

**UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE**

**VICTORIA PIETRA GANGI**

**ANÁLISE DA LONGEVIDADE E QUALIDADE ESPERMÁTICA DE ZANGÕES DE  
*Scaptotrigona aff. depilis* (APIDAE, MELIPONINI) EXPOSTOS A ESTRESSE  
TÉRMICO AGUDO E INFECÇÃO POR *Bacillus thuringiensis***

**SÃO PAULO**

**2023**

VICTORIA PIETRA GANGI

**ANÁLISE DA LONGEVIDADE E QUALIDADE ESPERMÁTICA DE ZANGÕES DE  
*Scaptotrigona aff. depilis* (APIDAE, MELIPONINI) EXPOSTOS A ESTRESSE  
TÉRMICO AGUDO E INFECÇÃO POR *Bacillus thuringiensis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Presbiteriana Mackenzie, como  
requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Tavares Azevedo Vieira

**SÃO PAULO - SP  
2023**

*Dedico aos meus pais, Ana Maria e Cristiano,  
e a minha querida avó, Judite. Obrigada por  
tanto amor.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Ana Maria e Cristiano, por todo apoio, amor, conselhos e muito carinho. Sou muito feliz em saber que tive tanta sorte em ter vocês como pais. Amo vocês para todo o sempre.

Agradeço, especialmente, a minha avó, Judite, por ter me criado tão bem e me amar incondicionalmente.

Agradeço à toda minha família, por sempre me apoiar e estar presente em tudo. A todos os meus avós, à minha querida irmã, Samantha, e às minhas tias favoritas, Karina e Rosana. Obrigada, amo todos vocês.

Agradeço ao professor Leandro Vieira, um excelente profissional, por ter aceitado me orientar, e agradeço a todos os bons professores da Universidade Presbiteriana Mackenzie, por todos os valiosos ensinamentos.

Agradeço ao professor Michael Hrcir, a quem admiro muito, pela oportunidade e pelo seu constante apoio.

Agradeço aos meus amigos do laboratório FIS-A-BEE, por terem me recebido tão bem! Em especial, ao Toni, Cris e Kewen. Obrigada pelas risadas, ensinamentos e companhia.

Agradeço ao Kewen, meu querido amigo, por sempre rir comigo e me ajudar em absolutamente tudo. Sem ele, esse trabalho não seria completo.

Agradeço aos meus amigos e amigas da graduação por todos os bons momentos e muito apoio. Obrigada por viverem isso comigo, minha lembrança da graduação sempre será feliz porque vocês existiram nela.

Agradeço a todos os meus bons amigos da vida. Em especial, à minha melhor amiga Luciana, que cresceu comigo e, mesmo estando longe, acompanhou e celebrou todas as minhas conquistas até aqui, me apoiando em qualquer situação e sendo a melhor pessoa que alguém poderia ter ao lado. “Lhamo” muito, Lulu!

*“Passava os dias ali, quieto, no meio das coisas  
miúdas. E me encantei”*

*(Manoel de Barros)*

## RESUMO

As abelhas sociais sem ferrão (Apidae, Meliponini) enfrentam um declínio devido a ameaças antrópicas que impactam diretamente na sua reprodução e dispersão. Nos meliponíneos, a qualidade do sêmen do macho, que está constantemente exposto a múltiplos estressores durante o acasalamento, é um fator crucial para o sucesso reprodutivo da colônia. Diante desse cenário, esse trabalho objetivou avaliar a sobrevivência e a qualidade espermática de machos de *Scaptotrigona* aff. *depilis* expostos a estresse térmico agudo e alimentados com um biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Os zangões foram coletados no meliponário da Universidade de São Paulo (n = 68) e divididos em quatro tratamentos experimentais: Controle (C), Exposição a estresse térmico (ET), Exposição ao microrganismo (BT) e Exposição a estresse térmico e ao microrganismo (ET-BT). Os grupos foram aclimatados durante 24 horas a uma temperatura controlada de  $28 \pm 1$  °C. Durante a aclimação, os indivíduos dos grupos C e ET foram alimentados com 2,5 mL de solução de açúcar. Os tratamentos BT e ET-BT foram alimentados com 2,5 mL de solução de açúcar contaminada com a cepa 344 de *B. thuringiensis tolworthi* (concentração  $5 \times 10^6$  UFC/ml). Após 24 horas de aclimação, os animais dos grupos ET e ET-BT passaram pelo desafio térmico por uma hora a  $40 \pm 1$  °C. Os zangões foram dissecados e a viabilidade espermática foi analisada em microscopia de epifluorescência. Para avaliar a longevidade dos indivíduos, os grupos C (n = 22) e BT (n = 23) foram aclimatados a  $28 \pm 1$  °C e observou-se a sobrevivência dos indivíduos a cada 24 horas ao longo de 144 horas. Os resultados demonstraram que apenas a temperatura afetou negativamente a capacidade dos zangões de *S. aff. depilis* de manterem a viabilidade de seus espermatozoides (viabilidade média: C: 88,2%; ET: 17,2 %; ET-BT: 21,24 %; BT: 79,1%). Não se detectou influência significativa da alimentação com *B. thuringiensis* na viabilidade espermática dos zangões (*one way* ANOVA,  $F = 50,498$ ,  $P < 0,001$ ). Também se comprovou que os efeitos letais da ingestão da bactéria iniciam-se nas primeiras 24 horas com sobrevivência dos indivíduos que ingeriram o biopesticida decaindo significativamente (teste *log-rank*,  $p < 0,05$ ). Considerando o aumento na frequência das ondas de calor e no uso de microrganismos de controle biológico, a reprodução da espécie pode estar ameaçada em razão à queda na longevidade dos zangões acometidos pela infecção por *B. thuringiensis* e à queda na viabilidade espermática dos zangões que passaram pelo estresse fisiológico de um pico de temperatura.

**Palavras-chave:** Meliponini. Controle Biológico. Viabilidade espermática. Fisiologia térmica.

## ABSTRACT

Stingless social bees (Apidae, Meliponini) are facing a decline due to anthropogenic threats that directly impact their reproduction and dispersion. In stingless bee drones, the quality of male semen, which is constantly exposed to multiple stressors during mating, is a crucial factor for the reproductive success of the colony. Thus, this study aimed to evaluate the survival and sperm quality of *Scaptotrigona* aff. *depilis* drones exposed to acute thermal stress and fed with a biopesticide based on *Bacillus thuringiensis* (Bt). The drones were collected from the University of São Paulo's meliponary (n = 68) and divided into four experimental treatments: Control (C), Exposure to thermal stress (ET), Exposure to the microorganism (BT), and Exposure to thermal stress and the microorganism (ET-BT). The groups were acclimated for 24 hours at a controlled temperature of  $28 \pm 1$  °C. During acclimation, individuals from groups C and ET were fed with 2.5 mL of sugar solution. BT and ET-BT treatments were fed with 2.5 mL of sugar solution contaminated with the strain 344 of *B. thuringiensis tolworthi* (concentration  $5 \times 10^6$  CFU/ml). After 24 hours of acclimation, individuals from ET and ET-BT groups underwent thermal challenge for one hour at  $40 \pm 1$  °C. The drones were dissected, and sperm viability was analyzed using epifluorescence microscopy. To evaluate the longevity of individuals, groups C (n = 22) and BT (n = 23) were acclimated at  $28 \pm 1$  °C, and the survival of individuals was observed every 24 hours for 144 hours. The results demonstrated that only temperature negatively affected the ability of *S. aff. depilis* drones to maintain the viability of their sperm (average viability: C: 88.2%; ET: 17.2%; ET-BT: 21.24%; BT: 79.1%). No significant influence of feeding with *B. thuringiensis* on drone sperm viability was detected (*one-way* ANOVA,  $F = 50.498$ ,  $P < 0.001$ ). It was also confirmed that the lethal effects of bacteria ingestion begin within the first 24 hours, with the survival of individuals ingesting the biopesticide decreasing significantly (log-rank test,  $p < 0.05$ ). Considering the increase in the frequency of heatwaves and the use of biological control microorganisms, the species' reproduction may be threatened due to the decrease in the longevity of drones affected by *B. thuringiensis* infection and the decline in sperm viability in drones undergoing acute physiological thermal stress.

**Keywords:** Meliponini. Biological Control. Sperm Viability. Thermal Physiology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Agregação de zangões de <i>Scaptotrigona</i> aff. <i>depilis</i> no meliponário (IB/USP) .....	12
Figura 2 - Dissecção de zangões de <i>Scaptotrigona</i> aff. <i>depilis</i> .....	14
Figura 3 - Espermatozoides de zangões de <i>Scaptotrigona</i> aff. <i>depilis</i> .....	15
Figura 4 - Viabilidade espermática de 68 machos de <i>Scaptotrigona</i> aff. <i>depilis</i> .....	17
Figura 5 - Sobrevivência de zangões de <i>Scaptotrigona</i> aff. <i>depilis</i> ao longo do tempo. ....	18



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS .....</b>	<b>12</b>
2.1 LOCAL DE ESTUDO E OBTENÇÃO DE ZANGÕES DE <i>Scaptotrigona aff. depilis</i> .....	12
2.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	12
2.2.1 Tratamentos experimentais .....	12
2.2.2 Coleta do material biológico .....	13
2.2.3 Avaliação da viabilidade espermática .....	14
2.2.4 Sobrevivência ao longo do tempo .....	15
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	16
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
3.1 Viabilidade espermática .....	17
3.2 Sobrevivência ao longo do tempo .....	18
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>23</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Desde a década de 1990 há um declínio na abundância e riqueza de espécies de abelhas em escala global. Tal fenômeno foi acelerado no século XXI, com uma redução das espécies por cerca de 25% entre 2006 a 2015 (Zattara; Aizen, 2021). O declínio pode ser atribuído a uma série de ameaças que afetam principalmente os ecossistemas tropicais (Mora *et al.*, 2013; Medina *et al.*, 2020), das quais as ações antropogênicas se sobressaem, entre essas, a transformação do habitat natural em monoculturas e áreas urbanas, o uso inadequado de pesticidas, a introdução de novas espécies e as alterações climáticas (Nocelli *et al.*, 2012; Zattara; Aizen, 2021; Zhao *et al.*, 2021; Goulson; Nicholls, 2022; Harvey *et al.*, 2023). Esses fatores não atuam de maneira isolada, já que as abelhas estão suscetíveis a inúmeros estressores complexos e interativos que serão, provavelmente, agravados pelo aumento da temperatura global (Goulson *et al.*, 2015; Mckinstry *et al.*, 2017; Medina *et al.*, 2020; Harvey *et al.*, 2023).

A interação de múltiplos estressores é particularmente importante com respeito à ação de patógenos. Estudos demonstraram que as abelhas estão constantemente expostas a inúmeros patógenos, como fungos, ácaros, vírus e bactérias, que podem afetar sua fisiologia e sobrevivência (Champion de Crespigny; Wedell, 2006; Amiri *et al.*, 2017; Ullah *et al.*, 2021). Operárias de abelhas melíferas (Apidae, Apini: *Apis mellifera*) expostas a um choque térmico se tornavam mais suscetíveis à infecção pelo fungo *Metarhizium anisopliae* em comparação com indivíduos que não passaram por estresse térmico (Medina *et al.*, 2020). Machos da mesma espécie infectados pelo fungo sexualmente transmissível *Nosema apis* demonstraram uma redução na sobrevivência e na viabilidade espermática (Peng *et al.*, 2015). Esse efeito do patógeno sobre os espermatozoides é agravado quando combinado com estressores ambientais adicionais, como sugerido pelo estudo de Kairo *et al.* (2017), que demonstrou que a infecção por *N. apis* junto à exposição ao pesticida fipronil causou uma diminuição significativa da concentração espermática (Kairo *et al.*, 2017). Porém, apesar da sua relevância para o sucesso reprodutivo das abelhas e, conseqüentemente, para manutenção das populações desses polinizadores, há poucos estudos avaliando o efeito de múltiplos estressores sobre a qualidade espermática dos machos.

Tendo como sua função primordial liberar espermatozoides na rainha receptiva, os machos desempenham um papel essencial no processo de reprodução (Kerr *et al.*, 1962; Engels; Imperatriz-Fonseca, 1990; Nogueira-Neto, 1997), já que fornecem qualidade espermática para a rainha (Koffler *et al.*, 2016; Kairo *et al.*, 2017). Nas abelhas sem ferrão (Apidae, Meliponini), um grupo pantrópico de abelhas eussociais com mais de 600 espécies (Roubik, 2023), os zangões formam grandes agregações nas proximidades da colônia de interesse, onde aguardam

a saída da rainha virgem. Essas agregações podem ser compostas de centenas a milhares de indivíduos (Kerr *et al.*, 1962; Engels; Imperatriz-Fonseca, 1990; Paxton, 2000; Michener, 2007). Visto que rainhas em abelhas sem ferrão são monoândricas (Vollet-Neto *et al.*, 2018; Bueno *et al.*, 2023), ou seja, elas copulam com apenas um macho, há grande competição entre os zangões em relação ao acesso à fêmea (Koffler *et al.*, 2016), o que torna o acasalamento um evento complexo que requer muitos esforços (Von Zuben, 2017). Após depositar seus espermatozoides, o macho perde sua cápsula genital, que fica presa à fêmea, e morre posteriormente (Engels; Imperatriz-Fonseca, 1990; Von Zuben, 2017; Morais, 2019).

Devido ao sistema monoândrico das abelhas sem ferrão, a qualidade do sêmen do macho, que venceu a competição pela fêmea, se torna a chave para o sucesso reprodutivo da rainha (Koffler *et al.*, 2016). Como os zangões são expostos a diversos estressores ambientais enquanto esperam a fêmea, é importante avaliar como o conjunto desses estressores influencia sua qualidade espermática. Com a previsão de que as mudanças climáticas resultem em eventos climáticos extremos mais frequentes e severos, como as ondas de calor (Bordier *et al.*, 2017; Xu; Ramanathan; Victor, 2018; Valverde; Rosa, 2023), torna-se fundamental priorizar a avaliação da sensibilidade térmica em abelhas (Bordier *et al.*, 2017) juntamente a outros estressores que as acometem (Nocelli *et al.*, 2012; Zattara; Aizen, 2021; Zhao *et al.*, 2021; Goulson; Nicholls, 2022; Harvey *et al.*, 2023). Entre esses estressores adicionais estão os biopesticidas, produzidos à base de microrganismos com capacidade entomopatógena, que foram desenvolvidos como alternativa ao uso dos pesticidas convencionais, sendo produtos comercialmente acessíveis e, em teoria, menos nocivos ao meio ambiente (Xavier *et al.*, 2009).

Muitos países proibiram a utilização de inseticidas químicos sintéticos devido aos efeitos prejudiciais para os insetos benéficos não-alvo e para a população humana, aumentando a demanda por biopesticidas à base de patógenos de insetos (Sansinenea, 2012; European Food Safety Authority; Carrasco Cabrera; Medina Pastor, 2022). O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria gram-positiva, aeróbia facultativa, altamente específica contra insetos praga das ordens Diptera, Coleoptera e Lepidoptera, e é amplamente utilizada na agricultura (Federici, 1999; Sansinenea, 2012; Valicente, 2019). Aplicado no Manejo Integral de Pragas (MIP), o Bt é capaz de matar larvas de insetos ao produzir toxinas durante a sua fase de esporulação (Schnepf *et al.*, 1998; Bravo *et al.*, 2011). Apesar da sua suposta especificidade para insetos-alvo, já foi observada uma redução da longevidade de operárias de *A. mellifera* após a ingestão de diferentes linhagens de Bt (Libardoni, 2018). Devido a essa potencial ameaça para as abelhas, mais estudos tornam-se necessários para avaliar os riscos de diferentes biopesticidas à base de Bt para os polinizadores (Steinigeweg, 2021).

Para entender melhor as possíveis interações entre estressores ambientais sobre o sucesso reprodutivo de machos de abelhas sem ferrão, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência e a qualidade espermática de machos de *Scaptotrigona aff. depilis* quando expostos a um biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis* associado a estresse térmico agudo. Esperava-se que o conjunto dos estressores pudesse reduzir de maneira significativa a qualidade dos espermatozoides dos zangões, modificando a viabilidade espermática, além de afetar a longevidade dos indivíduos.

## 2. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 2.1 LOCAL DE ESTUDO E OBTENÇÃO DE ZANGÕES DE *Scaptotrigona* aff. *depilis*

Foram coletados zangões de *S. aff. depilis* no meliponário do Instituto de Biociências (IB) da Universidade de São Paulo (USP) nas agregações próximas às colônias (Figura 1) entre julho e outubro de 2023. A captura foi realizada com o auxílio de um sugador entomológico. Imediatamente após a captura, os machos foram levados ao laboratório para realização dos experimentos.

Figura 1 - Agregação de zangões de *Scaptotrigona* aff. *depilis* no meliponário (IB/USP)



Fonte: Autoria própria (2023)

### 2.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Ambiental de Abelhas (FIS-A-BEE) localizado no Departamento de Fisiologia (IB-USP). Parte da análise do material biológico foi feita através da utilização do microscópio de epifluorescência no laboratório Evo-Devo do Departamento de Zoologia (IB-USP).

#### 2.2.1 Tratamentos experimentais

Após a coleta, os zangões foram atribuídos a quatro tratamentos experimentais: (1) Controle (C), (2) Exposição a estresse térmico (ET), (3) Exposição ao microrganismo (BT) e

(4) Exposição a estresse térmico e ao microrganismo (ET-BT). Em cada tratamento foram utilizados 17 zangões, totalizando 68 indivíduos. Os machos foram colocados em grupos de aproximadamente 10 indivíduos em pequenas gaiolas. Os grupos foram aclimatados em uma incubadora B.O.D durante 24 horas a uma temperatura controlada de  $28 \pm 1$  °C, que representa a temperatura média em ninhos de *S. aff. depilis* no local do estudo (observação pessoal). Durante a aclimação, os indivíduos dos grupos C e ET receberam 2,5 mL de alimento (solução de açúcar a 50% m/m). Nos tratamentos BT e ET-BT, os animais foram alimentados com 2,5 mL de solução de açúcar 50% m/m contaminada com a cepa 344 de *B. thuringiensis tolworthi* na concentração de  $5 \times 10^6$  UFC/ml.

Para produção do alimento contaminado, foi utilizado um inseticida microbiológico comercial, composto por 1,5 % de esporos de *B. thuringiensis* e 98,5% de outros ingredientes, que está sendo aplicado em culturas com ocorrência do alvo biológico *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho ou lagarta militar; ordem Lepidoptera) no Brasil (Valicente, 2008; Valicente, 2019). Inicialmente, para atingir a concentração de  $5 \times 10^6$  UFC/ml recomendada pelo fabricante para aplicação sobre a cultura, foram misturados 25 µL desse inseticida com 5 mL da solução de açúcar 50% m/m. O tempo de aclimação escolhido (24 horas) é adequado para os zangões se alimentarem com a bactéria, já que esse é o período mínimo necessário para que o patógeno se desenvolva no sistema gastrointestinal dos animais hospedeiros (Schwenk *et al.*, 2020).

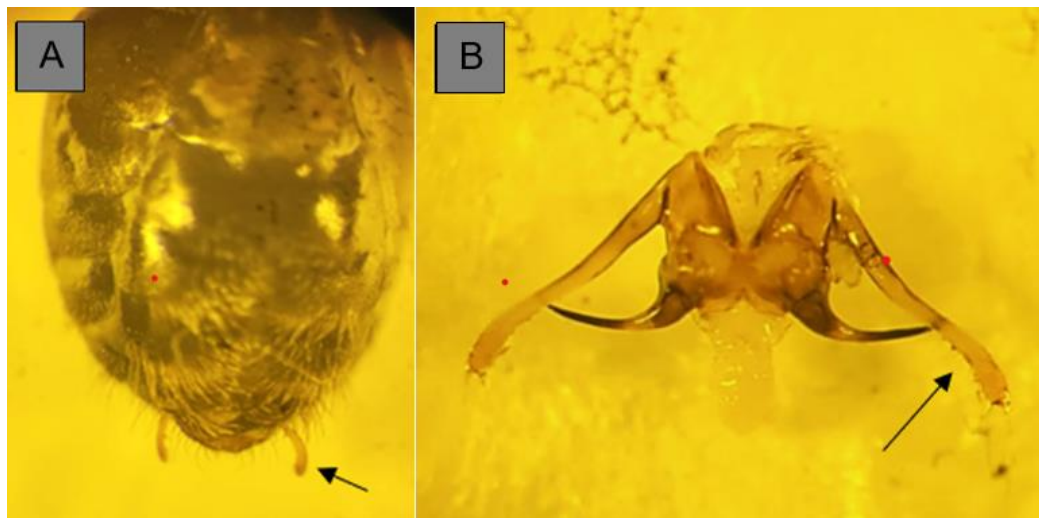
Após a aclimação, os zangões dos tratamentos C e BT permaneceram nas incubadoras a uma temperatura de  $28 \pm 1$  °C por uma hora. As gaiolas dos grupos ET e ET-BT foram retiradas da incubadora de aclimação e transferidas para uma segunda incubadora B.O.D onde permaneceram por uma hora a uma temperatura de  $40 \pm 1$  °C. Essa temperatura foi escolhida baseada nas temperaturas ambientais máximas reportadas para o estado de São Paulo durante as ondas de calor (Valverde; Rosa, 2023). Ao fim do desafio, as gaiolas experimentais foram retiradas da incubadora e os animais foram dissecados para análise.

### 2.2.2 Coleta do material biológico

Após o desafio térmico, os indivíduos foram transferidos ao laboratório Evo-Devo onde foram retiradas as cápsulas genitais dos machos. Inicialmente, o macho foi alfinetado na região ventral do tórax com o auxílio de um alfinete entomológico nº zero. A placa foi posta sob um estereomicroscópio para melhor visualização. Utilizando uma pinça histológica de ponta fina, o abdômen foi levemente pressionado e, após a visualização de estruturas da cápsula genital, como os gonóstilos (Figura 2A), a cápsula genital foi completamente retirada com o auxílio da

pinça (Figura 2B). Posteriormente, a cápsula genital foi colocada em um microtubo contendo 20  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato-salino. As cápsulas genitais foram maceradas mecanicamente com a pinça até que a solução se tornasse turva, indicando a ruptura da vesícula seminal e a liberação dos espermatozoides no meio. O corpo dissecado, por sua vez, foi alfinetado e montado para preservação e depósito na coleção entomológica do IB-USP.

Figura 2 - Dissecção de zangões de *Scaptotrigona* aff. *depilis*. (A) Zangão com os gonóstilos expostos indicados pela seta. (B) Cápsula genital completamente extraída com gonóstilo indicado pela seta.



Fonte: Autoria própria (2023)

### 2.2.3 Avaliação da viabilidade espermática

Para avaliação da viabilidade dos espermatozoides, seguiu-se o protocolo de Luz (2018), com adaptações. Uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  da solução contendo o homogeneizado das cápsulas genitais foi adicionada em forma de microgota a uma lâmina histológica. Em seguida, na microgota adicionou-se 4  $\mu\text{L}$  do reagente Laranja de Acridina (0,20  $\mu\text{g/ml}$ ). A amostra foi incubada ao abrigo da luz por 5 minutos.

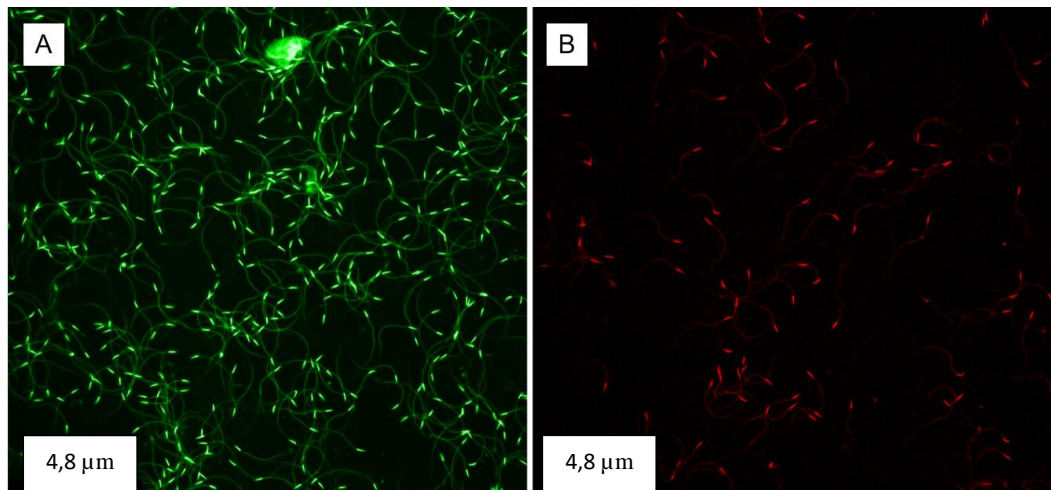
Esse marcador fluorescente é uma molécula orgânica, pequena, anfipática e lipofílica. Tais características químicas lhe garantem a capacidade de atravessar membranas biológicas intactas e de se intercalar no sulco menor da dupla hélice do DNA. Ao ser excitada por um feixe de luz de 488 nm, emite fluorescência detectável na coloração verde com emissão de 530 nm (Silva, 2010) (Figura 3A).

Em seguida, foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  Iodeto de Propídeo (0,25  $\mu\text{g/ml}$ ). Este reagente caracteriza-se por ser uma molécula pequena, de baixo peso molecular e lipofóbica. Quando há desestabilização na estrutura da dupla hélice em células mortas e de membrana rompida, o

Iodeto de Propídeo se intercala no DNA e, quando excitado a 535 nm, emite fluorescência alaranjada detectável no comprimento de onda aproximado de 617 nm (Garner; Johnson; Allen, 1988) (Figura 3B).

Após o tempo de incubação de 5 minutos, as lâminas foram analisadas utilizando um microscópio de epifluorescência (Leica DMI8). Foram contados todos os espermatozoides observados em dois campos visuais aleatórios por lâmina. Ao final da contagem, fez-se a estimativa da proporção de viabilidade espermática dividindo o número de células com membrana intacta (viáveis) pelo número total de células contadas.

Figura 3 - Espermatozoides de zangões de *Scaptotrigona* aff. *depilis*. (A) Exemplo de espermatozoides viáveis corados com Laranja de Acridina. (B) Exemplo de espermatozoides inviáveis corados com Iodeto de Propídeo, cor fantasia.



Fonte: Autoria própria (2023)

#### 2.2.4 Sobrevivência ao longo do tempo

Para avaliar a sobrevivência ao longo do tempo, 45 zangões foram coletados no meliponário (IB/USP) e imediatamente levados ao laboratório. Eles foram distribuídos aleatoriamente em cinco gaiolas controle (C, N = 22), alimentados com solução de açúcar a 50% m/m, e cinco gaiolas experimentais (BT, N = 23), alimentados com xarope contaminado com a cepa 344 de *B. thuringiensis tolworthi* (concentração =  $5 \times 10^6$  UFC/ml). Ambos os grupos permaneceram em uma incubadora B.O.D, a uma temperatura de  $28 \pm 1$  °C por 144 horas. A cada 24 horas foram contabilizadas as abelhas vivas dentro de cada gaiola. As abelhas mortas foram retiradas.



### 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

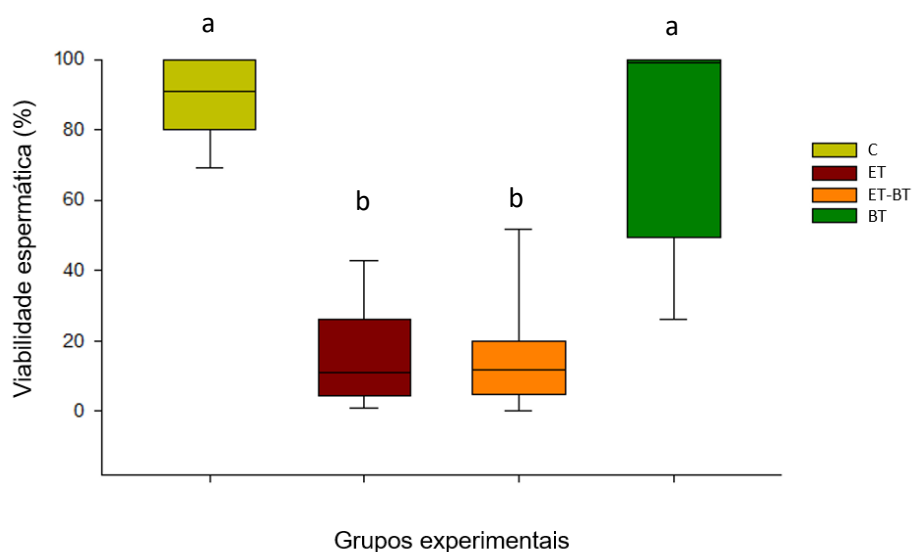
A análise estatística foi realizada através da utilização dos Softwares GraphPad Prism 8® (GraphPad software, Inc., San Diego, Califórnia, USA) e SigmaPlot™ 15.0 (Systat Software Inc., Chicago, Illinois. USA). A viabilidade dos espermatozóides foi comparada entre os tratamentos experimentais (C, BT, ET, ET-BT) através de análises de variância (*one way ANOVA*) com análise post hoc através do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. O nível de significância assumido para diferenças estatísticas foi  $P < 0,05$ . A sobrevivência dos animais ao longo do tempo dos grupos C e BT foi comparada através do teste *log-rank* e assumiu-se o nível de significância para diferenças estatísticas de  $P < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Viabilidade espermática

De acordo com os resultados obtidos a partir das análises de viabilidade espermática, os zangões submetidos à condição controle (C) apresentaram viabilidade espermática média de  $88,2 \pm 13,46$  %. Quando submetidos a um estresse térmico agudo (ET), a viabilidade espermática diminuiu para  $17,2 \pm 17,0$  %. A contaminação do alimento com a cepa bacteriana (BT) não causou uma redução significativa da viabilidade espermática em comparação ao grupo controle. Nesse grupo experimental, a viabilidade espermática média foi de  $79,1 \pm 29,0$  %. Já no grupo experimental submetido ao estresse térmico e à alimentação com a cepa bacteriana (ET-BT) a viabilidade espermática reduziu para  $21,24 \pm 25,22$  %. A viabilidade espermática dos zangões de *S. aff depilis* não diferiu significativamente entre os grupos experimentais C e BT e entre os grupos ET e ET-BT, mas houve diferença significativa entre os grupos sem e com exposição a estresse térmico (*one way* ANOVA,  $F = 50,498$ ,  $P < 0,001$ , Figura 4).

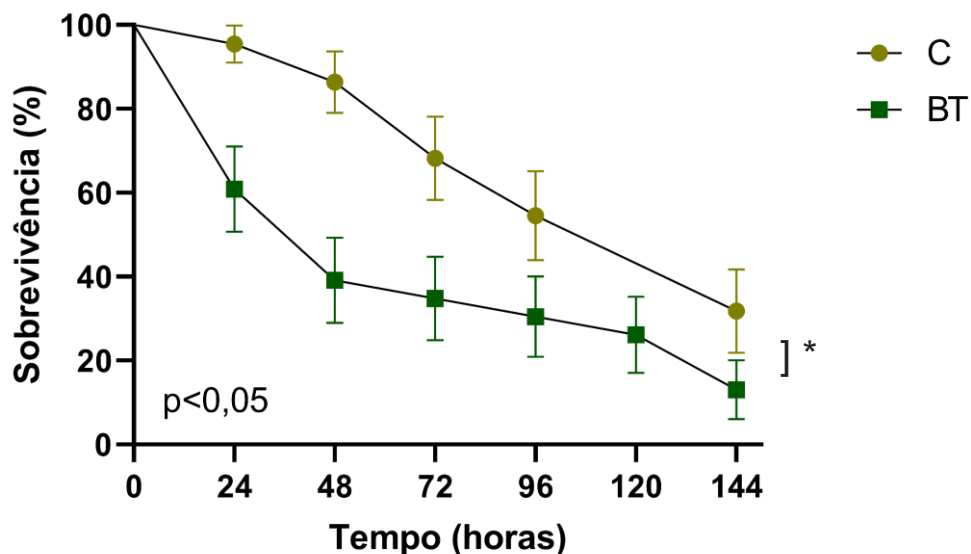
Figura 4 - Viabilidade espermática de 68 machos de *Scaptotrigona aff. depilis*. N = 17 indivíduos por tratamento. Verde oliva - Controle (C), vinho - Exposição a estresse térmico (ET), laranja - Exposição a estresse térmico e ao microorganismo (ET-BT) e verde escuro - Exposição ao microorganismo (BT). Box plot: caixa indica distribuição de 50% dos valores (entre os percentis 25% e 75%), linha horizontal contínua indica a mediana, as hastes delimitam a distribuição entre os percentis 10% a 90 % dos valores. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas (*one way* ANOVA, teste de comparações múltiplas Bonferroni,  $P < 0,05$ ).



### 3.2 Sobrevivência ao longo do tempo

Ao longo de 144 horas (seis dias) de observação, notou-se uma diminuição no número de indivíduos vivos nos grupos experimentais C, BT. Entretanto, a partir das 24 horas após ingestão do alimento contaminado observou-se uma queda aproximada de 40% na sobrevivência dos indivíduos que se alimentaram com a cepa bacteriana (BT). Enquanto isso, no grupo dos animais que não consumiram a cepa bacteriana (C), foi possível observar que após 24 horas houve uma queda na sobrevivência de apenas 5%. A sobrevivência dos indivíduos que consumiram a bactéria continuou diminuindo consideravelmente em relação aos indivíduos controle até 144 horas depois do início do experimento (Figura 5). Tais dados são um indicativo de que a cepa bacteriana interfere significativamente na longevidade de zangões de *S. aff depilis* (teste *log-rank*,  $p < 0,05$ ).

Figura 5 - Sobrevivência de zangões de *Scaptotrigona aff. depilis* ao longo do tempo alimentados com solução de açúcar 50% m/m (C) ou alimentados com solução de açúcar 50% m/m contaminado com a cepa 344 de *B. thuringiensis tolworthi* na concentração =  $5 \times 10^6$  UFC/ml (BT). As barras no gráfico indicam erro padrão de média ( $P < 0,05$ ).



Nos resultados desta pesquisa pode-se observar que, para os animais submetidos a um estresse térmico agudo simultâneo de ingestão de *Bacillus thuringiensis*, apenas a temperatura afeta negativamente a capacidade dos zangões de *S. aff depilis* de manterem a viabilidade de seus espermatozoides. Entretanto, também pode-se comprovar que a maior parte dos efeitos letais da bactéria Bt sobre a sobrevivência dos zangões começam já nas primeiras 24 horas de ingestão do patógeno, embora o mesmo intervalo de tempo, com a ingestão do Bt, não seja o

suficiente para diminuir significativamente a viabilidade dos espermatozoides nos animais sobreviventes.

Vale ressaltar que durante os testes de viabilidade espermática foram utilizados apenas os zangões sobreviventes à ingestão do Bt ao longo de 24 horas de observação. Os resultados da figura 5 são um indicativo de que os zangões sobreviventes à ingestão da bactéria após 24 horas ainda são capazes de manter sua fecundidade. Entretanto, animais expostos a desafios de temperatura não conseguem manter sua fecundidade independentemente de terem se alimentado com o entomopatógeno ou não.

#### 4. DISCUSSÃO

As mudanças climáticas podem causar eventos extremos, como as ondas de calor, que são períodos dos quais a temperatura máxima diária excede 5°C ou mais acima do normal por mais de cinco dias consecutivos (Frich, 2002), afetando a longevidade e a reprodução dos indivíduos (Harvey et al., 2023). Neste estudo pode-se comprovar que independente do fator estressor em associação, os picos de temperatura cada vez mais frequentes no Brasil, ocasionados pelas mudanças climáticas (Valverde; Rosa, 2023), podem ser considerados uma das principais ameaças ao sucesso reprodutivo das abelhas sem ferrão.

Diversos estudos comprovaram que compostos agroquímicos interferem de maneira aguda e significativa na capacidade reprodutiva de zangões de abelhas (Ciereszko *et al.*, 2017; Kairo *et al.*, 2017; Fisher, 2018). O produto utilizado neste estudo não funciona de maneira similar a um defensivo agrícola químico (Sansinenea, 2012). Por ser uma formulação baseada em um microrganismo de controle biológico, é necessário que o animal consuma o produto em questão e que o microrganismo inicie seu desenvolvimento no sistema gastrointestinal do hospedeiro para que em seguida produza as toxinas letais à fisiologia do animal (Schnepf *et al.*, 1998; Bravo *et al.*, 2011; Valicente, 2019).

O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva, aeróbia facultativa e altamente específica no combate a insetos das ordens Diptera, Coleoptera e Lepidoptera (Federici, 1999; Sansinenea, 2012; Valicente, 2019). Durante sua fase de esporulação, essa bactéria é capaz de produzir toxinas conhecidas como Cry e Cyt na forma de inclusões cristalinas. Essas toxinas, ao serem ingeridas pela larva do inseto, desencadeiam o processo de apoptose celular em seu intestino médio, resultando na morte do animal (Schnepf *et al.*, 1998; Bravo *et al.*, 2011; Sansinenea, 2012). Em abelhas nativas europeias *Bombus terrestris*, os efeitos prejudiciais da bactéria sobre a sua longevidade, reprodução e comportamento de forrageio estão associados à cepa e à via de exposição utilizadas (Mommaerts; Jans; Smaggue, 2010).

As abelhas sem ferrão têm distribuição pantropical e realizam serviços ecológicos de alta relevância (Bueno *et al.*, 2023), impactando diretamente na alimentação humana, pois são responsáveis pela manutenção do fluxo gênico e pela polinização de diversos cultivos agrícolas (Tordin, 2011; Nocelli *et al.*, 2012). Embora os biopesticidas tenham sido desenvolvidos como alternativas mais seguras aos pesticidas convencionais, visando preservar insetos benéficos não-alvo, um estudo destacou que esses produtos podem provocar efeitos adversos em insetos polinizadores, afetando inúmeros aspectos, como imunidade, reprodução, morfologia, cognição, forrageio, atividade de voo e expressão de genes (Cappa; Baracchi; Cervo, 2022).

Dessa forma, serão necessários estudos futuros que busquem avaliar os efeitos crônicos da exposição de zangões de *S. aff. depilis* contaminados com *B. thuringiensis* e expostos a temperaturas adversas. Além disso, torna-se importante avaliar os efeitos subletais de biopesticidas à base de diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* sobre as abelhas nativas sem ferrão, evidenciando os efeitos adversos em relação as características comportamentais e morfofisiológicas.

## 5. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos neste estudo, conclui-se que zangões de *Scaptotrigona* aff. *depilis*, quando submetidos ao estresse agudo de temperatura em associação com a ingestão de *Bacillus thuringiensis* por 24 horas, são afetados apenas pelo estresse térmico, portanto a contaminação bacteriana nas primeiras 24 horas de ingestão não interfere na fecundidade dos indivíduos sobreviventes ao patógeno. Porém, constatou-se que os zangões começam a sofrer os principais efeitos da ingestão da contaminação bacteriana em sua longevidade após 24 horas de exposição ao contaminante. Com a previsão de que as ondas de calor se tornem cada vez mais frequentes, e que a utilização de pesticidas à base de entomopatógenos, como o Bt, continuem sendo aplicados em culturas frequentemente visitadas por abelhas sem ferrão, torna-se importante a continuidade nas avaliações de estressores interativos que afetem a reprodução e sobrevivência desses animais.

## REFERÊNCIAS

- AMIRI, Esmail et al. Queen quality and the impact of honey bee diseases on queen health: potential for interactions between two major threats to colony health. **Insects**, v. 8, n. 2, p. 48, 2017.
- BLAIMER, Bonnie B. et al. Key innovations and the diversification of Hymenoptera. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 1212, 2023.
- BORDIER, Célia et al. Colony adaptive response to simulated heat waves and consequences at the individual level in honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3760, 2017.
- BRAVO, Alejandra et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011.
- BUENO, F. G. B. et al. The queens of the stingless bees: from egg to adult. **Insectes Sociaux**, v. 70, n. 1, p. 43-57, 2023.
- BUENO, Francisco Garcia Bulle et al. Stingless bee floral visitation in the global tropics and subtropics. **Global Ecology and Conservation**, p. e02454, 2023.
- CAPPA, Federico; BARACCHI, David; CERVO, Rita. Biopesticides and insect pollinators: Detrimental effects, outdated guidelines, and future directions. **Science of the Total Environment**, v. 837, p. 155714, 2022.
- CHAMPION DE CRESPIGNY, Fleur E.; WEDELL, Nina. Wolbachia infection reduces sperm competitive ability in an insect. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 273, n. 1593, p. 1455-1458, 2006.
- CIERESZKO, Andrzej et al. Sperm parameters of honeybee drones exposed to imidacloprid. **Apidologie**, v. 48, p. 211-222, 2017.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA); CARRASCO CABRERA, Luis; MEDINA PASTOR, Paula. The 2020 European Union report on pesticide residues in food. **EFSA Journal**, v. 20, n. 3, p. e07215, 2022.
- ENGELS, Wolf; IMPERATRIZ-FONSECA, Vera L. Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. In: **Social insects: an evolutionary approach to castes and reproduction**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1990. p. 167-230.
- FEDERICI, B. A. *Bacillus thuringiensis* in biological control. In: **Handbook of biological control**. Academic Press, 1999. p. 575-593.
- FISHER, Adrian; RANGEL, Juliana. Exposure to pesticides during development negatively affects honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm viability. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0208630, 2018.
- FRICH, P. A. L. V. et al. Observed coherent changes in climatic extremes during the second half of the twentieth century. **Climate research**, v. 19, n. 3, p. 193-212, 2002.
- GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A.; ALLEN, C. H. Fluorometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. **Theriogenology**, v. 30, n. 2, p. 369-378, 1988.
- GOULSON, Dave et al. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1255957, 2015.



- GOULSON, Dave; NICHOLLS, Elizabeth. Anthropogenic influences on bee foraging. **Science**, v. 375, n. 6584, p. 970-972, 2022.
- HARVEY, Jeffrey A. et al. Scientists' warning on climate change and insects. **Ecological monographs**, v. 93, n. 1, p. e1553, 2023.
- KAIRO, Guillaume et al. Nosema ceranae, Fipronil and their combination compromise honey bee reproduction via changes in male physiology. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 8556, 2017.
- KERR, Warwick E. et al. Reproduction in the social bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of the New York Entomological Society**, p. 265-276, 1962.
- KOFFLER, Sheina et al. Competitive males have higher quality sperm in a monogamous social bee. **BMC evolutionary biology**, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2016.
- LIBARDONI, Gabriela et al. Effect of different Bacillus thuringiensis strains on the longevity of Africanized honey bee. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 1, p. 329-337, 2018.
- LOPES, Maurício. **Insetos na dieta** - Portal Embrapa. Embrapa, 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/45712402/artigo---insetos-na-dieta> Acesso em: 6 abr. 2023.
- LUZ, Kewen Santiago da Silva. **Influência do aumento da temperatura sobre a qualidade dos espermatozoides de Melipona subnitida** (APIDAE, MELIPONINI), 2018.
- MCKINSTRY, Mia et al. The heat shock response and humoral immune response are mutually antagonistic in honey bees. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8850, 2017.
- MEDINA, Rubén G. et al. Heat stress during development affects immunocompetence in workers, queens and drones of Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.)(Hymenoptera: Apidae). **Journal of Thermal Biology**, v. 89, p. 102541, 2020.
- MICHENER, C. D. **The bees of the world**. Baltimore, Maryland. The Johns Hopkins University Press, 2ed., 953 p., 2007.
- MOMMAERTS, Veerle; JANS, Kris; SMAGGHE, Guy. Impact of Bacillus thuringiensis strains on survival, reproduction and foraging behaviour in bumblebees (*Bombus terrestris*). **Pest Management Science: Formerly Pesticide Science**, v. 66, n. 5, p. 520-525, 2010.
- MORA, Camilo et al. The projected timing of climate departure from recent variability. **Nature**, v. 502, n. 7470, p. 183-187, 2013.
- MORAIS, Lucas da Silva. **Avaliação dos parâmetros espermáticos de zangões de abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. no semiárido nordestino do Brasil**, 2019.
- NOCELLI, Roberta Cornélio Ferreira et al. **Riscos de pesticidas sobre as abelhas. Semana dos Polinizadores**, v. 3, p. 196-212, 2012.
- NOGUEIRA-NETO, Paulo. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Editora Nogueirapis, São Paulo, 1997.
- PAXTON, R. J. Genetic structure of colonies and a male aggregation in the stingless bee *Scaptotrigona postica*, as revealed by microsatellite analysis. **Insectes Sociaux**, v. 47, p. 63-69, 2000.
- PENG, Yan et al. Consequences of Nosema apis infection for male honey bees and their fertility. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 10565, 2015.
- ROUBIK, David W. Stingless Bee (Apidae: Apinae: Meliponini) Ecology. **Annual Review of Entomology**, v. 68, n. 1, p. 231-256, 2023.

SANSINENEA, Estibaliz. **Bacillus thuringiensis biotechnology**. Netherlands: Springer, 2012.

SCHNEPF, E. et al. Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

SCHWENK, Valerie; RIEGG, Janina; LACROIX, Monique; MÄRTLBAUER, Erwin; JESSBERGER, Nadja. Enteropathogenic Potential of Bacillus thuringiensis Isolates from Soil, Animals, Food and Biopesticides. **Foods**, v. 9, n. 10, p. 1484, 17 out. 2020.

SILVA, Érika Ribeiro. **Estudo da cinética e dos mecanismos de fototransformação do corante Acridina Laranja na sua interação com sistemas micro-organizados sob a ação da luz visível**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2010.

STEINIGEWEG, Charlotte et al. Assessment of the impacts of microbial plant protection products containing Bacillus thuringiensis on the survival of adults and larvae of the honeybee (*Apis mellifera*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 29773-29780, 2021.

ULLAH, Amjad et al. Viral impacts on honey bee populations: A review. **Saudi journal of biological sciences**, v. 28, n. 1, p. 523-530, 2021.

VALICENTE, Fernando Hercos. Bacillus thuringiensis. **Natural Enemies of Insect Pests in Neotropical Agroecosystems: Biological Control and Functional Biodiversity**, p. 151-159, 2019.

VALICENTE, Fernando Hercos. Controle biológico da lagarta do cartucho, Spodoptera frugiperda, com Bacillus thuringiensis. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 2008.

VALVERDE, Maria Cleofé; ROSA, Marcelo Barbio. Heat waves in São Paulo State, Brazil: Intensity, duration, spatial scope, and atmospheric characteristics. **International Journal of Climatology**, 2023.

VOLLET-NETO, Ayrton et al. Recent advances in reproductive biology of stingless bees. **Insectes sociaux**, v. 65, p. 201-212, 2018.

VON ZUBEN, Lucas Garcia. **The mating communication of stingless bees (Hymenoptera: Apidae, Meliponini)**. Tese de Doutorado. PhD Thesis, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, 2017. Disponível em:  
<https://pdfs.semanticscholar.org/a17a/92bf85bcc544fd12aebf3b758fd26d45f8fb.pdf>

XAVIER, Vânia Maria et al. **Toxicidade de inseticidas botânicos à Apis mellifera polinizadora do cafeeiro**, 2009.

XU, Yangyang; RAMANATHAN, Veerabhadran; VICTOR, David G. Global warming will happen faster than we think. **Nature**, 2018.

ZATTARA, Eduardo E.; AIZEN, Marcelo A. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. **One Earth**, v. 4, n. 1, p. 114-123, 2021.

ZHAO, Hang et al. Response mechanisms to heat stress in bees. **Apidologie**, v. 52, p. 388-399, 2021.