and systemic physiological disturbances in winter *Apis mellifera* honey bees. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 203. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111013>
- ALMEIDA, C. H. S. (2017) Exposições subletais a pesticidas alteram comportamentos de abelhas a nível de indivíduos e de colônias Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
- ANNOSCIA, D.; DI PRISCO, G.; BECCHIMANZI, A.; CAPRIO, E.; FRIZZERA, F.; LINGUADOCA, A.; NAZZI, F.; PENNACCHIO, F. Neonicotinoid clothianidin reduces honey bee immune response and contributes to *Varroa* mite proliferation. **Nat. Commun.** 11 (1) (2020), p. 5887.
- ARATHI, H. S.; BURNS, I.; SPIVAK, M. Ethology of hygienic behaviour in the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): behavioral repertoire of hygienic bees. **Ethology**, v. 106, p. 365–379, 2000.
- BERNAUER, O. M.; GAINES-DAY, H. R.; STEFFAN, S. A. Colonies of Bumble Bees (*Bombus impatiens*) Produce Fewer Workers, Less Bee Biomass, and Have Smaller Mother Queens Following Fungicide Exposure. **Insects** 2015, 6, 478-488. <https://doi.org/10.3390/insects6020478>
- BIZOTTO, L. A.; SANTOS, R. S. S.; BOFF, M. I. C. Polinização dirigida. **Cultivar HF** (Pêlotas), v. 16, p. 32 – 35, (2018).
- BOECKING, O.; DRESCHER W. (1992) The removal response of *Apis mellifera* L colonies to brood in wax and plastic cells after artificial and natural infestation with *Varroa jacobsoni* Oud and to freeze-killed brood. **Exp & Appl Acarol** 16, 321-329
- BONETI, J. I. S.; KATSURAYAMA, Y.; BLEICHER, J. Doenças da macieira. In: A Cultura da Macieira. Florianópolis SC. Epagri, (2002), p. 527-555.

CARDOZO, M. M. Impactos do pólen de soja geneticamente modificada (Intacta RR2 PRO[®]) e do herbicida Roundap sobre colmeias de *Apis mellifera* L. orientador, Afonso Inácio Orth - Florianópolis, SC, 2017. 143 p.

CHAVES, A.; FAITA, M. R.; NODARI, O. R. Effects of fungicides on the ultrastructure of the hypopharyngeal glands and the strength of the hives of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Toxicology and Applied Pharmacology**. (2022). 116340, ISSN 0041-008X, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.116340>.

CIZELJ, I.; GLAVAN, G.; BOZIC, J.; OVEN, I.; MRAK, V.; NARAT, M. Prochloraz and coumaphos induce different gene expression patterns in three developmental stages of the Carniolan honey bee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 128, p. 68-75, (2016).

CRANE, E. (1978) Bibliography of Tropical Apiculture; also Satellite Bibliographies. International Bee Research Association: London.

DA ROSA, J. M.; ARIOLI, C. J.; BLOCHTEIN, B.; AGOSTINETTO, L.; GRUTZMACHER, A. D.; BOTTON, M. Diagnosis of directed pollination services in apple orchards in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v 40, p. 1-7, (2017). doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452018234>

DeGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. **Current Opinion in Insect Science**, v.10, p.170-176, 2015. DOI: 10.1016/j.cois.2015.05.007.

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y.; DEJONG, E.W. et al. Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. **Journal of Economic Entomology**. v.108, p. 2518-28, (2015).

DELAPLANE, K.; VAN DER STEEN, J.; GUZMAN-NOVOA, E. (2013). Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. **Journal of Apicultural Research**. 52. 10.3896/IBRA/1.52.1.03.

DI PRISCO, G.; CAVALIERE, V.; ANNOSCIA, D.; VARRICCHIO, P.; CAPRIO, E.; NAZZI, F.; GARGIULO, G.; PENNACCHIO, F. (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. Proceedings of the National **Academy of Sciences of the United States of America**. DOI: [10.1073/pnas.1314923110](https://doi.org/10.1073/pnas.1314923110)

DIVELY G. P.; EMBREY M. S.; KAMEL A.; HAWTHORNE D. J.; PETTIS J. S. Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony health. **PLoS One**. 2015 Mar 18; 10 (3):e0118748. doi: 10.1371/journal.pone.0118748. Erratum in: **PLoS One**. 2015; 10 (4):e0126043.

EVANS, J. D.; ARONSTEIN, K.; CHEN, Y. P.; HETRU, C.; IMLER, J. L.; JIANG, H.; KANOST, M.; THOMPSON, G. J.; ZOU, Z.; HULTMARK, D. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. **Insect Mol Biol.** 2006 Oct;15(5):645-56.

FAITA, M. R.; CHAVES, A.; CORRÊA, C. C. G.; SILVEIRA, V.; NODARI, R. O. (2022). Proteomic profiling of royal jelly produced by *Apis mellifera* L. exposed to food containing herbicide-based glyphosate. **Chemosphere**, 292, 133334.

FAITA, M. R.; CHAVES, A.; NODARI, R. O. (2021). A expansão do agronegócio: impactos nefastos do desmatamento, agrotóxicos e transgênicos nas abelhas. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**. V.57, 79-105 DOI:[10.5380/dma.v57i0.76157](https://doi.org/10.5380/dma.v57i0.76157)

FRIES, I.; CAMAZINE, S.; SNEYD, J. (1994) Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: a model and a review. **Bee World** 75: 5-28

GASHOUT, H. A.; GUZMAN-NOVOA, E.; GOODWIN, P. H.; CORREA-BENÍTEZ, A. (2019) Impact of sublethal exposure to synthetic and natural acaricides on honey bee (*Apis mellifera*) memory and expression of genes related to memory. **J. Insect Physiol.** 121, Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104014>.

GENERSCH, E.; OHE, W. V. D.; KAATZ, H.; SCHROEDER, A.; OTTEN, C.; BÜCHLER, R.; BERG, S.; RITTER, W.; MÜLHEN, W.; GISDER, S.; MEIXNER, M.; LIEBIG, G.; ROSENKRANZ, P. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honeybee colonies. **Apidologie**, v.41, p.332-352, 2010. DOI: 10.1051/apido/2010014

GRAMACHO, K. P.; GONÇALVES, L. S. Estudo comparativo dos métodos de congelamento e perfuração de crias para avaliação do comportamento higiênico em abelhas africanizadas. In: Congresso Latinoiberoamericano De Apicultura, 4. 1994. Anais. Cordoba - Argentina. p. 45, (1994).

GUERRA, J. C.; ISSA, M. R.; CARNEIRO, F. E.; STRAPAZZON, R.; MORETTO, G. RAPD Identification Of *Varroa destructor* genotypes in Brazil and other regions of the Americas. **Genet Mol Res.** (2010) Feb 23; 9 (1):303-8. doi: 10.4238/vol9-1gmr696. PMID: 20198586.

GULLEN, M. G.; THOMPSON, L. J.; CAROLAN, J. C.; STOUT, J. C.; STANLEY, D. A. Fungicides, herbicides and bees: A systematic review of existing research and methods. **Plos One**, v. 10, p. 1-17, (2019). Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225743>

HARRIS, V. C.; MEADOR, C. A.; SNYDER, L. A.; SCHWAN, M. R.; MAES, P.; JONES, B. M.; WALTON, A.; ANDERSON, K. E. Transcriptional, translational, and physiological signatures of undernourished honey bees (*Apis mellifera*) suggest a role for hormonal factors in hypopharyngeal gland degradation. **J Insect Physiol.** (2016) Feb; 85:65-75. doi: 10.1016/j.jinsphys.2015.11.016. Epub 2015 Dec 2. PMID: 26658137.

HERBERT, L. T.; VÁZQUEZ, D. E.; ARENAS, A.; FARINA, W. M. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. **J Exp Biol.** 2014 Oct 1; 217 (Pt 19):3457-64. doi: 10.1242/jeb.109520. Epub 2014 Jul 25. PMID: 25063858.

LARSEN, A.; REYNALDI, F. J.; GUZMÁN-NOVOA, E. (2019). Fundamentals of the Honey Bee (*Apis Mellifera*) Immune System. Review. **Rev Mex Cienc Pecu**, 10 (3), 705– 728.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. **Annu. Rev. Immunol.** 25, 697–743 (2007).

MAORI, E.; GARBIAN, Y.; KUNIK, V.; MOZES-KOCH, R.; MALKA, O.; KALEV, H.; SABBATH, N.; SELA, I.; SHAFIR, S. (2019b). A Transmissible RNA Pathway in Honey Bees. **Cell Rep.** 2019 May 14;27(7):1949-1959.e6. DOI: [10.1016/j.celrep.2019.04.073](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.073) Epub 2019 May 2. PMID: 31056439.

MASAQUIZA, D.; VARGAS J.; ORTÍZ, N.; SALAZAR, R.; CURBELO, L.; PÉREZ, A.; ARENAL, A. Hygienic Behavior of *Apis mellifera* and Its Relationship with *Varroa destructor* Infestation and Honey Production in the Central Highlands of Ecuador. **Insects.** (2021) Oct 25;12 (11):966. doi: [10.3390/insetos12110966](https://doi.org/10.3390/insetos12110966)

MONCHANIN, C.; HENRY, M.; DECOURTYE, A.; DALMON, A.; FORTINI, D.; BOEUF, E.; DUBUISSON, L.; AUPINEL, P.; CHEVALLEREAU, C.; PETIT, J.; FOURRIER, J. Hazard of a neonicotinoid insecticide on the homing flight of the honeybee depends on climatic conditions and *Varroa* infestation. **Chemosphere**, v. 224, págs. 360-368 Jun, (2019). DOI: [10.1016/j.chemosphere.2019.02.129](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.129)

MORFIN, N.; GOODWIN, P. H.; CORREA-BENITEZ, A.; GUZMAN-NOVOA, E. Sublethal exposure to clothianidin during the larval stage causes long-term impairment of hygienic and foraging behaviours of honey bees. **Apidologie** (2019), 50, 595–605

MORITZ, R. (1988). A Reevaluation of the Two-Locus Model for Hygienic Behavior in Honeybees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Heredity.** 79. [10.1093/oxfordjournals.jhered.a110506](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a110506).

MURILHAS, A.; CASACA, J. Conviver com a *Varroa* em Portugal. Um contributo para a adopção de boas práticas apícolas de convivência com a *Varroa*. Universidade de Évora, Portugal. 32p. (2004).

NETO E SILVA, O. A. B.; SILVEIRA M. B. M.; BISOGNIN G. M. Interação das lesões causadas pela sarna-da-macieira (*Venturia inaequalis*) na capacidade de infestação dos frutos por lagartas de *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). **Revista Brasileira de Fruticultura [online]**. 2011, v. 33, n. 4 [Acessado 14 Abril 2022], pp. 1350-1352. Epub 30 Jan 2012. ISSN 1806-9967. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000400036>.

PETRI, J. L.; SEZERINO, A. A.; MARTIN, M. S. de. Estado atual da cultura da macieira. Artigos exclusivos: maçã; (2018). Disponível em; <https://www.todafruta.com.br/wp-content/uploads/2018/03/MA%C3%87%C3%83.pdf>

KRETZSCHMAR, A. A.; RUFATO, L. Maçãs: O que você ainda não sabe sobre a atividade. **Revista Campo & Negócio.** Disponível em: <https://revistacampoenegocios.com.br/macass-que-voce-ainda-nao-sabe-sobre-a-atividade/>. Consultado em 11/04/2022. Acesso em 08/09/2020.

PETTIS, J. S.; LICHTENBERG, E. M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R.; VANENGELSDORP, D. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS One**. (2013) Jul 24; 8(7):e70182. doi: 10.1371/journal.pone.0070182 PMID: 23894612; PMCID: PMC3722151.

PILLING, E. D.; JEPSON, P. C. Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (*Apis mellifera*). **Pesticide Science** **39**, 293–297 (1993).

RAND, E. E DU; SMIT, S; BEUKES, M; APOSTOLIDES, Z; PIRK C. W. W.; NICOLSON, S. W. (2015). Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. **Sci. Rep.** 5: 1-11.

ROTHENBUHLER, W. C. (1964a) Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. **Anim. Behav.** 12, 578-583

ROTHENBUHLER, W. C. (1964b) Behaviour genetics of nest cleaning honey bees. IV. Responses of Fi and backcross generations to disease-killed brood. **Am. Zool.** 4, 111-123

SALOMÉ, J. A. (2014). Polinização dirigida em pomares de macieiras (*Malus doméstica* Borkh) com o uso de colmeias de *Apis mellifera* L. 137 p. Thesis (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SANDROCK, C.; TANADINI, M.; TANADINI, L. G.; FAUSER-MISLIN, A.; POTTS, S. G.; NEUMANN, P. Impact of chronic neonicotinoid exposure on honeybee colony performance and queen supersedure. **PLoS One**. 2014 Aug 1;9(8):e103592. doi: 10.1371/journal.pone.0103592. PMID: 25084279; PMCID: PMC4118897.

SCARIOT, F. J.; JAHN, L.; DELAMARE, A. P. L.; ECHEVERRIGARAY, S., Necrotic and apoptotic cell death induced by Captan on *Saccharomyces cerevisiae*. **World J Microbiol Biotechnol** **33**, 159 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2325-3>

SCHAFASCHEK, T. P.; HICKEL, E. R.; OLIVEIRA, C. A. L.; TOLEDO, V. A. A. Infestation and Reproduction of *Varroa destructor* Anderson and Trueman and Hygienic Behavior in Colonies of *Apis mellifera* L. (Africanized Honeybee) with Queens of Dierent Genetic Origins. **Sociobiology**, v. 66, n.3, p.448-456, (2019).

SILVA, L. A. D. (2021). Comportamento higiênico como resposta ao ácaro *Varroa destructor* em abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) no semiárido brasileiro. Dissertação, mestrado. Universidade Federal Rural do Semiárido, Programa de Pós-graduação.

TADEI, R.; DOMINGUES, C. E. C.; MALAQUIAS, J. B. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Sci Rep** 9, 3277 (2019) <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39383-z>

TARNO, H.; WICAKSONO, K. P.; BEGLIOMINI, E. Floral Stimulation and Behavior of Insect Pollinators Affected by Pyraclostrobin on Arabica Coffee. **AGRIVITA, Journal of Agricultural Science**, [S.l.], v. 40, n. 1, p. 161-167, dec. 2017. ISSN 2477-8516. Available at: <<https://agrivita.ub.ac.id/index.php/agrivita/article/view/1719>>.

TENNEKES, H.; SÁNCHEZ-BAYO, F. (2013). The molecular basis of simple relationships between exposure concentration and toxic effects with time. **Toxicology**. 309. 39-51. 10.1016/j.tox.2013.04.007.

TRAYNOR, K. S.; MONDET, F.; DE MIRANDA J. R.; TECHER, M.; KOWALLIK, V.; ODDIE, MAY.; CHANTAWANNAKUL, P. *Varroa destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey bees Worldwide. **Preprints** 2020, 2020020374 (doi: 10.20944/preprints202002.0374.v2).

TRAYNOR, K. S.; VANENGELSDORP D.; LAMAS Z. S. Social disruption: Sublethal pesticides in pollen lead to *Apis mellifera* queen events and brood loss. **Ecotoxicol Environ Saf**. May; 214:112105. Epub (2021) Mar 6. PMID:33690003. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2021.112105](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112105)

TSVETKOV, N.; SAMSON-ROBERT O.; SOOD, K.; PATEL, H. S.; MALENA, D. A.; GAJIWALA, P. H.; MACIUKIEWICZ, P.; FOURNIER, V.; ZAYED, A. Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. **Science**. (2017) Jun 30;356(6345):1395-1397. doi: 10.1126/science.aam7470. PMID: 28663503.

WIESE, H.; SALOMÉ, A. J. Nova Apicultua. ed. Guaíba; Agrolivros, (2020). 544 p. (E-book)

WILLIAMSON, S. M.; WRIGHT, G. A. Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. **J. Exp. Biol**. 2013, 216, 1799–1807.

ZALUSKI, R.; BITTARELLO, A. C.; VIEIRA, J. C. S.; BRAGA, C. P.; PADILHA, P. M.; FERNANDES, M. D. S.; BOVI, T. S.; ORSI, R. O. Modification of the head proteome of nurse honeybees (*Apis mellifera*) exposed to field-relevant doses of pesticides. **Sci Rep**. 2020 Feb 10; 10 (1): 2019. Erratum in: Sci Rep. 2020 Apr 7;10(1):6253. PMID: 32042077; PMCID: PMC7010795. doi.org/10.1038/s41598-020-59070-8

ZIOGA, E.; KELLY, R.; WHITE, B.; STOUT, J. C. Plant protection product residues in plant pollen and nectar: A review of current knowledge. **Environmental Research**, v. 189, p. 1-16, (2020).

CAPITULO III
EFEITOS DOS FUNGICIDAS CAPTAN[®]SC E ZIGNAL[®] NO NIVEL DE INFECÇÃO
POR *Vairimorpha spp.* EM *Apis mellifera* LINNAEU (HYMENOPTERA: APIDAE)

RESUMO

Colmeias de *Apis mellifera* são acometidas por vários patógenos, dentre esses estão os microsporídios de *Vairimorpha* spp. agente causador da nosemose. Doença considerada uma das mais importantes para a apicultura, pois *A. mellifera* é o principal polinizador na polinização dirigida de macieiras. Na floração devido a doenças fungicas, são utilizados produtos fitossanitários, como os fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®] como medida defensiva a esses patógenos. Deste modo, diante da lacuna sobre os efeitos de fungicidas nesses polinizadores, o objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência e incidência de *Vairimorpha* spp em *A. mellifera* expostas aos fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®], utilizados em pomares de macieiras. O bioensaio foi composto por quatro tratamentos, com três repetições, representadas pelas colmeias. Cada colmeia foi exposta a dietas alimentares correspondentes aos tratamentos: Controle, Captan[®]SC, Zignal[®] e Mistura. As colmeias foram avaliadas nos tempos 0, 60, 90, 180, e 240 dias, quanto a prevalência e incidência de *Vairimorpha* spp em *A. mellifera*. A análise da prevalência para *Vairimorpha* spp. indicou que os tratamentos e o tempo interferiram no número de abelhas infectadas. Para os tratamentos, foi observada diferença significativa 120 dias após a exposição entre os tratamentos Zignal[®] e Mistura. Para o tempo, observou-se diferença 60 dias após a exposição nos tratamentos Captan[®]SC e Mistura. Os fungicidas utilizados na cultura da macieira Captan[®]SC e Zignal[®] influenciaram na dinâmica da incidência de *Vairimorpha* spp em *A. mellifera*, onde os tratamentos tiveram quantidade menor de abelhas contaminadas, principalmente na mistura dos fungicidas, demonstrando a potencialização desses produtos.

Palavras-chave: Polinizadores, efeitos subletais, sanidade apícola, nosemose, microsporídio.

ABSTRACT

Apis mellifera hives are affected by many pathogens, which include *Vairimorpha* spp. microsporidia, the causing agent of nosemosis. This disease is considered one of the most important for beekeeping since *A. mellifera* is the main pollinator in the directed pollination of apple trees. In the flowering period, due to fungal diseases, phytosanitary products such as Captan®SC and Zignal® fungicides are used as a defensive measure against these pathogens. Thus, given the lack of information on the effects of fungicides on these pollinators, this study aimed to evaluate the prevalence and incidence of *Vairimorpha* spp in *A. mellifera* exposed to Captan®SC and Zignal® fungicides used in apple orchards. The bioassay consisted of four treatments, with three replications, represented by the hives. Each hive was exposed to food diets corresponding to the treatments: Control, Captan®SC, Zignal® and Mixture. The hives were evaluated at 0, 60, 90, 180, and 240 days for prevalence and incidence of *Vairimorpha* spp in *A. mellifera*. Prevalence analysis for *Vairimorpha* spp. showed that treatments and time interfered with the number of infected bees. For treatments, a significant difference was observed 120 days following exposure between the Zignal® and Mixture treatments. For time, the difference was noticed 60 days following exposure between Captan®SC and Mixture. The fungicides used in apple tree crops, Captan®SC and Zignal®, influenced the dynamics of the incidence of *Vairimorpha* spp in *A. mellifera*, where the treatments had fewer contaminated bees, especially in the mixture of fungicides, demonstrating the power of these products.

Keywords: Pollinators, sublethal effects, bee health, nosemosis, microsporidia.

13. INTRODUÇÃO

A nosebose é uma das doenças mais importantes para a apicultura mundial (PORRINI et al. 2020). É causada por microsporídios do gênero *Vairimorpha* e ataca abelhas *Apis mellifera* Linnaeu (Hymenoptera: Apidae), (CAVALIER-SMITH, 1998; TOKAREV et al., 2020). Entre os microsporídios existentes, apenas três são capazes de infectar *A. mellifera*, sendo *Vairimorpha apis*, *Vairimorpha ceranae* (FRIES et al. 1996; HIGES et al., 2006; HUANG et al., 2007; TOKAREV et al., 2020) e *Vairimorpha neumanni* (CHEMUROT et al., 2017; SUIBORSKA et al. 2019). Estes microorganismos são parasitas intracelulares obrigatórios das células intestinais de abelhas adultas (FRANZEN; MÜLLER, 1999). Ao parasitarem *A. mellifera*, estes microsporídeos causam infecção intestinal sistêmica grave, com impacto negativo direto na força e produtividade da colmeia (De GRAAF et al., 1994; MAYACK; NAUG, 2009; HIGES et al., 2010)

A nosebose inicia com a ingestão de esporos que pode ocorrer durante a trofalaxia, no momento da limpeza dos pelos e da colmeia (SMITH, 2012) ou ainda estarem presentes no alimento (MACINNIS et al., 2020). As operárias de *A. mellifera* são as mais suscetíveis as infecções causadas pelos microsporídios de *Vairimorpha* spp. (PERNAL, 2012). Alterações metabólicas são ocasionadas por esse patógeno, como, a redução de proteínas pela diminuição do tecido das glândulas hipofaríngeas (WANG; MOFLER, 1970) e alteração na constituição da hemolinfa ao nível de ácidos graxos, comprometendo a vida útil das abelhas (ANTUNEZ et al., 2009).

A interação de *Vairimorpha* spp. com diferentes estressores, como, pesticidas, pode auxiliar no aumento da mortalidade de abelhas e colmeias de *A. mellifera* (GOULSON et al., 2015). Os resíduos desses produtos encontrados no pólen e néctar coletados pelas abelhas forrageiras (MALASPINA et al., 2008; CODLING et al., 2018; TONG et al., 2018) causam efeitos deletérios em adultos de *A. mellifera*, aumentando a suscetibilidade a infecções por patógenos (DI PRISCO et al., 2013) ou infestação por *Vairimorpha* spp. (ALAUX et al., 2010).

Agrotóxicos utilizados em culturas como a da macieira podem comprometer colônias de *A. mellifera* aumentando o índice de *Vairimorpha* spp (FAITA et al., 2020). Segundo Pettis et al. (2013) a infecção por *Vairimorpha* spp. em abelhas alimentadas com pólen contendo resíduo de fungicidas e inseticidas foi maior, à medida que a quantidade de resíduo aumentou na dieta polínica das abelhas. Nesse contexto, estudos relacionados a interação de fungicidas e

índice de *Vairimorpha* spp. em colmeias de *A. mellifera* são escassos na literatura. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência e incidência de *Vairimorpha* spp em *A. mellifera* expostas aos fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®], utilizados em pomares de macieiras.

14. MATERIAL E MÉTODOS

14.1 APIÁRIO

O experimento foi conduzido em apiário experimental da Cidade das Abelhas, localizado na Ilha de Santa Catarina, Brasil (27°32'13.2'' S; 48°30'09.5''O). O clima é classificado como Cfa (Classificação climática de Köppen-Geiger), mesotérmico úmido, com verões quentes e chuvas distribuídas durante o ano e temperatura média anual 21,15 °C (ROCHA et al., 1993). A área experimental é circundada por uma unidade de conservação ambiental (4,92 Km²), não sendo permitido o uso agrícola e emprego de agrotóxicos em um raio de até 10 km da área experimental. As colônias de *A. mellifera* foram mantidas em caixas do tipo Langstroth com dez quadros cada, sendo manejadas de julho de 2020 a março de 2021, para padronização quanto a postura da rainha, quantidade populacional de abelhas adultas, área de cria e alimento estocado, de acordo com o método subjetivo de Delaplane et al. (2013). Adicionalmente, foram realizados manejos sanitários para controle de parasitas e patógenos, a partir do uso de fitas de ácido oxálico 60 dias antes do início dos bioensaios.

14.2 PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS

Foram utilizados os fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®] recomendados para a cultura da macieira (MAPA, 2022). O fungicida Captan[®]SC é uma suspensão concentrada (SC) contendo 480 g/L de Captana (ingrediente ativo (I.A.)). Utilizou-se 0,75 mL de Captan[®]SC diluídos em 300 g de alimento, correspondendo a 1,2 mg I.A. por mL⁻¹ de calda, representando a concentração recomendada pelo fabricante para o uso no controle do patógeno *Venturia inaequalis* (Venturiales: Venturiaceae). O fungicida Zignal[®] é uma suspensão concentrada (SC) contendo 500 g/L de Fluazinam (I.A). Utilizou-se 0,3 mL de Zignal[®] diluídos em 300 g de alimento, correspondendo a 0,5 mg I.A por mL⁻¹ de calda, sendo a concentração recomendada para o controle do ácaro *Panonychus ulmi* (KOCH, 1836) (Trombidiformes: Tetranychidae) e *V. inaequalis*.

14.3 PREPARO DO ALIMENTO OFERECIDO ÀS COLMEIAS

Durante os bioensaios, as colmeias receberam semanalmente 300 g de alimento, composto por 200 mL de xarope de açúcar (alimento energético) e 100 g de pólen multifloral (alimento proteico). O alimento energético foi preparado utilizando açúcar cristal orgânico (5 Kg) e água (2 L). A mistura foi aquecida e, ao levantar fervura, 5g de ácido cítrico foi adicionado para conversão da sacarose em frutose e glicose, mantendo-se em fogo baixo por mais cinco minutos. O pólen ofertado às colmeias foi obtido a partir da instalação de coletores de pólen na entrada das caixas, sendo recolhido e pesado diariamente. Deste modo, a entrada de abelhas com pólen foi restringida, permitindo o consumo do alimento ofertado.

14.4 BIOENSAIO

Para avaliar o efeito da interação dos produtos nas colmeias foram empregados quatro tratamentos, correspondentes às dietas alimentares, e três repetições, representadas pelas colmeias. Os tratamentos eram compostos por: controle, que recebeu 300 g alimento; Captan[®], que recebeu 0,75 mL de produto comercial em 300 g de alimento; Zignal[®] que recebeu 0,3 mL do produto comercial em 300 g de alimento; e Mistura, que recebeu 0,3 mL de Zignal[®] e 0,75 mL de Captan[®] SC em 300 g de alimento. Os diferentes tratamentos alimentares foram fornecidos semanalmente às colmeias durante um mês, sendo ofertados por meio de alimentadores internos de cobertura. Após o período de exposição às dietas alimentares, as colmeias foram avaliadas em tempos distintos (0, 60, 90, 180, e 240 dias). A primeira avaliação ocorreu antes do início dos bioensaios e as demais, após a exposição das abelhas aos tratamentos.

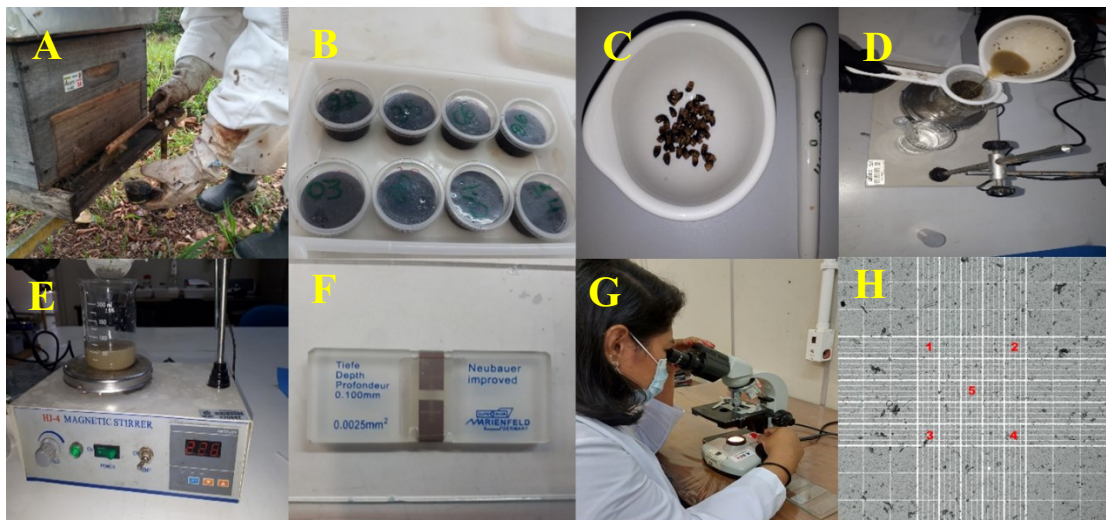
15. AVALIAÇÃO

15.1 DETERMINAÇÕES DA INFECÇÃO POR *Vairimorpha* spp.

O nível de infecção de *Vairimorpha* spp. foi avaliado em abelhas adultas por meio do método proposto por Fries et al. (2013). Para isso as entradas das colmeias foram fechadas em dias ensolarados com temperatura acima de 20°C para não permitir a entrada ou saída de abelhas (Figura 11). Quando as campeiras regressavam, acumulavam-se na entrada da colônia, sendo coletados aproximadamente 100 indivíduos, com a ajuda de uma vassoura apícola. Estes insetos foram armazenados em recipientes devidamente identificados contendo álcool 70% e transportados ao laboratório para estimar o nível de infecção por *Vairimorpha* spp.

Em laboratório, as abelhas permaneceram em álcool 70% por 24 horas. Após este período, 60 abelhas tiveram seus abdomens seccionados sem que fossem comprimidos. Posteriormente, os abdomens foram macerados em um cadinho de porcelana com 20 mililitros de água destilada até formar uma massa homogênea. Este macerado foi filtrado com ajuda de uma peneira, para que restassem somente os tecidos maiores, sendo adicionado 40 mililitros de água destilada sobre os restos de tecidos que ficaram na peneira. O conteúdo foi novamente macerado para que o maior número de esporos passe para a solução. A solução resultante do macerado foi colocada em um agitador por 1 min, para que os esporos ficassem distribuídos de forma homogênea. A contagem dos esporos foi realizada em uma câmara de Neubauer, em microscópio óptico com aumento de 40×.

Figura 11. (A) Coleta das operárias forrageiras. (B) Amostras de operárias coletadas. (C) Abdomens seccionados de operárias para maceração. (D) Líquido resultado da maceração dos 60 abdomens. (E) Líquidos sendo homogeneizado. (F) Câmara de Neubauer. (G) Observação dos esporos em microscópio. (H) Contagem dos quadrantes 1, 2, 3, 4 e 5 com esporos em câmara de Neubauer.



A abundância para cinco quadrantes do hemocitômetro (quadro das esquinas e um no centro) foi obtida por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Abundância} = \frac{NE}{NA} = NEC * 50.000 \quad (1)$$

Onde:

- NE = Números de esporos.

- NA= Números de abelhas.
- NEC= Números de esporos contados.

Quando foi observado menos de 1 esporo por quadrantes pequeno, foram contados todos os 25 quadrantes grandes. Neste caso, a abundância foi obtida por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Abundância} = \frac{NE}{NA} = NEC * 10.000 \quad (2)$$

Onde:

- NE = Números de esporos.
- NA= Números de abelhas.
- NEC= Números de esporos contados.

A prevalência de cada amostra foi adquirida a partir de uma subamostra de 20 abelhas de cada colmeia. Seus intestinos foram individualmente, puxando-os pelo ferrão, onde foram, macerados em 0,5 mililitros de água destilada com o auxílio de uma pinça na própria lâmina. Posteriormente foi coberto por uma lamínula e observados os esporos em microscópio óptico com aumento de 40×.

16. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os tratamentos foram realizados em 12 colmeias, onde cada colmeia é uma população de abelhas e não em um único indivíduo, sendo assim às unidades amostrais não foram consideradas homogêneas devido a variabilidade genética existente em uma população, devido a copula da rainha com vários zangões. Deste modo para que não haja interferência das variações nos resultados, foi realizada coletas de dados antes e depois da aplicação dos fungicidas. A realização das análises estatística foi aplicada a partir da seguinte formula:

$$VE = VDT - VAT \quad (3)$$

Onde:

- VE = valores para a realização das análises estatísticas.
- VDT = valores coletados depois da aplicação dos tratamentos.
- VAT = valores coletados antes da aplicação dos tratamentos.

A média final foi obtida por meio de cinco avaliações consecutivos, realizados em intervalos de 60 dias a partir da primeira exposição das abelhas aos tratamentos, sendo a primeira avaliação executada antes da exposição aos fungicidas. A variável analisada foi o índice

de *Vairimorpha* spp. em abelhas adultas de *A. mellifera*, os resultados foram submetidos a um teste de normalidade de resíduos e homogeneidade de variâncias.

17. RESULTADO

As colmeias de *A. mellifera* expostas a alimentação contendo Captan[®]SC e Zignal[®], isolados e mistura, apresentaram variações no índice de infestação por *Vairimorpha* spp., indicado que os fungicidas afetaram a sanidade das abelhas ao longo do tempo analisado. A análise para prevalência de *Vairimorpha* spp. indicou que os tratamentos e o tempo interferiram no número de abelhas infectadas. O tratamento, Zignal[®] diferiu entre a Mistura no tempo 120, após a exposição. Para o tempo, observou-se diferença 60 dias, após a exposição entre os tratamentos Captan[®]SC e Mistura. A mistura dos fungicidas foi o único tratamentos que diferiu entre os tempos e tratamentos analisados (Tabela 4).

Tabela 4. Percentual de *Apis mellifera* infectadas com esporos de *Vairimorpha* spp., a partir do teste de prevalência, dos tratamentos Captan[®] SC, Zignal[®] e mistura (de Captan[®] SC + Zignal[®]), coletadas em diferentes tempos, após o início dos bioensaios.

Tratamento	Dias após a exposição a dieta alimentar contaminada					F-valor	p-valor
	0	60	120	180	240		
Controle	8.67	14.33	6.67ab	6.33	2.00	2.21	0.15
Captan [®] SC	4.67B	13.33A	5.33ab/AB	6.33AB	3.00B	5.08	0.02
Zignal [®]	7.33	10.33	2.33b	6.67	8.00	1.66	0.24
Mistura	5.67B	13.33A	10.00a/BA	5.50B	4.50B	4.40	0.04
F-valor	0.28	0.76	4.56	0.06	2.69		
p-valor	0.84	0.55	0.04	0.98	0.18		

Letras distintas, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si por Tukey (p-valor<0,05).
Fonte: elaborado pelos autores

Mesmo com menor número de abelhas infectadas (teste de prevalência), a carga de esporos encontradas nestes insetos indica uma alta infestação (teste de intensidade), demonstrando que o tempo foi significativo para o aumento dos esporos (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito de fungicidas e tempo de exposição sobre o número médio de esporos de *Vairimorpha* sp em *Apis mellifera* expostas via alimento contaminado a 0,75 mL de Captan® SC, 0,3 mL de Zignal® e mistura (0,75 mL de Captan® SC + 0,3 mL de Zignal®).

Fonte de variação	gl	F	p-valor
Fungicidas	3	0,72	0.548
Tempo	4	3,66	0,014
Fungicidas × Tempo	12	0.32	0.980
Erro	34	-	-

Fonte: elaborado pelos autores

As maiores intensidade de esporos foram evidenciadas nos tratamentos Captan®SC e Mistura ao final dos bioensaios. No tratamento Captan®SC o número de esporos após 180 dias da exposição era de 12 milhões passando para 42 milhões esporos na avaliação realizada após 240 dias da exposição. A intensidade foi mais severa nas colmeias do tratamento mistura, onde, a análise após 180 dias da exposição indicou um número de esporos de 10 milhões, passando para 63 milhões esporos após 240 dias da exposição, ocorrendo um aumento 5 vezes no número de microsporídios de *Vairimorpha* spp. A intensidade da infecção por microsporídios de *Vairimorpha* spp. em abelhas forrageiras não foi significativo para nenhum das avaliações no tempo ou tratamentos (Tabela 6).

Tabela 6. Número médio de esporos de *Vairimorpha* spp em *Apis mellifera* expostas via alimento contaminado a 0,75 mL de Captan®SC, 0,3 mL de Zignal® e mistura (0,75 mL de Captan®SC + 0,3 mL de Zignal®) após 0, 60, 120, 180 e 240 dias da exposição.

Tratamento	Dias após a exposição a dieta alimentar contaminada					F-valor	p-valor
	0	60	120	180	240		
Controle	22.500.000	27.777.778	12.777.778	9.705.556	41.666.667	1,01	0,45
Captan®SC	15.111.111	12.305.556	23.611.111	12.250.000	42.916.667	1,90	0, 19
Zignal®	45.555.556	21.111.111	21.944.444	18.055.556	5.666.6667	1,54	0,27
Mistura	32.222.222	30.611.111	11.083.333	10.000.000	63.916.667	0,75	0,59
F-valor	0.93	0.83	0.69	0.67	0.09		
p-valor	0.47	0.52	0.58	0.60	0.96		

Fonte: elaborado pelos autores

18. DISCUSSÃO

O nível médio de infestação por *Vairimorpha* spp. em abelhas adultas, em condições de campo, foi afetado pela exposição das colmeias à alimentação contendo os fungicidas Captan[®]SC e Zignal[®]. Os testes de prevalência e incidência indicaram que houve um comprometimento da sanidade das abelhas, principalmente para as colmeias expostas a mistura. Em sistemas agrícolas, é comum a presença de múltiplos agrotóxicos nos recursos tróficos coletados pelas abelhas (SANCHESZ-BAYO et al., 2016; McART et al., 2017; TOSI et al., 2018) e mel (SILVA et al., 2015; MITCHELL et al., 2017). Essa exposição pode interferir nas condições sanitárias das colmeias, favorecendo a proliferação dos microsporídeos e reduzindo a longevidade das abelhas (PETTIS et al., 2013; FAITA et al., 2020).

A redução na carga de esporos de *Vairimorpha* spp. ao longo do tempo nas abelhas do tratamento Zignal[®], pode ser efeito do fungicida sobre os microsporídios. Em fungos, o fluazinam (i.a. do Zignal[®]) atua sobre as vias metabólicas da mitocôndria, interferindo na fosforilação oxidativa e inibindo a síntese de ATP (VITORATOS, 2014). É possível que a exposição ao Zignal[®] tenha afetado as mitocôndrias das abelhas e ocasionado o comprometimento do metabolismo energético destes insetos. Por consequência, isso pode ter afetado os índices de *Vairimorpha* spp., uma vez que os microsporídios dependem do ATP produzido pelas células para sobrevivência e esporulação (CORNMAN et al., 2009). Os agrotóxicos têm impactos sobre o comportamento das abelhas, como encontrar o caminho de volta para a colmeia, forrageamento (THOMPSON, 2003) e coordenação motora da probóscide (ORUC et al., 2012), interferindo na longevidade, orientação e aprendizagem, (CIARLO et al., 2012). Os fungicidas podem afetar a imunidade, a síntese de ATP do tecido muscular torácico (DEGRANDI-HOFFMAN et al., 2015) e também a composição e diversidade do intestino, afetando micróbios dos quais as abelhas dependem para a digestão (BABENDREIER, 2007; YANG et al. 2011; DEGRANDI-HOFFMAN et al. 2012).

O aumento na carga de esporos por abelhas ao longo do tempo nos tratamentos Captan[®]SC e Mistura, indicam o efeito crônico dos fungicidas. Esse comportamento foi ressaltado principalmente após 240 dias de exposição. No tratamento Mistura esse efeito pode estar associado a potencialização da toxicidade dos fungicidas, sendo observado a redução da força das colmeias. Os fungicidas têm ação deletéria sobre a microbiota intestinal das abelhas, reduzindo a diversidade fúngica em exposições crônicas (AL NAGGAR et al 2022), reduzindo sua digestão e promovendo a desnutrição destes insetos (DEGRANDI-HOFFMAN et al., 2017). Abelhas

A. mellifera expostas aos fungicidas clorotalonil e piraclostrobina quando contaminadas com microsporídios de *Vairimorpha* spp., apresentaram maiores cargas de esporos, indicando que estes fungicidas acometem a saúde das abelhas (PETTIS et al., 2013). Efeitos semelhantes foram observados em abelhas expostas ao herbicida glifosato, que tiveram alterações na microbiota intestinal, com redução de espécies bacterianas que contribuem para a regulação imunológica e a resistência a patógenos (MOTTA 2020). Adicionalmente, a exposição simultânea da *A. mellifera* a esporos de *Vairimorpha* spp. e Roundup[®], causou maior mortalidade de abelhas em relação a estes estressores de forma isolada (FAITA et al., 2020).

Nos tratamentos Captan[®] e Mistura também foi observada a queda do número de abelhas infectadas com microsporídios e da força das colmeias. É provável que a redução da longevidade das abelhas tenha afetado a homeostase da colmeia, promovendo a quebra do politeísmo etário, que é baseado na idade e trabalhos que as operárias desempenham (VOSSCHER, DUKAS, 1997; THOMPSON, 2007; PERNAL, 2012). Com a longevidade reduzida, as abelhas forrageiras mortas são substituídas por abelhas jovens, levando ao forrageamento precoce (MORAIS-VÁTIMO 2008). Em consequência, há uma diminuição no número de abelhas enfermeiras, causando um impacto na dinâmica da colmeia, como; cuidados com a cria, a rainha, armazenamento e processamento de alimentos (THOMPSON, 2007; PERNAL, 2012). Em condições normais, o forrageamento é realizado por abelhas mais velhas (SEELEY 1982; NOWOGROSZKI 1984; ROBINSON, 1992) que também apresentam a maior quantidade de esporos (GIERSCH et al. 2009; JACK et al., 2016). Neste sentido, é possível que redução da população das colmeias tenha induzido abelhas jovens a fazer o papel das forrageiras e ainda não apresentavam contaminação e/ou esporulação do microsporídios. Assim, em cada vistoria, a coleta de abelhas de diferentes idades justificaria a baixas quantidade de abelhas infectadas.

Cardozo, (2017), ao analisar cerca de 60 abelhas recém-emergidas constatou que as amostras deram 100% negativo para a presença de esporos de *Vairimorpha* spp., a mesma quantidade foi avaliada para abelhas com cinco dias de vida e poucas apresentaram a presença do esporo e as que apresentaram continham uma esporulação baixa. Abelhas *A. mellifera* quando contaminadas com fungicidas isolado ou em mistura, tiveram mortalidade, agindo principalmente no estado fisiológico do intestino médio, abdômen. S-transferase, glicose abdominal e fosfatase alcalina do intestino médio, que estão envolvidos na desintoxicação de xenobióticos, sistema nervoso, defesas contra o estresse oxidativo, metabolismo e imunidade (ALMASRI et

al., 2020). O desequilíbrio na colmeia pode levar as abelhas mais jovens a adquirir um comportamento fora do normal, onde as abelhas mais jovens podem reverter, retardar e acelerar atividades que só seriam suas em determinadas idades, devido a essas condições (BRILLET et al. 2002).

Nossos resultados colaboram para a compreensão dos efeitos dos fungicidas sobre colmeias de *A. mellifera*, os experimentos foram conduzidos em condições realista, o que nos permitiu identificar efeitos crônicos dependente do tempo, a exposição das colmeias aos fungicidas ocasionou efeitos nocivos sobre o índice de esporos de *Vairimorpha* spp em *A. mellifera*.

19. CONCLUSÃO

Os fungicidas utilizados na cultura da macieira Captan® SC e Zignal® influenciaram na dinâmica da incidência de *Vairimorpha* spp em *A. mellifera*, onde os tratamentos com fungicidas tiveram uma quantidade menor de abelha contaminadas, principalmente na mistura, demonstrando uma potencialização da toxicidade desses produtos. Além de diminuir a quantidade de abelhas contaminadas as que continham os esporos eram em um nível muito elevado, as colmeias tratadas com a mistura dos fungicidas tiveram piores resultados. Essa exposição levou as colmeias a um nível de stress alto, onde resultou na postura da rainha, diminuição da população tanto de cria quanto de adultos e estoque alimentar.

20. REFERÊNCIAS

AL NAGGAR, Y.; SINGAVARAPU, B.; PAXTON, R. J.; WUBET, T. Bees under interactive stressors: the novel insecticides flupyradifurone and sulfoxaflopr along with the fungicide azoxystrobin disrupt the gut microbiota of honey bees and increase opportunistic bacterial pathogens. **Sci Total Environ.** 2022 Aug 9; 849:157941. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.157941. Epub ahead of print. PMID: 35952893.

ALAUX, C.; BRUNET J. L.; DUSSAUBAT C.; MONDET F.; TCHAMITCHAN S.; COUSIN M.; BRILLARD J.; BALDY A.; BELZUNCES L.P.; LECONTE Y. (2010) Interações entre micrósoros de *Nosema* e um neonicotinoide enfraquecem as abelhas (*Apis mellifera*). **Environ Microbiol** 12: 774-782.

ALMASRI, H.; TAVARES, D. A.; PIOZ, M.; SENÉ, D.; TCHAMITCHIAN, S.; COUSIN, M.; BRUNET, J. L.; BELZUNCES, L.P. (2020). Mixtures of an insecticide, a fungicide and a herbicide induce high toxicities and systemic physiological disturbances in winter *Apis mellifera* honey bees. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 203. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111013>

AUFAUVRE, J.; BIRON, D. G.; VIDAU, C.; FONTBONNE, R.; ROUDEL, M.; DIOGON, M.; VIGUES, B.; LUC, P. B.; DELBAC F.; BLOT N. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. **Sci. Rep.** 2012;2(326): 1-7. <http://doi.org/10.1038/srep00326>

AUFAUVRE, J.; MISME-AUCOUTURIER, B.; VIGUÈS, B.; TEXIER, C.; DELBAC, F.; BLOT, N. Transcriptome Analyses of the Honeybee Response to *Nosema ceranae* and Insecticides. **Plos One** 2014;9(2): 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091686>

BABENDREIER, D.; JOLLER, D.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. WIDMER, F. (2007). Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. **FEMS Microbiol. Ecol.** 59: 600–610.

BECNEL, J. J.; ANDREADIS, T. G. Microsporidia In Insects. In: Wittner, M. (Ed.); Weiss, L. M. The Microsporidia And Microsporidiosis. Washington: **American Society For Microbiology**, (1999). P. 447-501.

BIZZOCCHI, L. Avaliação Dos Impactos Do Pólen De Milho Geneticamente Modificado (Bt) Sobre Colônias De *Apis Mellifera* L. Dissertação de mestrado, 66 páginas. (2014). Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/128787/330573.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

BRILLET, C.; ROBINSON, G. E.; BUES, R.; CONTE, Y. L. Racial differences in division of labor in colonies of the honey bee (*Apis mellifera*). **Ethology**, v. 108, p. 115-126, (2002).

CALI, A; WEISS, L. M; TAKVORIAN, P. M. A review of the development of two types of human skeletal muscle infection from microsporidia associated with pathology in invertebrates and coldblooded vertebrates. **Folia parasitol**, New Jersey, v. 52, p. 51-61, (2005).

CAVALIER-SMITH T (1998) A revised six-kingdom system of life. **Biological Reviews** 73:203–266. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1998.tb00030.x>

CHEMUROT, M.; DE SMET, L.; BRUNAIN, M.; RYCKE, R.; GRAAF, D. (2017). *Nosema neumanni* n. sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda. **European Journal of Protistology**. 61. 10.1016/j.ejop.2017.07.002.

CIARLO, T. J.; MULLIN, C. A.; FRAZIER, J. L.; SCHMEHL, D. R. Learning impairment in honey bees caused by agricultural spray adjuvants. **PLoS One**. 2012;7 (7):e40848. DOI: [10.1371/journal.pone.0040848](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040848) Epub 2012 Jul 16. PMID: 22815841; PMCID: PMC3397935.

CODLING, G.; NAGGAR, Y. A.; GIESY, J. P. ROBERTSON, A.; J. Neonicotinoid insecticides in pollen, honey and adult bees in colonies of the European honey bee (*Apis mellifera* L.) in Egypt. **Ecotoxicology** 27, 122–131 (2018).

CORNMAN, R. S.; CHEN, Y. P.; SCHATZ, M. C. STREET C, ZHAO Y.; DESANY, B.; EGOLM, M.; HUTCHISON, S.; JEFFERY S.; PETTIS, W. LIPKIN, I.; EVANS, J. D. (2009) Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. **PLoS Pathog** 5: e1000466.

DE GRAAF, D. C.; RAES, H.; SABBE L.; DE RYCKE P. H F. ; JACOBS J. Early development of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) in the midgut epithelium of the honeybee (*Apis mellifera*). **Journal of Invertebrate Pathology**, Gent, v. 63, n. 1. p. 74–81, (1994).

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y.; WATKINS DEJONG, E.; CHAMBERS, M. L.; HIDALGO G. Effects of Oral Exposure to Fungicides on Honey Bee Nutrition and Virus Levels. **J Econ Entomol**. 2015 Dec;108(6):2518-28. doi: 10.1093/jee/fov251. Epub 2015 Aug 28. PMID: 26318004.

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CORBY-HARRIS, V.; DEJONG, E. W.; MONA C.; GEOFFREY H. Honey bee gut microbial communities are robust to the fungicide Pristine® consumed in pollen. **Apidologie** 48, 340–352 (2017). <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0478-y>

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; ECKHOLM, B.; ANDERSON, K. 2012. Honey bee health: the potential role of microbes, pp. 1–12. In D. SAMMATARO AND J. A. YODER (eds.), Honey bee colony health. CRC Press, Boca Raton, FL.

DI PRISCO, G.; CAVALIERE, V.; ANNOSCIA, D.; VARRICCHIO, P.; CAPRIO, E.; NAZZI, F.; GARGIULO, G.; PENNACCHIO, F. (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110. 10.1073/pnas.1314923110.

DOMINGUES C. E. C.; ABDALLA F.; C, BALSAMO P. J.; PEREIRA B. V.; R, HAUSEN M. A.; COSTA M. J.; SILVA-ZACARIN E. C. M.; Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotoxic system of the Africanized honeybee. **Chemosphere**. (2017) Nov; 186:994-1005. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.07.133. Epub 2017 Aug 12. PMID: 28835008.

FAITA, M. R; CARDOZO, M. M; AMANDIO, D. T. T; ORTH, A. I; NODARI R. O; Glyphosate-based herbicides and *Nosema* sp. microsporidia reduce honey bee (*Apis mellifera* L.) survivability under laboratory conditions **J. Apic. Res.**, 59 (2020), pp. 332-342, 10.1080/00218839.2020.1736782

FRANZEN, C.; MÜLLER, A. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. **Clinical Microbiology Reviews**, Cologne, v. 12, n. 2, p. 243-285, (1999).

FRIES, I.; FENG, F.; SILVA, A.; SLEMENDA, S., B.; PIENIAZEK, N., J; (1996). *Nosema ceranae* sp. (Microspora, Nosematidae), caracterização morfológica e molecular de um parasita microsporidiano da abelha asiática *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). **European Journal of Protistology**, 32: 356–365. doi: 10.1016 / S0932-4739 (96) 80059-9.

GISDER S.; MÖCKEL N.; LINDE A.; GENERSCH E. A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. **Environ Microbiol**. (2011) Feb;13 (2):404-13. doi: 10.1111/j.1462-2

HIGES, M.; GARCÍA-PALENCIA, P.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; MEANA A. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 94, n. 3, p. 211–217, (2007). 920.2010.02346.x. Epub 2010 Sep 30. PMID: 20880328.

HIGES, M.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; MARTÍNEZ-SALVADOR, A.; GARRIDO-BAILÓN, E.; GONZÁLEZ-PORTO, A. V.; MEANA, A.; BERNAL, J. L.; DEL NOZAL, M. J.; BERNAL, J. A. Preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. **Environ Microbiol Rep**. 2010 Apr;2(2):243-50. DOI: [10.1111/j.1758-2229.2009.00099.x](https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00099.x) Epub 2009 Dec 1. PMID: 23766075.

HIGES, M.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; MEANA, A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. **Journal of Invertebrate Pathology**, Madrid, v. 92, n. 2. p. 93–95, (2006).

HUANG WF, JIANG, J. H.; CHEN, Y. W.; WANG, C. H. (2007) A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. **Apidologie** 38: 30–37.

JACK, C. J.; LUCAS, H. M.; WEBSTER, T. C.; SAGILI, R. R. Colony Level Prevalence and Intensity of *Nosema ceranae* in Honey Bees (*Apis mellifera* L.). **PLoS One**. 2016 Sep 22; 11(9):e0163522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163522> PMID: 27658258; PMCID: PMC5033419.

- KEELING, P. J.; FAST, N. M. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. **Annual Review of Microbiology**, Vancouver, v. 56, p. 93-116, (2002).
- LARSSON, R. Ultrastructure, function, and classification of Microsporidia. *Progr. Protistol.* [S.l.], v. 1. p. 325–390, (1986).
- MACINNIS, C. I.; KEDDIE, B.; A.; PERNAL, S. F. *Nosema ceranae* (Microspora: Nosematidae): A Sweet Surprise? Investigating the Viability and Infectivity of *N. ceranae* Spores Maintained in Honey and on Beeswax. **J Econ Entomol.** 2020 Oct 16;113(5):2069-2078. DOI: [10.1093/jee/toaa170](https://doi.org/10.1093/jee/toaa170)
- MALASPINA, O.; SOUZA, T. F. Reflexos das aplicações de agrotóxicos nos campos de cultivo para a apicultura brasileira. In: Congresso Brasileiro De Apicultura, 27; E Meliponicultura, 3; Belo Horizonte, **Anais...** Belo Horizonte, (2008).
- MAYACK, C., NAUG, D., (2009) Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. **Journal of Invertebrate Pathology** 100: 185–188.
- NOWOGRODZKI, R. Division of labour in the honey bee colony. *Bee World*, v. 65, p.109-116, (1984).
- ORUC, H. H; HRANITZ, J. M; SORUCU, A; DUELL, M; CAKMAK, I; AYDIN, L; ORMAN, A. Determination of acute oral toxicity of flumethrin in honey bees. **J Econ Entomol.** 2012 Dec;105(6):1890-4. DOI: [10.1603/ec12055](https://doi.org/10.1603/ec12055) PMID: 23356050.
- PERNAL, S. F. The biology and control of *Nosema*. *Bee Masters* (2012) Advanced Beekeeping Course, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada, p. 20-24.
- PETTIS, J. S.; LICHTENBERG, E. M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R.; VANEN-GELSDORP, D. Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. **PLOS One**, v. 8, n. 7, 2013.
- PORRINI, L. P.; PORRINI, M. P.; GARRIDO, M. P.; MÜLLER, F.; ARRASCAETA, L.; IRIARTE, P. J. F.; EGUARAS, M. J. (2020). Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates obtained from various *Apis mellifera* morphotypes. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 168(4), 286-294.
- ROBINSON, G. E. (1992). Regulation of division of labor in insect colonies. **Annual Review of Entomology** 37: 637-665.
- SEELEY, T. E. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honey bee colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 11, p. 287-293, (1982).
- SMITH, M.L. (2012). The honey bee parasite *Nosema ceranae*: transmissible via food exchange? **PLoS One**. 7: e43319.

SULBORSKA, A.; HORECKA, B.; CEBRAT, M.; KOWALCZYK, M.; SKRZYPEK, T.; KAZIMIERCZAK, W.; TRYTEK, M.; GRZEGORZ, B.; (2019). Microsporidia *Nosema* spp. – obligate bee parasites are transmitted by air. **Scientific Reports**. 9. 10.1038/s41598-019-50974-8.

THOMPSON, H. M. Behavioural Effects of Pesticides in Bees—Their Potential for Use in Risk Assessment. **Ecotoxicology** 12, 317–330 (2003). <https://doi.org/10.1023/A:1022575315413>

THOMPSON, T. S. Degradation of incurred tylosin to desmycosin: implications for residue analysis of honey. **Anal. Chim. Acta**, v. 586, p. 304–311, 2007.

TOKAREV, Y. S.; HUANG, W. F.; SOLTER, L. F.; MALYSH, J. M.; BECNEL, J. J.; VOSSBRINCK, C. R. A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics **J. Invertebr. Pathol.** 169 (2020), p. 107279, [10.1016/j.jip.2019.107279](https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107279)

TONG, Z.; DUAN, J.; WU, Y.; LIU, Q.; HE, Q.; SHI, Y.; YU, L.; CAO, H. (2018). A survey of multiple pesticide residues in pollen and beebread collected in china. **Science of the Total Environment**, 640-641, 1578-1586 doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.424.

VITORATOS, A. G. (2014). Mode of action and genetic analysis of resistance to fluazinam in *Ustilago maydis*. **Journal of Phytopathology**, 162, 737–746.

VOSSCHER, P. K.; DUKAR, R. (1997). Survivorship of foraging honey bees. **Springer. Insect. Soc.**, v. 44, p. 1–5.

YANG, C.; HAMEL C.; VUJANOVIC, V.; GAN Y. 2011. Fungicide: Modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. **ISRN Ecol.** 2011: 130289. doi:10.5402/2011/130289.