



El Colegio de la Frontera Sur

Efecto del plaguicida imidacloprid en la supervivencia y el
desarrollo de nidos del abejorro neo-tropical *Bombus*
ephippiatus

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural
con orientación en Entomología Tropical

Por

Alejandra Martínez de Castro Dubernard

2021



El Colegio de la Frontera Sur

San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, a _ de diciembre de 2021.

Las personas abajo firmantes, miembros del jurado examinador de **Alejandra Martínez de Castro Dubernard** hacemos constar que hemos revisado y aprobado la tesis titulada: **Efecto del plaguicida imidacloprid en la supervivencia y el desarrollo de nidos del abejorro neotropical *Bombus ephippiatus***, para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural.

	Nombre	Firma
Director	Rémy Vandame	_____
Asesor	Dave Goulson	_____
Asesora	Lislie Solís Montero	_____
Sinodal adicional	José Pablo Liedo Fernández	_____
Sinodal adicional	Ariane Liliane Jeanne Dor Roques	_____
Sinodal adicional	Alfonso Torres Ruíz	_____

Agradecimientos

A Rémy, por seguir compartiendo conmigo tu inagotable pasión por las abejas, tus conocimientos y experiencias. Gracias por el acompañamiento, el apoyo y las oportunidades que me has brindado.

A Lislíe, quien me ha leído, apoyado y enseñado mucho. Me ha gustado mucho trabajar junto a ti. Gracias por tu gran contribución en este trabajo.

To Dave, it has been a pleasure to learn from you and work beside you. Thank you for all the knowledge you have shared with me and for your contribution in this work.

A Susy Carpio, por la paciencia y apoyo en todos los trámites.

A mis papás Monique y Jorge, por todo el amor que recibo de ustedes todos los días y por ser el pilar de mis logros.

A Jime y Diego, por sostenerme y darme tanto amor. Especialmente este año.

A Ivett y Diana que me leyeron, apoyaron y cuidaron en este proceso.

A mi amiga Luz por tu apoyo y amistad incondicional.

A Néstor, por todo el apoyo con el cuidado de los abejorros.

A Oscar, por leerme y aconsejarme.

Al Equipo Abejas de ECOSUR, aprendo de cada uno de ustedes y admiro su trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo académico brindado a través de la beca 291333.

*A los abejorros mesoamericanos,
en respeto a la gran riqueza y belleza que representan*

Tabla de contenido

Resumen	7
Palabras clave:	7
Capítulo 1: Introducción	8
<i>Diversidad de abejas.....</i>	<i>8</i>
<i>Declive de las abejas.....</i>	<i>8</i>
<i>Abejorros</i>	<i>8</i>
<i>Plaguicidas.....</i>	<i>9</i>
<i>Uso de plaguicidas en México.....</i>	<i>10</i>
<i>Efectos de los plaguicidas en abejorros de regiones templadas.....</i>	<i>11</i>
<i>Abejorro neo-tropical Bombus ephippiatus</i>	<i>14</i>
Capítulo 2: Effects of imidacloprid on survival and nest development in the neo-tropical bumblebee	
<i>Bombus ephippiatus</i>	17
<i>Abstract</i>	<i>18</i>
<i>Key words</i>	<i>19</i>
<i>INTRODUCTION.....</i>	<i>19</i>
<i>MATERIALS AND METHODS.....</i>	<i>22</i>
Bumblebees	22
Food	22
Preparation of pesticide treatments.....	22
Experiment 1: effects of imidacloprid in microcolonies	23
Experiment 2: queenright colony development	23
Statistical analysis	24
<i>RESULTS.....</i>	<i>24</i>
Experiment 1: effects of imidacloprid in microcolonies	24
<i>DISCUSSION</i>	<i>26</i>
<i>Conclusions</i>	<i>27</i>
<i>Author Declarations</i>	<i>29</i>
<i>References</i>	<i>30</i>
<i>Legends.....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 1</i>	<i>42</i>
<i>Figure 2 (a)</i>	<i>43</i>

<i>Figure 2 (b)</i>	44
Capitulo 3: Conclusiones	45
Referencias	48

Resumen

El uso de plaguicidas es una de las causas que contribuye al declive de abejorros en todo el mundo. En particular, los plaguicidas neonicotinoides se consideran altamente tóxicos para las abejas. El imidacloprid es el plaguicida neonicotinoide con más permisos de uso en México, utilizado en más de 70 cultivos; su aplicación en el país es principalmente foliar, seguida de la aplicación por recubrimiento de semillas, situación que hace que los abejorros se vean vulnerables a su exposición. Se conocen algunos efectos de los neonicotinoides a nivel individual, de nido y poblacional en abejorros de clima templado. Sin embargo, no existen estudios realizados con especies de climas neo-tropicales, en las cuales podrían existir efectos distintos debido a que su ecología es diferente. Este es el primer trabajo que involucra el efecto de este insecticida en la especie de abejorro neo-tropical, *Bombus ephippiatus*. Nuestros resultados demuestran que la ingestión de concentraciones de imidacloprid encontradas en campo por *B. ephippiatus* provoca una disminución en sus tasas de supervivencia y afecta el desarrollo del nido de manera negativa, lo que puede conllevar a pérdidas importantes en las poblaciones silvestres. La conclusión más importante de nuestro trabajo es que esta especie de abejorro tropical se ve afectada de la misma manera que las especies templadas ya que reportamos hallazgos similares a los reportados en esas especies. Sugiere una posible extrapolación de los efectos de los plaguicidas en los abejorros tropicales.

Palabras clave: abejas, agricultura, *Bombus*, plaguicidas, toxicología

Capítulo 1: Introducción

Diversidad de abejas

Se estima que en el mundo hay aproximadamente 20,000 especies de abejas, de las cuales alrededor de 2,000 se distribuyen en México. Incluyen especies de abejas solitarias y especies de abejas sociales, perteneciendo al segundo grupo las abejas sin aguijón, las abejas melíferas y los abejorros (Michener 2007; Quezada-Euán y Ayala-Barajas 2010). En cuanto a los abejorros, existen alrededor de 250 especies a nivel mundial, y hasta 2012, se registraron 23 especies en México, algunas de ellas compartidas con Estados Unidos y Centroamérica. En recientes muestreos y colectas realizadas en México, se encontraron ejemplares pertenecientes a 28 especies, algunas nuevas, que aún están en proceso de descripción (Michener 2007; Vandame et al. 2017).

Declive de las abejas

Actualmente existe evidencia de un declive de insectos en todo el mundo (Dirzo et al. 2014; Martin et al. 2018; Forister et al. 2019; Simmons et al. 2019; Wagner 2020), y las abejas no son la excepción, pues varios factores afectan su diversidad y abundancia, como el cambio climático, el uso de monocultivos, la deforestación, la introducción de abejas no nativas y la fragmentación de hábitat; los plaguicidas se consideran una de las principales causas del declive de las abejas y esto incluye el declive de los abejorros (Kearns et al. 1998; Kosior et al. 2007; Goulson et al. 2008; Gixti et al. 2009; Williams y Osborne 2009; Potts et al. 2010; Cresswell 2014; Goulson et al. 2015; Sachman-Ruiz et al. 2015; Carreck 2016; Goulson y Nicholls 2016; Vides-Borrell et al. 2019).

Abejorros

Los abejorros son insectos eusociales (Michener 2007). Forman colonias donde todos los individuos cooperan en el cuidado del nido y hay una división de castas que incluye reinas, obreras y machos. El ciclo de vida de los abejorros generalmente dura un año en zonas templadas (Goulson, 2010). La reina de la colonia muere al final del ciclo y cada año surgen nuevas reinas. En algunas especies tropicales, el clima no limita a las abejas a la obtención de recursos y permite que las colonias sean perenes (Williams et al. 2014).

Los abejorros se consideran polinizadores generalistas, pues visitan un gran número de especies de plantas y tienen un papel importante en la polinización de especies nativas (Plowright 1984; Goulson 2010; Hatfield et al. 2012; Williams et al. 2014). Algunas de las características ecológicas de los abejorros los hacen sensibles a los cambios ambientales; en particular, porque la generación de individuos reproductores ocurre al final del ciclo y los cambios en el ambiente pueden afectar el desarrollo de sus colonias y reproducción (Colla y Packer 2008; Ramírez y González 2009).

Existe evidencia de una disminución de abejorros de Norteamérica y Europa (Kosior et al. 2007; Colla y Packer 2008; Goulson et al. 2008), la principal razón de esto es la intensificación de la agricultura, con el desarrollo de fertilizantes artificiales, monocultivos, fragmentación del hábitat, cambio climático y el uso de plaguicidas (Goulson et al. 2008). El uso comercial de abejorros exóticos también tiene un efecto negativo en las poblaciones de abejorros nativos, ya que causan la diseminación de enfermedades y en algunas regiones como América del Sur, existe competencia por recursos como alimento y sitios de anidación entre abejorros exóticos y nativos (Morales 2007; Otterstatter y Thomson 2008; Sachman-Ruiz et al. 2015; Gallot-Lavallée et al. 2016).

Con la intensificación de la agricultura, el uso de plaguicidas ha aumentado significativamente, situación que da lugar a una exposición constante de los abejorros a estos químicos durante la búsqueda de alimento (Mommaerts et al. 2010; Goulson et al. 2015). Esta exposición podría afectar a las poblaciones de abejorros de forma directa o indirecta, pues los insecticidas matan a las abejas y los herbicidas matan a su alimento (Williams y Osborne 2009).

Plaguicidas

Los plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas) se utilizan para la protección contra plagas y enfermedades de cultivos y plantas; sin embargo, algunas moléculas, principalmente los insecticidas, tienen el potencial de afectar a los polinizadores

silvestres, como las abejas, afectando su ciclo de vida, diversidad y abundancia. Dentro de los grupos de plaguicidas se encuentran los neonicotinoides, que son una familia de agroquímicos relativamente nueva, ya que fueron introducidos al mercado a mediados de los noventa, siendo hoy el grupo de agroquímicos más utilizado a nivel mundial (Casida y Durkin 2013; Blake y Copping 2017; Wood y Goulson 2017).

Los principios activos que componen el grupo de los neonicotinoides son: acetamiprid, imidacloprid, clotianidina, dinotefuran, nintenpiram, tiacloprid y tiametoxam (Simon-Delso et al. 2015) y se consideran moléculas neuroactivas por su modo de acción, que afecta a los receptores colinérgicos nicotínicos del sistema nervioso, no solo en insectos plaga, sino también en insectos benéficos y en mamíferos, aves, peces y reptiles (Maienfisch et al. 2001; Tomizawa y Casida 2005; Kindemba 2009; Blake y Copping 2017; Taillebois et al. 2018). Este grupo de plaguicidas se considera altamente tóxico para las abejas (Suchail 2000). Se aplican con frecuencia como tratamientos de semillas, y su solubilidad en agua, así como el potencial de lixiviación, provocan la contaminación de los suelos cercanos a los cultivos, donde se pueden encontrar residuos hasta tres años después del tratamiento (Botías et al. 2015). Debido a que estos insecticidas son sistémicos, son absorbidos por las plantas del suelo y transportados a través de sus tejidos y de su sistema vascular, siendo biodisponibles para las abejas y otros polinizadores en concentraciones subletales a través del polen y néctar de cultivos y plantas silvestres (Alkassab y Kirchner 2017; Blake y Copping 2017; Botías 2016).

Uso de plaguicidas en México

En México, la introducción y el uso de plaguicidas químicos resulta del paradigma tecnológico de la modernización capitalista, conocido como la Revolución Verde y adoptado desde la década de 1940 (Bejarano González 2017). Este modelo agrícola surge como el modelo a seguir en el camino hacia el desarrollo económico del país, instaurado primero en Estados Unidos y más tarde trasladado e implantado en México. Dentro de este paradigma se propone una agricultura industrial intensiva, dependiente

de diversos insumos como semillas, fertilizantes, maquinaria y plaguicidas (Cortines de Nava 2007; Bernardino Hernández et al. 2014; Bejarano González 2017).

Según registros de la Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), la mayoría de los permisos otorgados actualmente para el uso de plaguicidas en México, en el caso de los neonicotinoides, son para el uso del imidacloprid (**Fig. 1**). Los permisos están registrados para su aplicación en más de 70 tipos de cultivos, y el 62% se aplica de forma foliar, seguido del 14% de aplicación por recubrimiento de semillas (COFEPRIS, 2020), lo que supondría un alto nivel de residuos de imidacloprid disponible para exposición de abejorros.

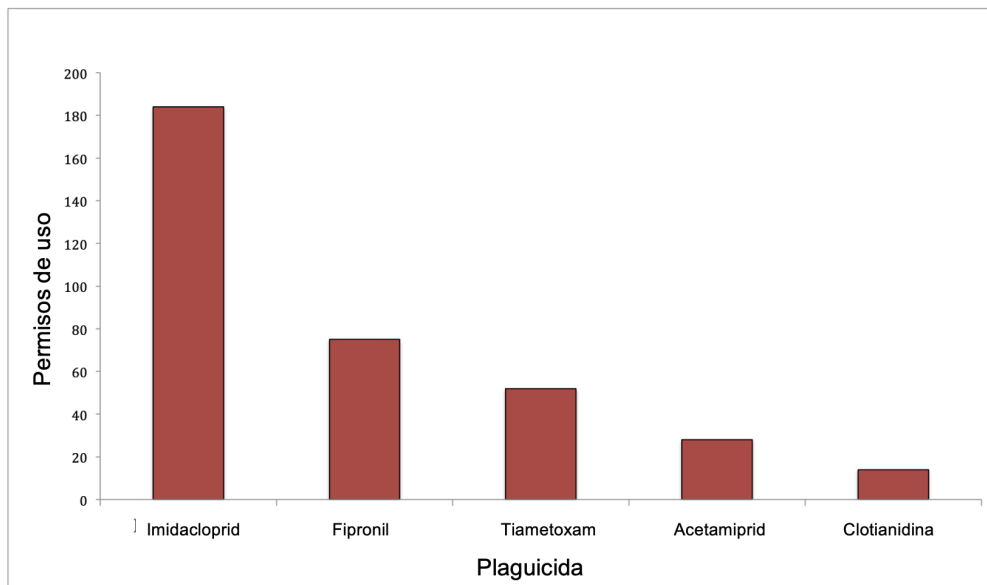


Figura 1. Permisos para el uso de plaguicidas neonicotinoides en México en el 2020

Efectos de los plaguicidas en abejorros de regiones templadas

Después de la aparición de los neonicotinoides en el mercado, gran cantidad de estudios evalúan sus efectos en las abejas, desde el fisiológico y el conductual (Suchail et al. 2000; Wilson et al. 2013; Moffat et al. 2015; Stanley et al. 2015; Straub et al. 2016), hasta cómo estos se reflejan en el nido (Tasei et al. 2000; Morandin y Winston 2003; Gill et al. 2012; Stanley y Raine 2017) y cómo afectan el vuelo y la polinización (Feltham et al. 2014; Whitehorn et al. 2017; Lämsä et al. 2018; Muth y Leonard 2019),

así como la diversidad y abundancia (Kim et al. 2006; Vides-Borrell et al. 2019). Es importante conocer estos efectos ya que los abejorros son considerados un grupo ecológico económicamente importante, debido a su papel polinizador que favorece directamente la diversidad de las comunidades vegetales (Muth y Leonard 2019) y la seguridad alimenticia (Wagner 2020).

A nivel celular, en un estudio realizado en el cerebro de *B. impatiens* luego de ser expuesto al neonicotinoide imidacloprid en condiciones de invernadero, se encontró una inhibición del crecimiento neuronal en obreras mayores de trece días de edad (Wilson et al. 2013). Moffat et al. (2015) demostraron que la exposición a dosis utilizadas en campo de clotianidina e imidacloprid provoca una acumulación de estas sustancias químicas en el cerebro de *B. terrestris audax* en solo tres días y provoca una despolarización constante en las mitocondrias neuronales.

Stanley et al. (2015) evaluaron el efecto de dos concentraciones de tiametoxam (2,4 y 10 ppb), con exposiciones agudas (1 día) y crónicas (24 d) sobre el rendimiento del aprendizaje olfativo mediante el reflejo de extensión de la probóscide y en la memoria de *B. terrestris*. Los abejorros de este experimento fueron entrenados para asociar un olor como predictor de recompensa, lo que permitió evaluar la capacidad de entrenamiento, el nivel de aprendizaje, la velocidad de aprendizaje y la memoria. En cuanto a las respuestas a dosis agudas de plaguicida, la exposición afectó la capacidad de entrenamiento y el nivel de aprendizaje, y en el caso de los abejorros expuestos a dosis crónicas de plaguicida, la velocidad de aprendizaje y la memoria se vieron afectadas. Por el contrario, en un estudio realizado con clotianidina con dosis sub-letales crónicas (0.3-5.4 ppb, 10 d) en *B. terrestris*, no se encontró ningún efecto sobre la memoria y el aprendizaje de los individuos (Piiroinen et al. 2016).

A nivel de nido, estudios de laboratorio con diferentes dosis de imidacloprid y tiametoxam muestran que existe una reducción en la producción de crías del abejorro *B. terrestris* (Tasei et al. 2000; Mommaerts et al. 2010; Laycock y Cresswell 2013; Laycock et al. 2014). En un experimento de once semanas con abejorros en

invernaderos, con el abejorro norteamericano *B. impatiens*, donde los abejorros fueron expuestos a imidacloprid y clotianidina, se demostró que una exposición crónica a 20 ppb de ambos ingredientes activos aumenta la tasa de mortalidad de las reinas. Además, se redujo el número de machos producidos por colonia y se afectó la capacidad de alimentación de las obreras (Scholer y Krischik 2014). También se han demostrado efectos negativos en el desarrollo de nidos en varios otros estudios, donde la producción de cría y de sexuales se vio afectada negativamente por la exposición a neonicotinoides (Gill et al. 2012; Whitehorn et al. 2012; Larson et al. 2013; Feltham et al. 2014; Scholer y Krischik 2014; Rundlöf et al. 2015; Dance et al. 2017; Stanley y Raine 2017; Crall et al. 2018).

Con respecto al comportamiento de forrajeo y alimentación, existen estudios realizados en campo y en laboratorio. Gill (2012) monitoreó abejorros en campo expuestos a imidacloprid, y mediante el uso de etiquetas de identificación por radiofrecuencia encontró que la exposición crónica (28 d) a una concentración de 10 ppb disminuye la capacidad de colecta de polen en obreras de *B. terrestris*, provocando menos ingreso de comida a los nidos. Además, en comparación con el grupo control, un 50% más de obreras nunca regresaron al nido, lo que se atribuye al hecho de que se perdieron y no supieron cómo regresar. Se encontraron resultados similares con concentraciones más bajas de imidacloprid, 30 ppb (6 semanas), 6 ppb y 0.7 ppb (4 semanas), que afectaron la tasa de forrajeo y la capacidad de colecta de polen respectivamente (Morandin y Winston 2003; Feltham et al. 2014).

Los efectos a nivel individual y en las colonias tienen consecuencias para las poblaciones y la diversidad. Relacionado a esto, se han encontrado efectos sobre las poblaciones y la diversidad de abejorros. Kim et al. (2006) realizaron muestreos en áreas protegidas y áreas de cultivo de girasol. En las áreas protegidas, se encontraron nidos de *B. californicus*, *B. crotchii*, *B. melanopygus*, *B. pennsylvannicus* y *B. vosnesenskii*, mientras que en las áreas de cultivo no se encontraron nidos. En un estudio sobre diversidad y abundancia de abejas en diferentes usos de suelo en Campeche, México, evaluando policultivos, pastizales y monocultivos, se encontró una

mayor diversidad y abundancia de especies de abejas en policultivos y una menor diversidad y abundancia en monocultivos (Vides-Borrell et al. 2019). Si bien existen muchas variables que pueden afectar los resultados de estos estudios, una de las que se consideran es la presencia de plaguicidas en áreas de cultivo intensivo.

Los efectos sub-letales de estos plaguicidas son evidentes a varios niveles, sin embargo, el uso de diferentes concentraciones en diferentes cultivos y regiones genera confusión al comparar resultados y existen dificultades para identificar los estudios más confiables. Estos estudios se han realizado con las especies de abejorro de Europa y Norteamérica *B. terrestris* y *B. impatiens* respectivamente, que son especies comerciales y fáciles de criar. Vinculado a esto, al buscar una alternativa para la polinización con una especie nativa de México, se logró la crianza del abejorro mesoamericano *B. ephippiatus* (Martínez de Castro Dubernard 2019), lo que también permitió comenzar a estudiarlo en condiciones controladas y conocer de cerca lo que sucede en los abejorros tropicales.

Abejorro neo-tropical *Bombus ephippiatus*

El abejorro *B. ephippiatus* es una especie tropical distribuida en México y Centroamérica. Es considerada la especie con mayor distribución en México, ya que está presente en casi todo el territorio, desde Chihuahua hasta Chiapas y entre altitudes que van desde los 800 a los 3400 metros sobre el nivel del mar (Labougle 1990; Chavarría-Villaseñor 1996; Fuentes Montemayor y Madrid Cuevas 2003). A diferencia de las especies de clima templado, las reinas de *B. ephippiatus* no hibernan y comienzan un nuevo ciclo después del apareamiento. Las colonias de esta especie están activas todo el año y hemos observado que en condiciones de laboratorio, este abejorro presenta dos ciclos de vida en un año (**Fig. 2**). Cada uno consta de un período de seis meses, ocurriendo la reproducción en los meses de enero y febrero, y en julio y agosto (Martínez de Castro Dubernard 2019). La presencia de abejorros en ambientes neo-tropicales sugiere que estas especies pueden mostrar la plasticidad necesaria para adaptarse a las condiciones ambientales (Woodard 2017). Las funciones fisiológicas como las respuestas inmunitarias, las estrategias térmicas, la respuesta de

desintoxicación, la susceptibilidad a las enfermedades y los pesticidas pueden variar entre las especies de abejorros y sus contextos ecológicos (Arena y Sgolastra 2014; Woodard 2017).

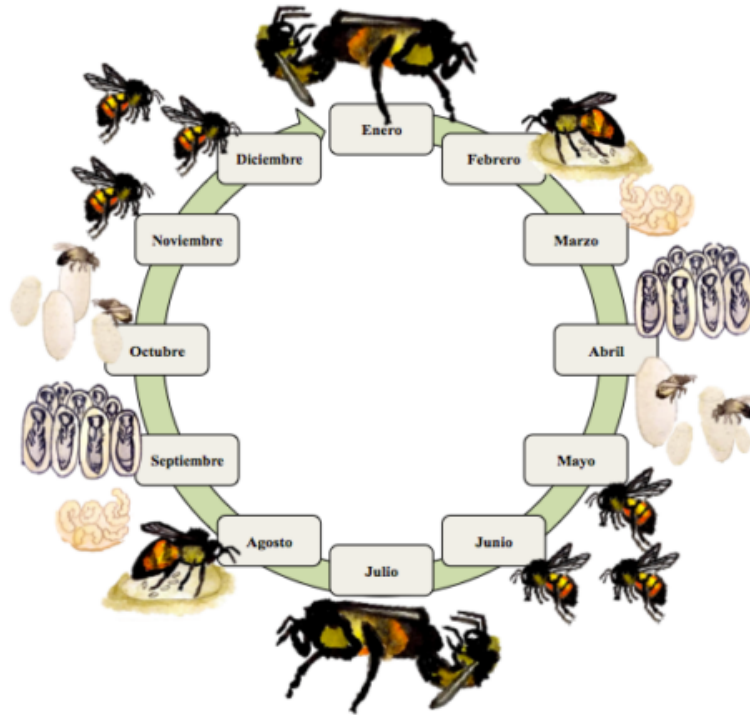


Figura 2. Calendario de *B. ephippiatus* bajo condiciones de laboratorio. Elaborado por Alejandra Martínez de Castro Dubernard.

La investigación de abejorros en Mesoamérica se ha centrado en el campo de la taxonomía, el muestreo, la cría, el cambio climático, diversidad genética, enfermedades, polinizadores manejados y las recomendaciones a las políticas públicas sobre la comercialización de abejorros (Torres-Ruiz y Jones 2012; Gallot-Lavallée et al. 2016; Duennes et al. 2017; Williams et al. 2020; Martínez-López et al. 2021), pero se sabe poco sobre el efecto de los plaguicidas en abejorros tropicales.

Debido a las diferencias eco-fisiológicas mencionadas anteriormente, el efecto de los plaguicidas podría ser diferente para las especies tropicales. Es por ello, que en este trabajo pretendemos indagar sobre las consecuencias que tiene el imidacloprid en los abejorros tropicales cuando se exponen en el campo a niveles realistas de residuos de

imidacloprid en néctar y polen, es decir, niveles que se han encontrado de este plaguicida en campo. Se han realizado muchos estudios en regiones templadas sobre el efecto de los neonicotinoides en abejorros, sin embargo, este es el primer estudio realizado en Mesoamérica y específicamente, el primer estudio realizado con una especie neo-tropical.

Dado que los abejorros se consideran importantes polinizadores, además de considerar el importante uso de plaguicidas en la agricultura en países tropicales como México, particularmente el imidacloprid, es importante determinar los efectos de una dieta contaminada con imidacloprid en abejorros tropicales. Su efecto sobre el desarrollo de los nidos, que es un aspecto clave para la supervivencia de las colonias de abejorros, es de particular interés. *Bombus ephippiatus* tiene una amplia distribución en la región mesoamericana y el imidacloprid es un pesticida muy utilizado en el país, por lo que el estudio de los efectos del imidacloprid sobre esta especie podría dar una indicación de lo que está sucediendo con los abejorros en toda la región.

Capítulo 2: Effects of imidacloprid on survival and nest development in the neotropical bumblebee *Bombus ephippiatus*

Effects of imidacloprid on survival and nest development in the neo-tropical bumblebee

Bombus ephippiatus

Alejandra Martínez de Castro Dubernard^{a*}, Dave Goulson^b, Lislíe Solís Montero^{a,c}, Rémy Vandame^a

^a Departamento Agricultura, Sociedad y Ambiente, El Colegio de la Frontera Sur, Chiapas, Mexico

^b School of Life Sciences, University of Sussex, Brighton, United Kingdom

^c El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico city, Mexico

* Corresponding author: El Colegio de la Frontera Sur, Carretera Panamericana y Periférico Sur s/n, Barrio María Auxiliadora, San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, Mexico - Tel 967 674 9022

- Email ale.mdc@gmail.com

Abstract — The use of pesticides is one of the causes that contribute to the decline of bumblebees worldwide. Some effects of neonicotinoids are known on bumblebees from temperate climates; however, there are no studies carried out with species from tropical climates, in which there could be different effects, since they have different ecological traits. We demonstrated that in a neo-tropical bumblebee, *Bombus ephippiatus*, exposed to field realistic levels of imidacloprid, bee survival and colony growth were significantly reduced. The most important conclusion of our study is that tropical bumblebees are affected in a similar way to temperate species.

Key words: agriculture, bees, *Bombus*, pesticides, toxicology

INTRODUCTION

Whether pesticides have the same effects on the little-known tropical bumblebee species colonies as they do on the temperate ones is a question to be addressed. To address this topic with bumblebees of Mexico, it is necessary to synthesize the state of knowledge, first of pesticide effects on bees, and then of bumblebees in Mexico.

Bees are considered the most important insect pollinator (Greenleaf et al. 2007) and their pollination services are crucial for food production (Wagner 2020). Currently, there is evidence of insect decline around the world (Dirzo et al. 2014; Martin et al. 2018; Forister et al. 2019; Simmons et al. 2019; Wagner 2020) and wild bees are not the exception. Several factors are driving declines in bee diversity and abundance, including climate change, monocultures, deforestation, introduction of non-native bees, and habitat fragmentation. In addition, pesticides are considered to be one of the main causes of wild bee decline, and they have been the subject of considerable research (IPBES 2016).

As an integral part of the intensification of agriculture, pesticide use has increased significantly, leading to a chronic exposure of bumblebees to these chemicals during foraging in arable landscapes (Goulson et al. 2015; Mommaerts et al. 2010). Pesticides could affect populations of bumblebees directly or indirectly; while insecticides directly harm the bees, herbicides suppress the food they get from weeds (Williams and Osborne 2009). Neonicotinoids are a relatively new family of insecticides, introduced into the market in the mid-nineties and being today the most widely used group of insecticides worldwide (Casida and Durkin 2013; Blake and Copping 2017; Wood and Goulson 2017).

The active ingredients that make up the neonicotinoids group are: acetamiprid, imidacloprid, clothianidin, dinotefuran, nitenpyram, thiacloprid and thiamethoxam (Simon-Delso et al. 2015). They are considered neuroactive molecules due to their mode of action, which affects the nicotinic cholinergic receptors of the nervous system, not only in pest insects but also in beneficial insects and other animals (Maienfisch et al. 2001; Tomizawa and Casida 2005; Kindemba 2009; Blake and Copping 2017; Taillebois et al. 2018). These pesticides are frequently applied as seed treatments, and their solubility in water, as well as the potential for leaching, causes contamination of soils, where residues can be found up to three years after treatment (Botías et al. 2015). Because these insecticides are systemic, they are absorbed by plants from the soil and transported throughout their tissues via the vascular system, being bioavailable to bees and other pollinators in sub-lethal concentrations through pollen and nectar from crops and wild plants (Alkassab and Kirchner 2017; Blake and Copping 2017; Botías 2016). Furthermore, this group of pesticides is considered to be highly toxic for bees (Suchail 2000).

In Mexico, the introduction and use of chemical pesticides results from the technological paradigm of capitalist modernization, known as the Green Revolution and adopted since the 1940's (Bejarano González 2017). According to records of the COFEPRIS (Federal Commission for the Protection of Sanitary Risks), most of the permits granted in Mexico these days regarding neonicotinoids are for imidacloprid. The permissions are registered for their application in more than 70 crops, and 62% are foliar applications, followed by 14% of seed coating application (COFEPRIS 2020), so there is considerable potential for bumblebees to be exposed to imidacloprid in Mexico.

Due to their role as pollinators, bumblebees are important species in ecosystems, being eusocial bees with an annual life cycle. They are considered as generalists, for visiting a large number of

plant species, and they have an important role in pollination of native plants in temperate and mountainous regions (Plowright 1984; Williams et al. 2009; Goulson 2010; Hatfield et al. 2012; Williams et al. 2014).

Unlike temperate bumblebees, colonies of neo-tropical bumblebee species are not seasonal, and have active colonies year-round, meaning that queens do not hibernate and start a new nest after having mated (Chavarría-Villaseñor 1996). Physiological functions such as immune responses, thermal strategies, detoxification response, susceptibility to disease and pesticides can vary across bumblebee species and could plausibly be different in neotropical bumblebees compared to the better-studied temperate species (Arena and Sgolastra 2014; Woodard 2017).

Bumblebee research in Mesoamerica has been focused in the field of taxonomy, sampling, rearing, climate change and recommendations to policy makers about bumblebee commercialization (Williams et al. 2020; Martínez-López et al. 2021), and little is known about the effect of pesticides in tropical bumblebees. For this reason, in this work, we intend to inquire about the consequences that imidacloprid has in tropical bumblebees when exposed to field realistic levels of imidacloprid in nectar and pollen. Many studies have been made in temperate regions regarding the effect of neonicotinoids in bumblebees; however, this is the first study made in Mesoamerica and specifically, with a neo-tropical species.

Because bumblebees are considered important pollinators, as well as considering the important use of pesticides in agriculture in tropical countries such as Mexico, particularly imidacloprid, it is important to determine the effects of a diet contaminated with imidacloprid in tropical bumblebees. Their effect on nest development, which is a key aspect for the survival of bumblebee colonies, is of particular interest. *Bombus ephippiatus* is widely distributed in the

Mesoamerican region and imidacloprid is a highly used pesticide in the country, so studying imidacloprid effects on this species can provide an indication as to what is happening with bumblebees in the entire region.

MATERIALS AND METHODS

Bumblebees

We studied the neo-tropical bumblebee species *B. ephippiatus*. Colonies to be used were raised in the laboratory and came from queens collected at different sites in San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, Mexico. The bumblebees used in this experiment are the fifth generation reared in captivity. In the case of the experiments starting with mated queens, the queens used were mated days before in the El Colegio de la Frontera Sur bumblebee mating room. Bumblebee colonies were maintained in the laboratory at 27 °C, with a relative humidity of 60%, and under red light.

Food

All colonies of bumblebees in this study were fed with fresh pollen from the region collected by the bee *Apis mellifera*. To ensure that the pollen was not contaminated, we made sure that it came from a pesticide-free zone from a coffee plantation in Chiapas and a colony-feeding test was also done to detect possible intoxication. To obtain a single uniform pollen source, the pollen grains were liquefied and mixed with distilled water (pollen: water, 3: 1). As a substitute for nectar, bees were given 50% fructose syrup *ad libitum*.

Preparation of pesticide treatments

The imidacloprid was mixed in its pure form with the fructose syrup and with the pollen for the colonies that received treatment. For this, imidacloprid stock solutions were prepared with purified distilled water. To achieve the desired concentrations for both treatments, these solutions

were first diluted in the water that would be used for pollen and syrup preparation. We used a low dose of 2 ng/g and a high dose of 10 ng/g, administrated with pollen and sugar syrup. Doses were chosen based on a literature review of imidacloprid residues in pollen and nectar (Bonmatin et al. 2015; David et al. 2016; Wood and Goulson 2017). The dose of 2 ng/g is close to the lowest found value, and the dose of 10 ng/g is slightly above the average. Effects of imidacloprid on worker survival rate in microcolonies and nest development in queenright colonies were evaluated. Two experiments were carried out.

Experiment 1: effects of imidacloprid in microcolonies

Newly emerged workers from five *B. ephippiatus* queenright source colonies were randomly selected and five of them were placed in each of the queen-less microcolony cages. Each microcolony contained workers from the same queenright colony. Cages consist of three sidewalls (14 cm x 6.3 cm x 6.3 cm) and a 1 cm thick wooden lid. The front face is a sliding glass plate 2 mm thick (12.6 cm x 5 cm), and as a base they have a rack located 2 cm above ground to ventilate the nest. A plastic perforated tube was used as syrup feeder and a Petri dish lid was put inside to provide a solid base for nest building and as a feeder to administrate pollen. Microcolonies were divided and randomly assigned into three treatment groups of 25 microcolonies each: control (without pesticides), low dose (2 ng/g) and high dose (10 ng/g) of pesticide. Before the exposure to imidacloprid, workers were fed *ad libitum* with control (no pesticide) syrup for 24 h to acclimatize them to the experimental conditions. Dead bees during this acclimation time were replaced with workers from a queenright colony. Microcolonies were maintained for 40 days; during this period, first day of egg laying, number of males produced, male weight, and mortality were measured.

Experiment 2: queenright colony development

For measuring nest development, five queenright colonies were exposed to each of the previously described treatments (control, 2 ng/g, 10 ng/g). Colonies had one queen and 50 ± 5 workers when treatment began. Growth of the colony was measured by counting the brood (number of cells with eggs, larvae, and pupae), number of workers and mortality every two days. Colonies were exposed to treatments for 40 days.

Statistical analysis

We conducted a survival analysis (Kaplan-Meier method) using the survival package (Therneau and Grambsch 2000) in R statistical software ver. 3.6.0 (R Core Development Team 2019) to compare survivorship curves across treatments in microcolonies. We represented graphically the survival probability, using the survminer package (Alboukadel and Kosinski 2019). Dates of detection of egg laying in microcolonies, amount of brood and number of workers in queenright colonies were each compared across treatments using Kruskal-Wallis tests.

RESULTS

Experiment 1: effects of imidacloprid in microcolonies

Workers exposed to 10 ppb of imidacloprid never started a nest. Of the untreated microcolonies and the microcolonies exposed to 2 ppb of imidacloprid, 16 and 14 microcolonies started a nest respectively ($p > 0.01$). Figure 1 shows that during the first twelve days of the experiment, there was a 100% survival rate for the control microcolonies. In contrast, for microcolonies exposed to 2 ng/g and 10 ng/g of imidacloprid, the mortality started to increase at day 6 and at day 4 of the experiment, respectively. All microcolonies exposed to 10 ng/g of imidacloprid were dead by day 31 of exposure. All microcolonies exposed to 2 ng/g of imidacloprid were dead by the day 35 of exposure ($p < 0.01$).

Five males were born from untreated microcolonies, and their average weight was 0.1300 ± 0.0067 g. Only one male was born in a microcolony exposed to the lowest concentration of imidacloprid and its weight was 0.1233 g. No males were born from microcolonies exposed to 10 ng/g of imidacloprid since the bees never started a nest.

Experiment 2: queenright colonies development

For colonies exposed to 10 ng/g of imidacloprid, the number of workers decreased over the time of exposure. Similar to results for the microcolonies, all workers of queenright colonies exposed to the highest pesticide concentration were dead by day 31 of the experiment; this means that there was a decrease in the birth of bees and there was an increase in the mortality of bees. In contrast, in the control colonies, which did not receive treatment, the number of workers increased through the study. On the other hand, queenright colonies exposed to 2 ng/g of imidacloprid, had an approximately constant number of workers, where the mortality and the birth of bees were similar. Mortality was higher than in the control colonies, but lower than colonies exposed to 10 ng/g of imidacloprid ($p < 0.01$). The number of workers emerging in the colonies exposed to 2 ng/g was less than control colonies, but higher than the colonies exposed to 10 ng/g of imidacloprid ($p < 0.01$) (**Fig. 2a**). The amount of brood in nests exposed to imidacloprid had a similar pattern to the number of workers. Nests exposed to 10 ng/g had a decreasing amount of brood over the days of exposure. Nests exposed to 2 ng/g had an approximately constant amount of brood until a sudden decrease occurred on day 36. For the case of untreated colonies, amount of brood showed a constant number, and an abrupt increase by day 36 ($p < 0.01$) (**Fig. 2b**).

DISCUSSION

We demonstrated that, in the neo-tropical bumblebee *B. ephippiatus*, bee survival was significantly affected when colonies were exposed to low and high doses of imidacloprid. In addition, we showed a negative relationship between the amount of imidacloprid in food and worker survival rates. This suggests a chronic lethal effect in *B. ephippiatus* through constant exposure to imidacloprid.

Our study shows that the use of microcolonies of five workers is useful to compare worker survival across the exposure of different treatments, as this lets us standardize small and homogenous colonies. However, the use of microcolonies is not useful to determine the effects of imidacloprid on the brood, because there is an early mortality of workers, which does not allow time for egg laying and care of the nest.

Nest development was affected in a negative way in the case of queenright colonies exposed to imidacloprid, showing again a negative relationship between the number of workers and brood, and the concentration of imidacloprid in pollen and nectar consumed.

In our experiment, behavioral changes were observed in the bees exposed to imidacloprid, such as incoordination, inability to fly and defend the nest, abandoned brood and loss of incubation. These effects on nest and bumblebee behavior have also been observed in *B. impatiens* when exposed to this insecticide (Crall et al. 2018), which could be a reason why the amount of brood decreased in nests that were exposed to a higher dose of imidacloprid. Decrease in the amount of brood could also be because of a lack of nest care due to the mortality of workers or to reduced fecundity, as it has been found that there is a significant reduction in ovarian development and fecundity of workers of *B. terrestris* after ingesting

environmentally realistic levels of imidacloprid (Laycock et al. 2012). Imidacloprid could also be affecting brood development directly.

The most important finding in our research is to show that the effects of imidacloprid on colonies of tropical bumblebee species are similar to those reported for bumblebees from temperate climates. For example, survival rates reported in our study were similar to survival rates found in the European bumblebee *B. terrestris* when exposed to imidacloprid (Tasei et al. 2000; Mommaerts et al. 2010; Gill et al. 2012; Scholer and Krischik 2014). Colony growth was also affected in *B. terrestris* colonies exposed to this neonicotinoid (Whitehorn et al. 2012), suggesting a possible extrapolation for pesticides effects on tropical bumblebees, including effects on foraging and studies carried out in the field.

Our results demonstrate that the ingestion by *B. ephippiatus* of field realistic concentrations of imidacloprid causes a decrease in survival rates and affects nest development negatively. This could lead to significant losses in wild populations, since the production of males and queens occurs at the end of the life cycle and exposed nests would never reach this point, as the inputs brought to the nest by workers are essential to reach this stage.

This is the first work involving the effect of imidacloprid in a neo-tropical bumblebee species and studies with more species should be carried out.

Conclusions

The most important conclusion of our study is that tropical bumblebees, at least in the case of *B. ephippiatus*, are affected by the insecticide imidacloprid in the same way as temperate species. Because imidacloprid is applied in more than 70 kinds of crops in Mexico, we suggest these effects could be commonly occurring in wild populations of native bumblebees. The transition to a more sustainable agriculture and the reversal of agricultural landscape simplification offer

strategic responses to the risks associated with the exposure of pesticides in wild pollinators. Bumblebees are considered important pollinators for wildflowers and crops, and we urge measures to reduce pesticide use, in which it is worth mentioning the promotion of integrated pest management, complemented by farmer education, organic agriculture and policies to reduce pesticide use globally.

Author Declarations

Funding

This research was made possible by the master's scholarship assigned to the first author by the National Council for Science and Technology of Mexico (CONACYT). It was supported by grant 291333 from SADER-CONACYT.

Declaration of competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Availability of data and material

Data will be made available on reasonable request.

Code availability

Analyses are standard procedure, but our custom code, if requested, can be provided.

Authors' contributions

Study conception and design was made by all the authors. Material preparations, data collection and analysis were performed by Alejandra Martínez de Castro Dubernard. Lislíe Solís-Montero also performed analysis. Alejandra Martínez de Castro Dubernard wrote the first draft of the manuscript and Lislíe Solís Montero, Dave Goulson and Rémy Vandame participated on review and editing. Funding acquisition was made by Alejandra Martínez de Castro Dubernard and Rémy Vandame. Resources were provided by Rémy Vandame.

Ethics approval: Not applicable

Consent to participate: Not applicable

Consent for publication: Not applicable

References

Alboukadel, K., and Kosinski, M. (2019). *Survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'*. R package version 0.4.4.

Alkassab AT, Kirchner WH. 2017. Sublethal exposure to neonicotinoids and related side effects on insect pollinators: honeybees, bumblebees, and solitary bees. *J Plant Dis Prot.* 124(1). doi:10.1007/s41348-016-0041-0.

Arena M, Sgolastra F. 2014. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology.* 23(3):324–334. doi:10.1007/s10646-014-1190-1.

Bejarano González F. 2017. *Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México*. 1st ed. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México AC (RAPAM), editor. Texcoco, Estado de México.

Bernardino Hernández HU, Mariaca Méndez R, Nazar Beutelspacher A, Álvarez Solís JD, Torres Dosal A, Herrera Portugal C. 2014. *Los plaguicidas en los Altos de Chiapas: Soluciones que matan*. ECOSUR, editor.

Blake RJ, Copping LG. 2017. Are neonicotinoids killing bees? *Pest Manag Sci.* 73(7):1293–1294. doi:10.1002/ps.4604.

Bonmatin JM, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, Long E, Marzaro M, Mitchell EA, et al. 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ Sci Pollut Res.* 22(1):35–67. doi:10.1007/s11356-014-3332-7.

Botías C, David A, Hill EM, Goulson D. 2016. Contamination of wild plants near neonicotinoid seed-treated crops, and implications for non-target insects. *Sci Total Environ.* 566–567:269–278. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.065. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.065>.

Botías C, David A, Horwood J, Abdul-Sada A, Nicholls E, Hill E, Goulson D. 2015. Neonicotinoid Residues in Wildflowers, a Potential Route of Chronic Exposure for Bees. *Environ Sci Technol.* 49(21):12731–12740. doi:10.1021/acs.est.5b03459.

Carreck N. 2016. *Decline of Bees and Other Pollinators.* Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394847-2.00008-5>.

Casida JE, Durkin KA. 2013. Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annu Rev Entomol.* 58(1):99–117. doi:10.1146/annurev-ento-120811-153645.

Chavarría-Villaseñor G. 1996. *Systematic and Behavior of the Neotropical Bumble Bees (Hymenoptera: Apidae: Bombus).* Thesis.(February).

COFEPRIS. Consulta de Registros Sanitarios de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y LMR. <http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.asp>.

Colla SR, Packer L. 2008. Evidence for decline in eastern North American bumblebees (Hymenoptera: Apidae), with special focus on *Bombus affinis* Cresson. *Biodivers Conserv.* 17(6):1379–1391. doi:10.1007/s10531-008-9340-5.

Cortines de Nava C. 2007. *Situación en México de las existencias de plaguicidas sujetos al convenio de Estocolmo.* Cd. de México, México.

Crall JD, Switzer CM, Oppenheimer RL, Ford Versypt AN, Dey B, Brown A, Eyster M, Guérin C, Pierce NE, Combes SA, et al. 2018. Neonicotinoid exposure disrupts bumblebee nest behavior, social networks, and thermoregulation. *Science* (80-). 362(6415):683–686. doi:10.1126/science.aat1598.

Cresswell J. 2014. On the natural history of neonicotinoids and bees. *Funct Ecol.* 28(6):1311–1312. doi:10.1111/1365-2435.12319.

Dance C, Botías C, Goulson D. 2017. The combined effects of a monotonous diet and exposure to thiamethoxam on the performance of bumblebee micro-colonies. *Ecotoxicol Environ Saf.* 139(November 2016):194–201. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.01.041. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.041>.

David A, Botías C, Abdul-Sada A, Nicholls E, Rotheray EL, Hill EM, Goulson D. 2016. Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. *Environ Int.* 88:169–178. doi:10.1016/j.envint.2015.12.011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.011>.

Dirzo R, Young HS, Galetti M, Ceballos G, Isaac NJB, Collen B. 2014. Defaunation in the Anthropocene. *Science (80-)*. 345(6195):401–406. doi:10.1126/science.1251817.

Duennes MA, Petranek C, de Bonilla EPD, Mérida-Rivas J, Martínez-López O, Sagot P, Vandame R, Cameron SA. 2017. Population genetics and geometric morphometrics of the *Bombus ephippiatus* species complex with implications for its use as a commercial pollinator. *Conserv Genet.* 18(3):553–572. doi:10.1007/s10592-016-0903-9.

Feltham H, Park K, Goulson D. 2014. Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. *Ecotoxicology.* 23(3):317–323. doi:10.1007/s10646-014-1189-7.

Forister ML, Pelton EM, Black SH. 2019. Declines in insect abundance and diversity: We know enough to act now. *Conserv Sci Pract.* 1(8):1–8. doi:10.1111/csp2.80.

Fuentes Montemayor E, Madrid Cuevas A. 2003. *Biología de Bombus ephippiatus* Say (Hymenoptera, Apidae).

Gallot-Lavallée M, Schmid-Hempel R, Vandame R, Vergara CH, Schmid-Hempel P. 2016. Large scale patterns of abundance and distribution of parasites in Mexican bumblebees. *J*

Invertebr Pathol. 133:73–82. doi:10.1016/j.jip.2015.12.004.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.12.004>.

Gill RJ, Ramos-Rodriguez O, Raine NE. 2012. Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees. *Nature*. 491(7422):105–108. doi:10.1038/nature11585. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11585>.

Goulson D. 2010. *Bumblebees behaviour, ecology and conservation*. Second. Oxford University Press.

Goulson D, Lye GC, Darvill B. 2008. Decline and Conservation of Bumble Bees. *Annu Rev Entomol*. 53(1):191–208. doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093454.

Goulson D, Nicholls E. 2016. The canary in the coalmine; bee declines as an indicator of environmental health. *Sci Prog*. 99(3):312–326. doi:10.3184/003685016X14685000479908.

Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL. 2015. Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* (80-). 347(6229). doi:10.1126/science.1255957.

Greenleaf SS, Williams NM, Winfree R, Kremen C. 2007. Bee foraging ranges and their relationship to body size. *Oecologia*. 153(3):589–596. doi:10.1007/s00442-007-0752-9.

Grixti JC, Wong LT, Cameron SA, Favret C. 2009. Decline of bumble bees (*Bombus*) in the North American Midwest. *Biol Conserv*. 142(1):75–84. doi:10.1016/j.biocon.2008.09.027. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2008.09.027>.

Hatfield R, Jepsen S, Mader E, Black SH, Shepherd M. 2012. *Conserving Bumble Bees: Guidelines for Creating and Managing Habitat for America’s Declining Pollinators*. Xerces Soc Invertebr Conserv.:40.

IPBES. 2016. Summary for policymakers of the assessment report of the in-

tergovernmental science-policy platform on biodiversity and ecosystem services on pollinators. Bonn: Pollination and Food Production.

Kearns CA, Inouye DW, Waser NM. 1998. Endangered mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. *Annu Rev Ecol Syst.* 29:83–112. doi:10.1146/annurev.ecolsys.29.1.83.

Kim J, Williams N, Kremen C. 2006. Effects of Cultivation and Proximity to Natural Habitat on Ground-nesting Native Bees in California Sunflower Fields. *J Kansas Entomol Soc.* 79(4):309–320. doi:10.2317/0507.11.1.

Kindemba V. 2009. The impact of neonicotinoid insecticides on bumblebees, Honey bees and other non-target invertebrates.

Kosior A, Celary W, Olejniczak P, Fijał J, Król W, Solarz W, Płonka P. 2007. The decline of the bumble bees and cuckoo bees (Hymenoptera: Apidae: Bombini) of Western and Central Europe. *Oryx.* 41(1):79–88. doi:10.1017/S0030605307001597.

Labougle JM. 1990. *Bombus* of Mexico and Central America (Hymenoptera, Apidae). 54(3):35–73.

Lämsä J, Kuusela E, Tuomi J, Juntunen S, Watts PC. 2018. Low dose of neonicotinoid insecticide reduces foraging motivation of bumblebees. *Proc R Soc B Biol Sci.* 285(1883). doi:10.1098/rspb.2018.0506.

Larson JL, Redmond CT, Potter DA. 2013. Assessing Insecticide Hazard to Bumble Bees Foraging on Flowering Weeds in Treated Lawns. *PLoS One.* 8(6). doi:10.1371/journal.pone.0066375.

Laycock I, Cotterell KC, O’Shea-Wheller TA, Cresswell JE. 2014. Effects of the neonicotinoid pesticide thiamethoxam at field-realistic levels on microcolonies of *Bombus*

terrestris worker bumble bees. *Ecotoxicol Environ Saf.* 100(1):153–158. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.10.027. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.027>.

Laycock I, Cresswell JE. 2013. Repression and recuperation of brood production in *Bombus terrestris* bumble bees exposed to a pulse of the neonicotinoid pesticide imidacloprid. *PLoS One.* 8(11). doi:10.1371/journal.pone.0079872.

Laycock I, Lenthall KM, Barratt AT, Cresswell JE. 2012. Effects of imidacloprid, a neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumble bees (*Bombus terrestris*). *Ecotoxicology.* 21(7):1937–1945. doi:10.1007/s10646-012-0927-y.

Maienfisch P, Angst M, Brandl F, Fischer W, Hofer D, Kayser H, Kobel W, Rindlisbacher A, Senn R, Steinemann A, et al. 2001. Chemistry and biology of thiamethoxam: A second generation neonicotinoid. *Pest Manag Sci.* 57(10):906–913. doi:10.1002/ps.365.

Martin AE, Graham SL, Henry M, Pervin E, Fahrig L. 2018. Flying insect abundance declines with increasing road traffic. *Insect Conserv Divers.* 11(6):608–613. doi:10.1111/icad.12300.

Martínez-López O, Koch JB, Martínez-Morales MA, Navarrete-Gutiérrez D, Enríquez E, Vandame R. 2021. Reduction in the potential distribution of bumble bees (Apidae: *Bombus*) in Mesoamerica under different climate change scenarios: Conservation implications. *Glob Chang Biol.* 27(9):1772–1787. doi:10.1111/gcb.15559.

Martínez de Castro Dubernard A. 2019. Evaluación del efecto de dos dietas en el desarrollo de microcolonias del abejorro *Bombus ephippiatus* (Hymenoptera: Apidae) y el uso reproductivo de los zánganos producidos. Universidad Nacional Autónoma de México.

Michener CD. 2007. *The bees of the world*. Second. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.

Moffat C, Pacheco JG, Sharp S, Samson AJ, Bolland KA, Huang J, Buckland ST, Connolly CN. 2015. Chronic exposure to neonicotinoids increases neuronal vulnerability to mitochondrial dysfunction in the bumblebee (*Bombus terrestris*). *FASEB J.* 29(5):2112–2119. doi:10.1096/fj.14-267179.

Mommaerts V, Reynders S, Boulet J, Besard L, Sterk G, Smagghe G. 2010. Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. *Ecotoxicology.* 19(1):207–215. doi:10.1007/s10646-009-0406-2.

Morales CL. 2007. Introducción de abejorros (*Bombus*) no nativos: Causas, consecuencias ecológicas y perspectivas. *Ecol Austral.* 17(1):51–65.

Morandin L a, Lavery TM, Kevan PG. 2001. Effect of bumble bee (Hymenoptera: Apidae) pollination intensity on the quality of greenhouse tomatoes. *J Econ Entomol.* 94(1):172–179. doi:10.1603/0022-0493-94.1.172.

Morandin LA, Winston ML. 2003. Effects of Novel Pesticides on Bumble Bee (Hymenoptera: Apidae) Colony Health and Foraging Ability. *Environ Entomol.* 32(3):555–563. doi:10.1603/0046-225x-32.3.555.

Muth F, Leonard AS. 2019. A neonicotinoid pesticide impairs foraging, but not learning, in free-flying bumblebees. *Sci Rep.* 9(1):1–14. doi:10.1038/s41598-019-39701-5.

Otterstatter MC, Thomson JD. 2008. Does pathogen spillover from commercially reared bumble bees threaten wild pollinators? *PLoS One.* 3(7). doi:10.1371/journal.pone.0002771.

Piironen S, Botías C, Nicholls E, Goulson D. 2016. No effect of low-level chronic neonicotinoid exposure on bumblebee learning and fecundity. *PeerJ.* 4:e1808–e1808. doi:10.7717/peerj.1808. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27014515>.

Plowright R. 1984. The Ecology and Sociobiology of Bumble Bees. *Annu Rev Entomol.*

29(1):175–199.

doi:10.1146/annurev.ento.29.1.175.

<http://ento.annualreviews.org/cgi/doi/10.1146/annurev.ento.29.1.175>.

Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE. 2010. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends Ecol Evol.* 25(6):345–353. doi:10.1016/j.tree.2010.01.007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>.

Quezada-Euán JJ, Ayala-Barajas R. 2010. Abejas nativas de México. La importancia de su conservación. *Cienc Desarro.*(October 2010):8–13.

Ramírez M, González D. 2009. Abejas silvestres (Hymenoptera: Apoidea) como bioindicadores en el Neotrópico. *Trop Subtrop Agroecosystems.* 10:1–13.

Rundlöf M, Andersson GKS, Bommarco R, Fries I, Hederström V, Herbertsson L, Jonsson O, Klatt BK, Pedersen TR, Yourstone J, et al. 2015. Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature.* 521(7550):77–80. doi:10.1038/nature14420.

Sachman-Ruiz B, Narváez-Padilla V, Reynaud E. 2015. Commercial *Bombus impatiens* as reservoirs of emerging infectious diseases in central México. *Biol Invasions.* 17(7):2043–2053. doi:10.1007/s10530-015-0859-6.

Scholer J, Krischik V. 2014. Chronic exposure of imidacloprid and clothianidin reduce queen survival, foraging, and nectar storing in colonies of *bombus impatiens*. *PLoS One.* 9(3). doi:10.1371/journal.pone.0091573.

Simmons BI, Balmford A, Bladon AJ, Christie AP, De Palma A, Dicks L V., Gallego-Zamorano J, Johnston A, Martin PA, Purvis A, et al. 2019. Worldwide insect declines: An important message, but interpret with caution. *Ecol Evol.* 9(7):3678–3680. doi:10.1002/ece3.5153.

Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs C,

Furlan L, Gibbons DW, Giorio C, Girolami V, et al. 2015. Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ Sci Pollut Res.* 22(1):5–34. doi:10.1007/s11356-014-3470-y.

Stanley DA, Raine NE. 2017. Bumblebee colony development following chronic exposure to field-realistic levels of the neonicotinoid pesticide thiamethoxam under laboratory conditions. *Sci Rep.* 7(1):1–7. doi:10.1038/s41598-017-08752-x. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08752-x>.

Stanley DA, Smith KE, Raine NE. 2015. Bumblebee learning and memory is impaired by chronic exposure to a neonicotinoid pesticide. *Sci Rep.* 5:1–10. doi:10.1038/srep16508.

Straub L, Villamar-Bouza L, Bruckner S, Chantawannakul P, Gauthier L, Khongphinitbunjong K, Retschnig G, Troxler A, Vidondo B, Neumann P, et al. 2016. Neonicotinoid insecticides can serve as inadvertent insect contraceptives. *Proc R Soc B Biol Sci.* 283(1835). doi:10.1098/rspb.2016.0506.

Suchail S, Guez D, Belzunces LP. 2000. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environ Toxicol Chem.* 19(7):1901–1905. doi:10.1002/etc.5620190726.

Taillebois E, Cartereau A, Jones AK, Thany SH. 2018. Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies. *Pestic Biochem Physiol.* 151:59–66. doi:10.1016/j.pestbp.2018.04.007. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.007>.

Tasei JN, Lerin J, Ripault G. 2000. Sub-lethal effects of imidacloprid on bumblebees, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae), during a laboratory feeding test. *Pest Manag Sci.* 56(9):784–788. doi:10.1002/1526-4998(200009)56:9<784::AID-PS208>3.0.CO;2-T.

Tomizawa M, Casida JE. 2005. NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45(1):247–268. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930.

Torres-Ruiz A, Jones RW. 2012. Comparison of the efficiency of the bumble bees *bombus impatiens* and *bombus ephippiatus* (Hymenoptera: Apidae) as pollinators of tomato in greenhouses. *J Econ Entomol.* 105(6):1871–1877. doi:10.1603/EC12171.

Vandame R, Pineda E, Sagot P, Mérida J, Martínez O, Vergara C, Ayala R, González I, Duennes M, Cameron S, et al. 2017. Ponencia: Diversidad y conservación de los abejorros de Mesoamérica. X Congr Mesoamericano sobre Abejas Nativ.

Vides-Borrell E, Porter-Bolland L, Ferguson BG, Gasselin P, Vaca R, Valle-Mora J, Vandame R. 2019. Polycultures, pastures and monocultures: Effects of land use intensity on wild bee diversity in tropical landscapes of southeastern Mexico. *Biol Conserv.* 236(April):269–280. doi:10.1016/j.biocon.2019.04.025. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.04.025>.

Wagner DL. 2020. Insect declines in the anthropocene. *Annu Rev Entomol.* 65:457–480. doi:10.1146/annurev-ento-011019-025151.

Whitehorn PR, O ’Connor S, Wackers FL, Goulson D. 2012. Neonicotinoid Pesticide Reduces Bumble Bee Colony Growth and Neonicotinoid Pesticide Reduces Bumble Bee Colony Growth and Queen Production. *Science* (80-). 336(568):351–352. doi:10.1126/science.1215025. <http://www.sciencemag.org/content/336/6079/351.full.html%5Cnhttp://www.sciencemag.org/content/336/6079/351.full.html%5Cnhttp://www.sciencemag.org/content/336/6079/351.full.html%5Cnhttp://www.sciencemag.org/content/336/6079/351.full.html>.

Whitehorn PR, Wallace C, Vallejo-Marin M. 2017. Neonicotinoid pesticide limits improvement in buzz pollination by bumblebees. *Sci Rep.* 7(1):1–8. doi:10.1038/s41598-017-

14660-x. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-14660-x>.

Williams P, Tang Y, Yao J, Cameron S. 2009. The bumblebees of Sichuan (Hymenoptera: Apidae, Bombini). *Syst Biodivers*. 7(2):101–189. doi:10.1017/S1477200008002843.

Williams PH, Museum NH, Jepsen S. 2020. BBSG Annual Report 2019. (March). doi:10.13140/RG.2.2.15618.84166.

Williams PH, Osborne JL. 2009. Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. *Apidologie*. 40(3):367–387. doi:10.1051/apido/2009025. <http://link.springer.com/10.1051/apido/2009025>.

Williams PH, Richardson LL, Colla SR. 2014. *Bumble Bees of North America*.

Wilson DE, Velarde RA, Fahrbach SE, Mommaerts V, Smaghe G. 2013. Use Of Primary Cultures Of Kenyon Cells From Bumblebee Brains To Assess Pesticide Side Effects. *Arch Insect Biochem Physiol*. 84(1):43–56. doi:10.1002/arch.21112.

Wood TJ, Goulson D. 2017. The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. *Environ Sci Pollut Res*. 24(21):17285–17325. doi:10.1007/s11356-017-9240-x.

Woodard SH. 2017. Bumble bee ecophysiology: integrating the changing environment and the organism. *Curr Opin Insect Sci*. 22:101–108. doi:10.1016/j.cois.2017.06.001. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2017.06.001>.

Legends

Figure 1. Probability of survival and intervals of confidence of *Bombus ephippiatus* workers exposed to contaminated food with imidacloprid at different concentrations (10 ng/g dose in red color; 2 ng/g dose in green color) and a control without pesticide (in blue color).

Figure 2. Nest development: number of workers (a) and brood cells (b) in *Bombus ephippiatus* colonies exposed to pollen and nectar contaminated with different concentrations of imidacloprid and untreated colonies.

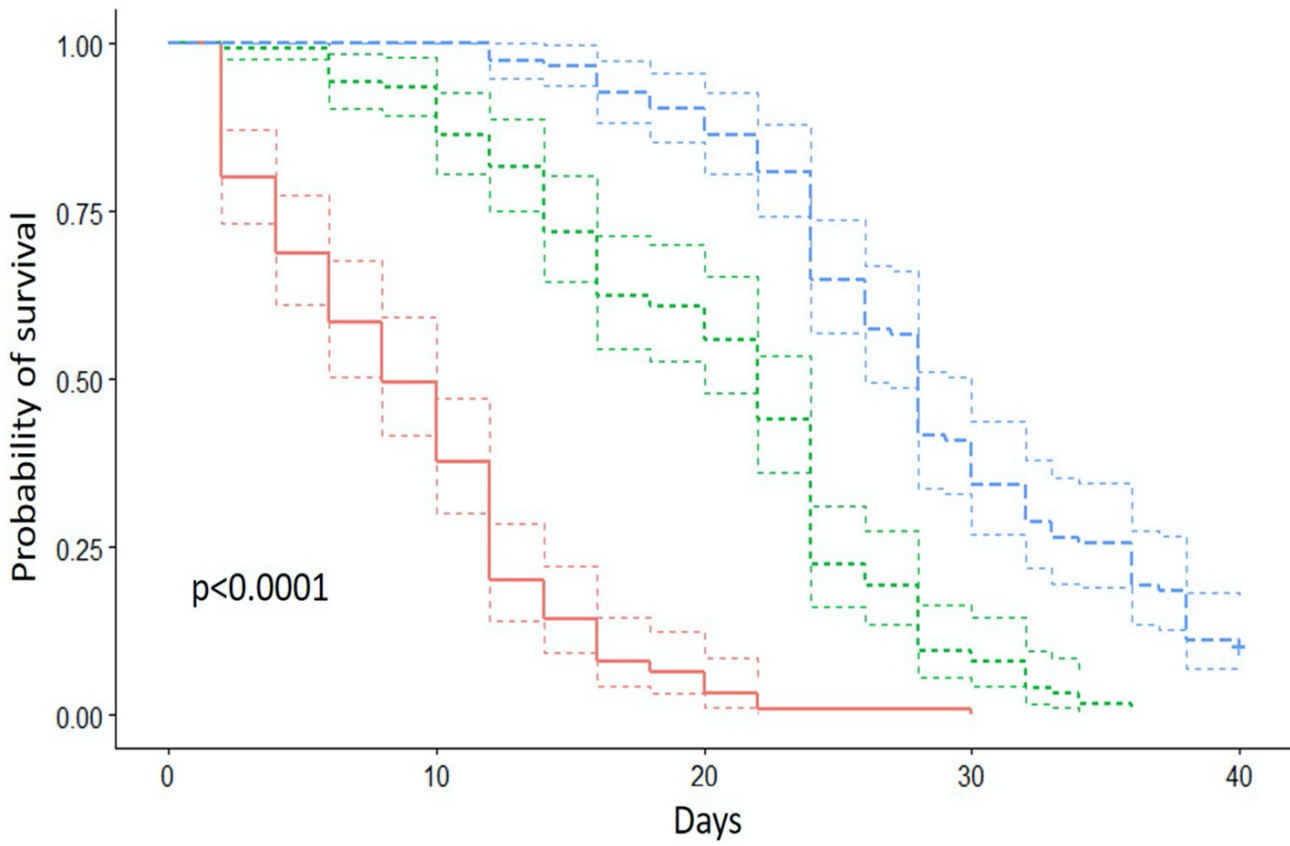


Figure 3

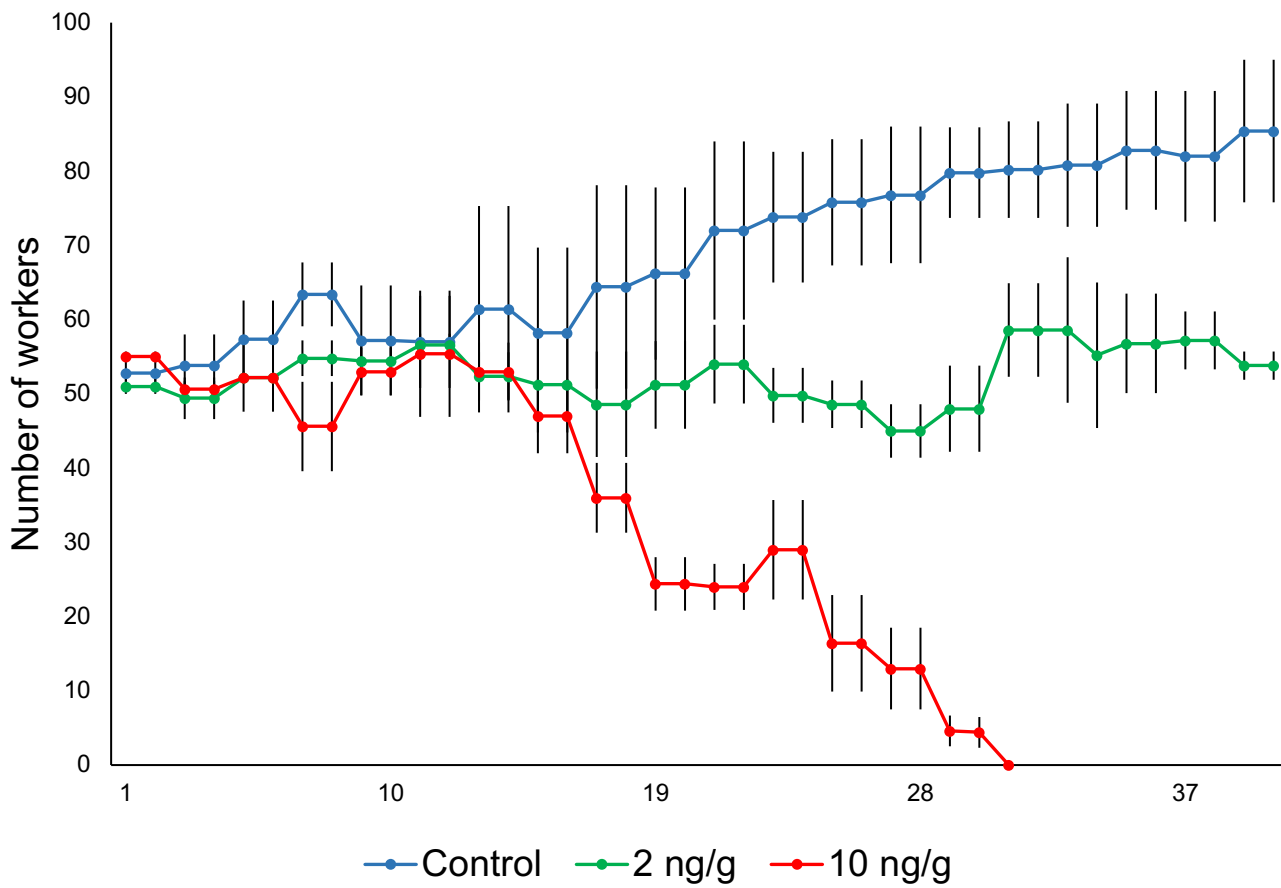


Figure 2 (a)

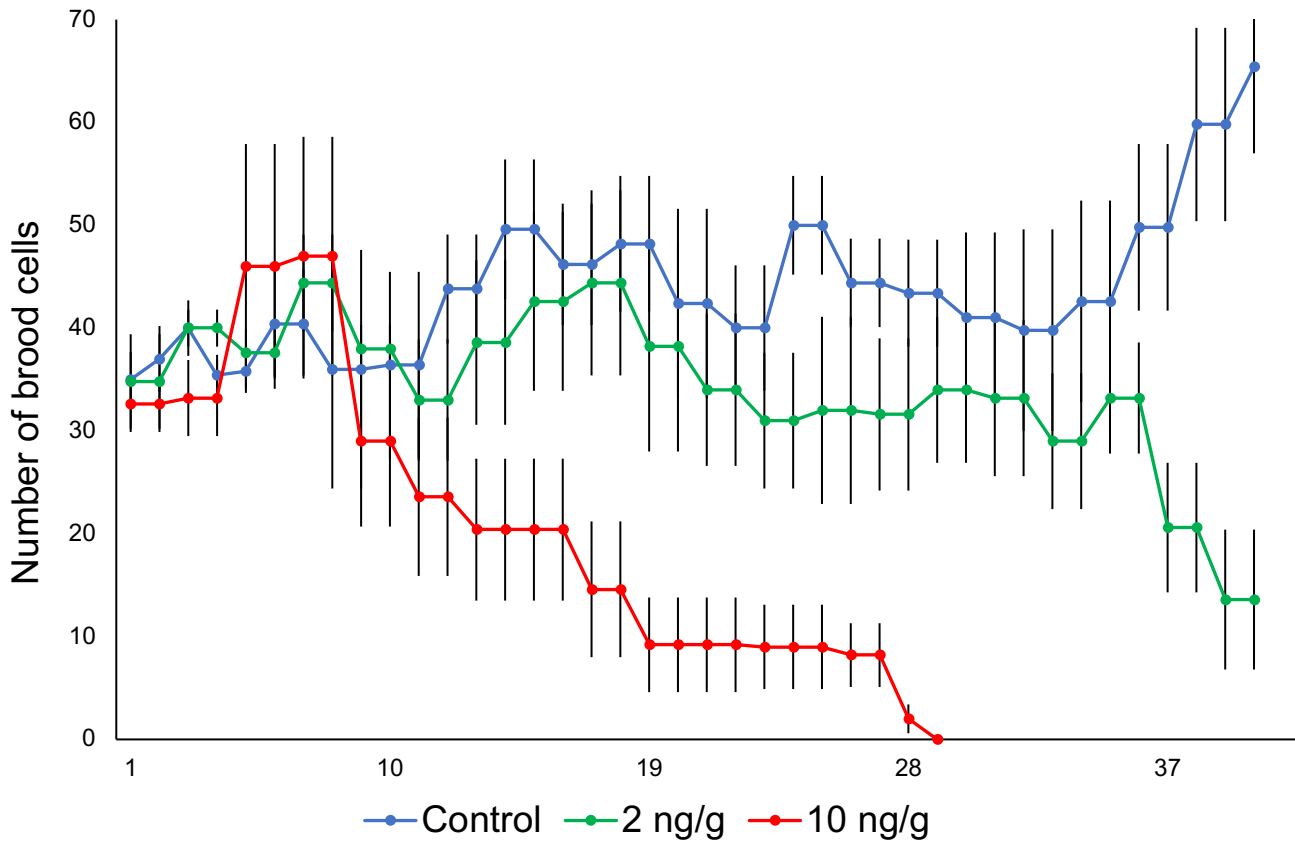


Figure 2 (b)

Capítulo 3: Conclusiones

La conclusión más importante de nuestro estudio es que los abejorros tropicales, al menos en el caso de la especie *B. ephippiatus*, se ven afectados de la misma forma que las especies templadas por el insecticida imidacloprid.

Demostramos que en un abejorro neo-tropical, *B. ephippiatus*, la supervivencia de las abejas se vio significativamente afectada cuando las colonias fueron expuestas a dosis bajas y altas de imidacloprid. Además, mostramos una relación negativa entre la cantidad de imidacloprid en los alimentos y las tasas de supervivencia de las obreras. Esto sugiere un efecto letal crónico en *B. ephippiatus* a través de la exposición constante al imidacloprid. Nuestro estudio además muestra que el uso de microcolonias de cinco obreras es útil para comparar la supervivencia de éstas a través de la exposición a diferentes tratamientos, ya que nos permiten estandarizar colonias pequeñas y homogéneas.

El desarrollo del nido se vio afectado de manera negativa en el caso de las colonias expuestas a imidacloprid, mostrando nuevamente una relación negativa entre la cantidad de obreras y cría, y la concentración de imidacloprid en el polen y néctar consumidos. Se observaron cambios de comportamiento en las abejas expuestas al imidacloprid, como incoordinación, incapacidad para volar y defender el nido, cría abandonada y pérdida de incubación. Estos efectos en el comportamiento de los nidos y abejorros también se han observado en el abejorro de clima templado *B. impatiens* cuando se exponen a este insecticida (Crall et al. 2018), lo que podría ser una razón por la cual la cantidad de cría disminuyó en los nidos que estuvieron expuestos a una dosis más alta de imidacloprid. La disminución en la cantidad de crías podría deberse también a la falta de cuidado del nido debido a la mortalidad de las obreras o a la reducción de la fecundidad, ya que se ha comprobado que existe una reducción significativa en el desarrollo ovárico y la fecundidad de las obreras de *B. terrestris* después ingerir niveles ambientalmente realistas de imidacloprid (Laycock et al. 2012) y

una situación similar podría estar sucediendo en *B. ephippiatus*. El imidacloprid también podría estar afectando directamente el desarrollo de las crías.

Aquí, reportamos hallazgos similares a los reportados por abejorros de climas templados, por ejemplo, las tasas de supervivencia reportadas en nuestro estudio fueron similares a las tasas de supervivencia del abejorro europeo *B. terrestris* cuando se expuso a imidacloprid (Tasei et al. 2000; Mommaerts et al. 2010; Gill et al. 2012; Scholer y Krischik 2014). El crecimiento de las colonias también se vio afectado en las colonias de *B. terrestris* expuestas a este neonicotinoide (Whitehorn et al. 2012), lo que sugiere una posible extrapolación de los efectos de los plaguicidas en los abejorros tropicales, incluidos los efectos sobre la búsqueda de alimento y los estudios realizados en el campo.

Nuestros resultados demuestran que la ingestión de concentraciones usadas en campo de imidacloprid en *B. ephippiatus* provoca una disminución en las tasas de supervivencia y afecta el desarrollo de nidos de manera negativa. Esto puede conllevar a pérdidas importantes en las poblaciones silvestres, ya que la producción de machos y reinas se da al final del ciclo de vida y los nidos nunca llegarían a este punto, ya que los insumos que traen las obreras al nido son fundamentales para llegar a esta etapa.

Es importante mencionar que este experimento de laboratorio de toxicidad por consumo directo es solo una aproximación a lo que podría estar sucediendo en el campo. Este es el primer trabajo que involucra el efecto del imidacloprid en una especie de abejorro neo-tropical y se deben realizar estudios con más especies y bajo condiciones de campo.

Debido a que el imidacloprid se aplica en más de 70 tipos de cultivos en México, sugerimos que estos efectos podrían ocurrir comúnmente en poblaciones silvestres de abejorros nativos. La transición a una agricultura más sostenible y la reversión de la simplificación del paisaje agrícola ofrecen respuestas estratégicas a los riesgos asociados con la exposición de plaguicidas en polinizadores silvestres. Los abejorros

son considerados importantes polinizadores para flores silvestres y cultivos, y proponemos medidas para reducir el uso de plaguicidas, en las que cabe mencionar la promoción del manejo integrado de plagas, complementado con la capacitación de los agricultores, la agricultura orgánica y las políticas para reducir el uso de plaguicidas a nivel mundial.

Referencias

Alboukadel, K., and Kosinski, M. (2019). *Survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'*. R package version 0.4.4.

Alkassab AT, Kirchner WH. 2017. Sublethal exposure to neonicotinoids and related side effects on insect pollinators: honeybees, bumblebees, and solitary bees. *J Plant Dis Prot.* 124(1). doi:10.1007/s41348-016-0041-0.

Arena M, Sgolastra F. 2014. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology.* 23(3):324–334. doi:10.1007/s10646-014-1190-1.

Bejarano González F. 2017. *Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México*. 1st ed. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México AC (RAPAM), editor. Texcoco, Estado de México.

Bernardino Hernández HU, Mariaca Méndez R, Nazar Beutelspacher A, Álvarez Solís JD, Torres Dosal A, Herrera Portugal C. 2014. *Los plaguicidas en los Altos de Chiapas: Soluciones que matan*. ECOSUR, editor.

Blake RJ, Copping LG. 2017. Are neonicotinoids killing bees? *Pest Manag Sci.* 73(7):1293–1294. doi:10.1002/ps.4604.

Bonmatin JM, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreuzweiser DP, Krupke C, Liess M, Long E, Marzaro M, Mitchell EA, et al. 2015. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environ Sci Pollut Res.* 22(1):35–67. doi:10.1007/s11356-014-3332-7.

Botías C, David A, Hill EM, Goulson D. 2016. Contamination of wild plants near neonicotinoid seed-treated crops, and implications for non-target insects. *Sci Total Environ.* 566–567:269–278. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.05.065. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.065>.

Botías C, David A, Horwood J, Abdul-Sada A, Nicholls E, Hill E, Goulson D. 2015. Neonicotinoid Residues in Wildflowers, a Potential Route of Chronic Exposure for Bees. *Environ Sci Technol.* 49(21):12731–12740. doi:10.1021/acs.est.5b03459.

Carreck N. 2016. *Decline of Bees and Other Pollinators*. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394847-2.00008-5>.

Casida JE, Durkin KA. 2013. Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annu Rev Entomol.* 58(1):99–117.

doi:10.1146/annurev-ento-120811-153645.

Chavarría-Villaseñor G. 1996. Systematic and Behavior of the Neotropical Bumble Bees (Hymenoptera: Apidae: Bombus). Thesis.(February).

COFEPRIS. Consulta de Registros Sanitarios de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y LMR. <http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.asp>.

Colla SR, Packer L. 2008. Evidence for decline in eastern North American bumblebees (Hymenoptera: Apidae), with special focus on *Bombus affinis* Cresson. *Biodivers Conserv.* 17(6):1379–1391. doi:10.1007/s10531-008-9340-5.

Cortines de Nava C. 2007. Situación en México de las existencias de plaguicidas sujetos al convenio de Estocolmo. Cd. de México, México.

Crall JD, Switzer CM, Oppenheimer RL, Ford Versypt AN, Dey B, Brown A, Eyster M, Guérin C, Pierce NE, Combes SA, et al. 2018. Neonicotinoid exposure disrupts bumblebee nest behavior, social networks, and thermoregulation. *Science* (80-). 362(6415):683–686. doi:10.1126/science.aat1598.

Cresswell J. 2014. On the natural history of neonicotinoids and bees. *Funct Ecol.* 28(6):1311–1312. doi:10.1111/1365-2435.12319.

Dance C, Botías C, Goulson D. 2017. The combined effects of a monotonous diet and exposure to thiamethoxam on the performance of bumblebee micro-colonies. *Ecotoxicol Environ Saf.* 139(November 2016):194–201. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.01.041. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.041>.

David A, Botías C, Abdul-Sada A, Nicholls E, Rotheray EL, Hill EM, Goulson D. 2016. Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. *Environ Int.* 88:169–178. doi:10.1016/j.envint.2015.12.011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.011>.

Dirzo R, Young HS, Galetti M, Ceballos G, Isaac NJB, Collen B. 2014. Defaunation in the Anthropocene. *Science* (80-). 345(6195):401–406. doi:10.1126/science.1251817.

Duennes MA, Petranek C, de Bonilla EPD, Mérida-Rivas J, Martínez-López O, Sagot P, Vandame R, Cameron SA. 2017. Population genetics and geometric

morphometrics of the *Bombus ephippiatus* species complex with implications for its use as a commercial pollinator. *Conserv Genet.* 18(3):553–572. doi:10.1007/s10592-016-0903-9.

Feltham H, Park K, Goulson D. 2014. Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. *Ecotoxicology.* 23(3):317–323. doi:10.1007/s10646-014-1189-7.

Forister ML, Pelton EM, Black SH. 2019. Declines in insect abundance and diversity: We know enough to act now. *Conserv Sci Pract.* 1(8):1–8. doi:10.1111/csp2.80.

Fuentes Montemayor E, Madrid Cuevas A. 2003. *Biología de Bombus ephippiatus* Say (Hymenoptera, Apidae).

Gallot-Lavallée M, Schmid-Hempel R, Vandame R, Vergara CH, Schmid-Hempel P. 2016. Large scale patterns of abundance and distribution of parasites in Mexican bumblebees. *J Invertebr Pathol.* 133:73–82. doi:10.1016/j.jip.2015.12.004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.12.004>.

Gill RJ, Ramos-Rodriguez O, Raine NE. 2012. Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees. *Nature.* 491(7422):105–108. doi:10.1038/nature11585. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11585>.

Goulson D. 2010. *Bumblebees behaviour, ecology and conservation.* Second. Oxford University Press.

Goulson D, Lye GC, Darvill B. 2008. Decline and Conservation of Bumble Bees. *Annu Rev Entomol.* 53(1):191–208. doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093454.

Goulson D, Nicholls E. 2016. The canary in the coalmine; bee declines as an indicator of environmental health. *Sci Prog.* 99(3):312–326. doi:10.3184/003685016X14685000479908.

Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL. 2015. Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* (80-). 347(6229). doi:10.1126/science.1255957.

Greenleaf SS, Williams NM, Winfree R, Kremen C. 2007. Bee foraging ranges and their relationship to body size. *Oecologia.* 153(3):589–596. doi:10.1007/s00442-007-0752-9.

Grixti JC, Wong LT, Cameron SA, Favret C. 2009. Decline of bumble bees (*Bombus*) in the North American Midwest. *Biol Conserv.* 142(1):75–84. doi:10.1016/j.biocon.2008.09.027. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2008.09.027>.

Hatfield R, Jepsen S, Mader E, Black SH, Shepherd M. 2012. *Conserving Bumble Bees: Guidelines for Creating and Managing Habitat for America's Declining Pollinators*. Xerces Soc Invertebr Conserv.:40.

IPBES. 2016. Summary for policymakers of the assessment report of the intergovernmental science-policy platform on biodiversity and ecosystem services on pollinators. Bonn: Pollination and Food Production.

Kearns CA, Inouye DW, Waser NM. 1998. Endangered mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. *Annu Rev Ecol Syst.* 29:83–112. doi:10.1146/annurev.ecolsys.29.1.83.

Kim J, Williams N, Kremen C. 2006. Effects of Cultivation and Proximity to Natural Habitat on Ground-nesting Native Bees in California Sunflower Fields. *J Kansas Entomol Soc.* 79(4):309–320. doi:10.2317/0507.11.1.

Kindemba V. 2009. The impact of neonicotinoid insecticides on bumblebees , Honey bees and other non-target invertebrates.

Kosior A, Celary W, Olejniczak P, Fijał J, Król W, Solarz W, Płonka P. 2007. The decline of the bumble bees and cuckoo bees (Hymenoptera: Apidae: Bombini) of Western and Central Europe. *Oryx.* 41(1):79–88. doi:10.1017/S0030605307001597.

Labougle JM. 1990. *Bombus* of Mexico and Central America (Hymenoptera, Apidae). 54(3):35–73.

Lämsä J, Kuusela E, Tuomi J, Juntunen S, Watts PC. 2018. Low dose of neonicotinoid insecticide reduces foraging motivation of bumblebees. *Proc R Soc B Biol Sci.* 285(1883). doi:10.1098/rspb.2018.0506.

Larson JL, Redmond CT, Potter DA. 2013. Assessing Insecticide Hazard to Bumble Bees Foraging on Flowering Weeds in Treated Lawns. *PLoS One.* 8(6). doi:10.1371/journal.pone.0066375.

Laycock I, Cotterell KC, O'Shea-Wheller TA, Cresswell JE. 2014. Effects of the neonicotinoid pesticide thiamethoxam at field-realistic levels on microcolonies of *Bombus terrestris* worker bumble bees. *Ecotoxicol Environ Saf.* 100(1):153–158.

doi:10.1016/j.ecoenv.2013.10.027. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.027>.

Laycock I, Cresswell JE. 2013. Repression and recuperation of brood production in *Bombus terrestris* bumble bees exposed to a pulse of the neonicotinoid pesticide imidacloprid. *PLoS One*. 8(11). doi:10.1371/journal.pone.0079872.

Laycock I, Lenthall KM, Barratt AT, Cresswell JE. 2012. Effects of imidacloprid, a neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumble bees (*Bombus terrestris*). *Ecotoxicology*. 21(7):1937–1945. doi:10.1007/s10646-012-0927-y.

Maienfisch P, Angst M, Brandl F, Fischer W, Hofer D, Kayser H, Kobel W, Rindlisbacher A, Senn R, Steinemann A, et al. 2001. Chemistry and biology of thiamethoxam: A second generation neonicotinoid. *Pest Manag Sci*. 57(10):906–913. doi:10.1002/ps.365.

Martin AE, Graham SL, Henry M, Pervin E, Fahrig L. 2018. Flying insect abundance declines with increasing road traffic. *Insect Conserv Divers*. 11(6):608–613. doi:10.1111/icad.12300.

Martínez-López O, Koch JB, Martínez-Morales MA, Navarrete-Gutiérrez D, Enríquez E, Vandame R. 2021. Reduction in the potential distribution of bumble bees (*Apidae: Bombus*) in Mesoamerica under different climate change scenarios: Conservation implications. *Glob Chang Biol*. 27(9):1772–1787. doi:10.1111/gcb.15559.

Martínez de Castro Dubernard A. 2019. Evaluación del efecto de dos dietas en el desarrollo de microcolonias del abejorro *Bombus ephippiatus* (Hymenoptera: Apidae) y el uso reproductivo de los zánganos producidos. Universidad Nacional Autónoma de México.

Michener CD. 2007. *The bees of the world*. Second. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.

Moffat C, Pacheco JG, Sharp S, Samson AJ, Bolland KA, Huang J, Buckland ST, Connolly CN. 2015. Chronic exposure to neonicotinoids increases neuronal vulnerability to mitochondrial dysfunction in the bumblebee (*Bombus terrestris*). *FASEB J*. 29(5):2112–2119. doi:10.1096/fj.14-267179.

Mommaerts V, Reynders S, Boulet J, Besard L, Sterk G, Smagghe G. 2010. Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. *Ecotoxicology*. 19(1):207–215. doi:10.1007/s10646-009-

0406-2.

Morales CL. 2007. Introducción de abejorros (*Bombus*) no nativos: Causas, consecuencias ecológicas y perspectivas. *Ecol Austral*. 17(1):51–65.

Morandin L a, Lavery TM, Kevan PG. 2001. Effect of bumble bee (*Hymenoptera: Apidae*) pollination intensity on the quality of greenhouse tomatoes. *J Econ Entomol*. 94(1):172–179. doi:10.1603/0022-0493-94.1.172.

Morandin LA, Winston ML. 2003. Effects of Novel Pesticides on Bumble Bee (*Hymenoptera: Apidae*) Colony Health and Foraging Ability. *Environ Entomol*. 32(3):555–563. doi:10.1603/0046-225x-32.3.555.

Muth F, Leonard AS. 2019. A neonicotinoid pesticide impairs foraging, but not learning, in free-flying bumblebees. *Sci Rep*. 9(1):1–14. doi:10.1038/s41598-019-39701-5.

Otterstatter MC, Thomson JD. 2008. Does pathogen spillover from commercially reared bumble bees threaten wild pollinators? *PLoS One*. 3(7). doi:10.1371/journal.pone.0002771.

Piironen S, Botías C, Nicholls E, Goulson D. 2016. No effect of low-level chronic neonicotinoid exposure on bumblebee learning and fecundity. *PeerJ*. 4:e1808–e1808. doi:10.7717/peerj.1808. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27014515>.

Plowright R. 1984. The Ecology and Sociobiology of Bumble Bees. *Annu Rev Entomol*. 29(1):175–199. doi:10.1146/annurev.ento.29.1.175. <http://ento.annualreviews.org/cgi/doi/10.1146/annurev.ento.29.1.175>.

Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE. 2010. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends Ecol Evol*. 25(6):345–353. doi:10.1016/j.tree.2010.01.007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>.

Quezada-Euán JJ, Ayala-Barajas R. 2010. Abejas nativas de México. La importancia de su conservación. *Cienc Desarro*.(October 2010):8–13.

Ramírez M, González D. 2009. Abejas silvestres (*Hymenoptera: Apoidea*) como bioindicadores en el Neotrópico. *Trop Subtrop Agroecosystems*. 10:1–13.

Rundlöf M, Andersson GKS, Bommarco R, Fries I, Hederström V, Herbertsson L, Jonsson O, Klatt BK, Pedersen TR, Yourstone J, et al. 2015. Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature*. 521(7550):77–80.

doi:10.1038/nature14420.

Sachman-Ruiz B, Narváez-Padilla V, Reynaud E. 2015. Commercial *Bombus impatiens* as reservoirs of emerging infectious diseases in central México. *Biol Invasions*. 17(7):2043–2053. doi:10.1007/s10530-015-0859-6.

Scholer J, Krischik V. 2014. Chronic exposure of imidacloprid and clothianidin reduce queen survival, foraging, and nectar storing in colonies of *bombus impatiens*. *PLoS One*. 9(3). doi:10.1371/journal.pone.0091573.

Simmons BI, Balmford A, Bladon AJ, Christie AP, De Palma A, Dicks L V., Gallego-Zamorano J, Johnston A, Martin PA, Purvis A, et al. 2019. Worldwide insect declines: An important message, but interpret with caution. *Ecol Evol*. 9(7):3678–3680. doi:10.1002/ece3.5153.

Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces LP, Bonmatin JM, Chagnon M, Downs C, Furlan L, Gibbons DW, Giorio C, Girolami V, et al. 2015. Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ Sci Pollut Res*. 22(1):5–34. doi:10.1007/s11356-014-3470-y.

Stanley DA, Raine NE. 2017. Bumblebee colony development following chronic exposure to field-realistic levels of the neonicotinoid pesticide thiamethoxam under laboratory conditions. *Sci Rep*. 7(1):1–7. doi:10.1038/s41598-017-08752-x. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08752-x>.

Stanley DA, Smith KE, Raine NE. 2015. Bumblebee learning and memory is impaired by chronic exposure to a neonicotinoid pesticide. *Sci Rep*. 5:1–10. doi:10.1038/srep16508.

Straub L, Villamar-Bouza L, Bruckner S, Chantawannakul P, Gauthier L, Khongphinitbunjong K, Retschnig G, Troxler A, Vidondo B, Neumann P, et al. 2016. Neonicotinoid insecticides can serve as inadvertent insect contraceptives. *Proc R Soc B Biol Sci*. 283(1835). doi:10.1098/rspb.2016.0506.

Suchail S, Guez D, Belzunces LP. 2000. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environ Toxicol Chem*. 19(7):1901–1905. doi:10.1002/etc.5620190726.

Taillebois E, Cartereau A, Jones AK, Thany SH. 2018. Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies. *Pestic*

Biochem Physiol. 151:59–66. doi:10.1016/j.pestbp.2018.04.007.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.007>.

Tasei JN, Lerin J, Ripault G. 2000. Sub-lethal effects of imidacloprid on bumblebees, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae), during a laboratory feeding test. *Pest Manag Sci.* 56(9):784–788. doi:10.1002/1526-4998(200009)56:9<784::AID-PS208>3.0.CO;2-T.

Tomizawa M, Casida JE. 2005. NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45(1):247–268. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930.

Torres-Ruiz A, Jones RW. 2012. Comparison of the efficiency of the bumble bees *bombus impatiens* and *bombus ephippiatus* (Hymenoptera: Apidae) as pollinators of tomato in greenhouses. *J Econ Entomol.* 105(6):1871–1877. doi:10.1603/EC12171.

Vandame R, Pineda E, Sagot P, Mérida J, Martínez O, Vergara C, Ayala R, González I, Duennes M, Cameron S, et al. 2017. Ponencia: Diversidad y conservación de los abejorros de Mesoamérica. X Congr Mesoamericano sobre Abejas Nativ.

Vides-Borrell E, Porter-Bolland L, Ferguson BG, Gasselin P, Vaca R, Valle-Mora J, Vandame R. 2019. Polycultures, pastures and monocultures: Effects of land use intensity on wild bee diversity in tropical landscapes of southeastern Mexico. *Biol Conserv.* 236(April):269–280. doi:10.1016/j.biocon.2019.04.025.
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.04.025>.

Wagner DL. 2020. Insect declines in the anthropocene. *Annu Rev Entomol.* 65:457–480. doi:10.1146/annurev-ento-011019-025151.

Whitehorn PR, O'Connor S, Wackers FL, Goulson D. 2012. Neonicotinoid Pesticide Reduces Bumble Bee Colony Growth and Neonicotinoid Pesticide Reduces Bumble Bee Colony Growth and Queen Production. *Science* (80-). 336(568):351–352. doi:10.1126/science.1215025.

<http://www.sciencemag.org/content/336/6079/351.full.html%5Cnhttp://www.sciencemag.org/content/336/6079/351.full.html%5Cnhttp://www.sciencemag.org/content/336/6079/351.full.html%5Cnhttp://www.sciencemag.org/content/336/6079/351.full.html>.

Whitehorn PR, Wallace C, Vallejo-Marin M. 2017. Neonicotinoid pesticide limits improvement in buzz pollination by bumblebees. *Sci Rep.* 7(1):1–8. doi:10.1038/s41598-

017-14660-x. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-14660-x>.

Williams P, Tang Y, Yao J, Cameron S. 2009. The bumblebees of Sichuan (Hymenoptera: Apidae, Bombini). *Syst Biodivers.* 7(2):101–189. doi:10.1017/S1477200008002843.

Williams PH, Museum NH, Jepsen S. 2020. BBSG Annual Report 2019. (March). doi:10.13140/RG.2.2.15618.84166.

Williams PH, Osborne JL. 2009. Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. *Apidologie.* 40(3):367–387. doi:10.1051/apido/2009025. <http://link.springer.com/10.1051/apido/2009025>.

Williams PH, Richardson LL, Colla SR. 2014. *Bumble Bees of North America*.

Wilson DE, Velarde RA, Fahrbach SE, Mommaerts V, Smagghe G. 2013. Use Of Primary Cultures Of Kenyon Cells From Bumblebee Brains To Assess Pesticide Side Effects. *Arch Insect Biochem Physiol.* 84(1):43–56. doi:10.1002/arch.21112.

Wood TJ, Goulson D. 2017. The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. *Environ Sci Pollut Res.* 24(21):17285–17325. doi:10.1007/s11356-017-9240-x.

Woodard SH. 2017. Bumble bee ecophysiology: integrating the changing environment and the organism. *Curr Opin Insect Sci.* 22:101–108. doi:10.1016/j.cois.2017.06.001. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2017.06.001>.