

MARIA AUGUSTA LIMA SIQUEIRA

Biossegurança da proteína Cry1Ac, sintetizada pelo  
algodão geneticamente modificado, em abelhas indígenas  
sem ferrão e africanizadas

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Viçosa como parte das exigências do Programa  
de Pós-Graduação em Entomologia, para  
obtenção do título de "Doctor Scientiae".

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S618b  
2008

Siqueira, Maria Augusta Lima, 1976-

Biossegurança da proteína Cry1Ac, sintetizada pelo algodão geneticamente modificado, em abelhas indígenas sem ferrão e africanizadas / Maria Augusta Lima Siqueira.

– Viçosa, MG, 2008.

x, 95f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Abelhas. 2. Plantas transgênicas - Avaliação de riscos.  
3. *Trigona spinipes*. 4. *Apis mellifera*. 5. Algodão.

I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 595.799

MARIA AUGUSTA LIMA SIQUEIRA

Biossegurança da proteína Cry1Ac, sintetizada pelo  
algodão geneticamente modificado, em abelhas indígenas  
sem ferrão e africanizadas

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Viçosa como parte das exigências do Programa  
de Pós-Graduação em Entomologia, para  
obtenção do título de "Doctor Scientiae".

Aprovada: 22 de fevereiro de 2008

---

Dr<sup>a</sup> Carmen Sílvia Soares Pires

---

Prof. Angelo Pallini Filho

---

Prof. Fernando Amaral da Silveira

---

Prof. Eliseu José Guedes Pereira

---

Prof. Lucio Antonio de Oliveira Campos  
(Orientador)

Quando chove as abelhas  
Começam a trabalhar:  
Moça-branca e a pimenta,  
Mandaçaia e mangangá;  
Canudo, Mané-de-Abreu,  
Tubiba e irapuá.

Ronca a tataíra,  
Faz boca o limão,  
Zoa o sanharão,  
Trabalha a jandaíra,  
Busca flor a cupira  
Faz mel o enxu,  
Zoa o capuxu,  
Vai à fonte a jataí,  
Campeia o enxuí,  
Faz mel a uruçú.

Francisco Romano (1840-1891)

*Aos meus amores Maira e Marcello, dedico*

## Agradecimentos

Agradecer através de breves palavras é apenas um pequeno gesto da minha mais sincera gratidão àqueles que colaboraram direta, ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Ao anjo chamado Maíra, que há um ano mudou a minha vida para sempre;

Ao meu marido pelo apoio e amor, me ajudando a persistir e vencer as dificuldades;

Aos meus pais, os maiores responsáveis por eu ter chegado até aqui;

Aos irmãos Ana Paula e Ugo, pelo amor, incentivo e companheirismo;

Ao Professor Lucio Antonio de Oliveira Campos, pela orientação, amizade e por tanto ter contribuído para minha formação;

À Dra. Carmen Pires, pela co-orientação, ensinamentos e apoio incondicional;

Ao Professor Raul Narciso, pelos conselhos e preciosa ajuda nas análises estatísticas;

Ao Prof. José Eduardo Serrão, pelo aconselhamento;

Ao Prof. Dejair Message, por ter cedido espaço no Laboratório de Patologia Apícola, onde os experimentos foram desenvolvidos;

Aos profissionais e estudantes da Embrapa/Cenargen, pela acolhida durante as idas à Brasília, pelos ensinamentos e pelo apoio. Em especial agradeço à Eliana Fontes, Edison Sujii e Simoni Dias, além do Erich e Carol;

Ao Marcelo, fiel companheiro de laboratório, cuja ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho;

À Janina, amiga inesquecível, que dividiu seu local de trabalho comigo, permitindo que esta pesquisa fosse realizada da melhor forma possível, além de ter dado ótimas dicas;

À Christina, por ter me ensinado as técnicas de criação de *A. mellifera*;

À Tati, companheira desde a graduação e principal incentivadora da minha vinda à Viçosa;

Ao Íris, Geraldo e "Lulu", funcionários do Apiário que tanto me ensinaram sobre abelhas. A experiência de vocês e o auxílio nos trabalhos de campo foram fundamentais;

Aos colegas do Apiário, pela amizade e ajuda nos trabalhos. Agradeço em especial à Alexa, Ronaldo e Mariana, que já não estão mais por aqui e à Lila e Malu;

Ao programa de pós-graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa e CNPq que forneceram subsídios para a realização deste trabalho.

Muito obrigada a todos!!!

## Conteúdo

<b>Resumo</b> .....	vii
<b>Abstract</b> .....	ix
<b>Introdução e Revisão de Literatura</b> .....	01
Plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos .....	02
Plantas transgênicas prejudicam artrópodes não-alvo? .....	05
Toxicidade de substâncias transgênicas sobre abelhas .....	09
Algodão GM e avaliações de biossegurança em abelhas .....	15
<b>Objetivos</b> .....	20
Objetivo geral .....	20
Objetivos específicos .....	20
<b>Capítulo 1</b> .....	36
Protocolos para avaliação dos efeitos de entomotoxinas em <i>Trigona spinipes</i> (Hymenoptera, Apidae, Meliponina)	
<b>Capítulo 2</b> .....	71
Biossegurança da toxina Cry1Ac do <i>Bacillus thuringiensis</i> em larvas de <i>Apis mellifera</i> (Hymenoptera, Apidae)	
<b>Conclusões gerais</b> .....	94

## Resumo

SIQUEIRA, Maria Augusta Lima. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Biossegurança da proteína Cry1Ac, sintetizada pelo algodão geneticamente modificado, em abelhas indígenas sem ferrão e africanizadas.** Orientador: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-Orientadores: Raul Narciso Carvalho Guedes e José Eduardo Serrão.

Técnicas de engenharia genética oferecem oportunidade para a criação de plantas resistentes a insetos devido à síntese de proteínas entomotóxicas. Visando avaliar a biossegurança do algodão transgênico resistente a insetos-praga sobre polinizadores, foram desenvolvidos bioensaios com larvas de *Trigona spinipes* e *Apis mellifera*, abelhas de ampla ocorrência em flores de algodão no Brasil, utilizando a proteína Cry1Ac como modelo. Desenvolveu-se protocolo de criação das larvas de *T. spinipes* em condições controladas de laboratório, usando o alimento natural das abelhas. Metodologia semelhante foi utilizada para criação *in vitro* de larvas de *A. mellifera* tratadas com dieta artificial. Bioensaios foram montados com as abelhas das duas espécies sendo submetidas a três tratamentos, com cinco repetições cada (40 abelhas/repetição): (i) alimento das abelhas puro (controle); (ii) alimento das abelhas + água destilada e autoclavada e (iii) alimento das abelhas + água destilada e autoclavada + Cry1Ac. A mortalidade e o desenvolvimento das abelhas foram monitorados diariamente. A massa corporal, a largura da cabeça e a distância intertegular das abelhas recém-emergidas dos três

tratamentos foram determinadas. O protocolo de criação de larvas de *T. spinipes* obteve 91% de sobrevivência no controle. A criação de *A. mellifera*, entretanto, resultou em elevados índices de mortalidade nos três tratamentos. Análises estatísticas não demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos em relação a todos os parâmetros avaliados para as duas espécies. As metodologias utilizadas para a criação de larvas de *T. spinipes* e de *A. mellifera* foram adequadas para estudos de toxicidade de proteínas entomotóxicas nessas abelhas. A ingestão de Cry1Ac não alterou a sobrevivência, o tamanho e o tempo de desenvolvimento de *T. spinipes* e de *A. mellifera*, embora sejam necessários estudos com larvas que darão origem a rainhas.

## Abstract

SIQUEIRA, Maria Augusta Lima. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2008. **Biosafety of Cry1Ac protein, synthesized by the genetically modified cotton, on stingless bees and honeybees.** Adviser: Lucio Antonio de Oliveira Campos. Co-Advisers: Raul Narciso Carvalho Guedes e José Eduardo Serrão.

Genetic engineering techniques offer opportunities for the development of insect-resistant plants due to the synthesis of entomotoxical proteins by plants. To evaluate the biosafety of GM cotton in relation to pollinators, bioassay methods were developed for rearing larvae of *Trigona spinipes* and *Apis mellifera*, bees commonly found in cotton flowers in Brazil, using Cry1Ac protein as a model. Protocols were developed for rearing *T. spinipes* larvae under laboratory controlled conditions, using natural bee food. Similar methods were used for rearing larvae of *A. mellifera* treated with artificial diet. Bioassays were developed to expose the bees of both species to three treatments, with five replicates (40 bees/replicate): (i) pure bee food (control); (ii) bee food + sterile water; (3) bee food + sterile water + Cry1Ac. Mortality and development of the bees were monitored daily. Body mass, head width and intertegular span of newly-emerged bees were recorded for the three treatments. Brood rearing methods were successful for *T. spinipes* larvae (91% survival in the control). Rearing of *A. mellifera*, however, resulted in high mortality in the three treatments. None of the parameters

parameters analyzed were statistically different among the treatments for both species. Methodologies used for rearing workers of *T. spinipes* and *A. mellifera* were adequate for toxicological studies with entomotoxic proteins on these bees. Survival, size and development time of *T. spinipes* and *A. mellifera* were not altered by the ingestion of Cry1Ac, but studies with larvae that will develop into queens are still necessary.

# *Introdução e Revisão de Literatura*

## **Plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos**

O desenvolvimento de técnicas de engenharia genética oferece oportunidade para a criação de plantas resistentes a insetos devido à inserção e expressão, naqueles organismos, de genes responsáveis pela síntese de proteínas entomopatogênicas (Jouanian et al., 1998). Recentemente, interesses científicos e comerciais têm sido focados, principalmente, em genes que codificam proteínas tóxicas derivadas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) ou inibidores de protease (IPs) derivados de diversas fontes (Malone et al., 2001).

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria Gram positiva, aeróbica facultativa, capaz de sintetizar entomotoxinas durante a esporulação (Höfte & Whiteley, 1989). Esses microorganismos podem ser encontrados em vários ambientes favoráveis ao desenvolvimento dos insetos, como depósitos de grãos armazenados, diferentes tipos de solo, insetos em decomposição, fezes de vertebrados herbívoros e ecossistemas aquáticos (revisado por Hilbeck & Schmidt, 2006). Em condições adversas, elas se transformam em endósporos, forma de resistência capaz de sobreviver até o ambiente tornar-se novamente favorável. Durante esse processo, as bactérias produzem inclusões cristalinas formadas por grandes quantidades de uma ou mais proteínas, denominadas genericamente de  $\delta$ -endotoxinas ou toxinas Cry (Bobrowski et al., 2003; Hilbeck & Schmidt, 2006).

Os cristais sintetizados pelas bactérias são formados por protoxinas que não possuem atividade tóxica. Após serem ingeridas, essas protoxinas se solubilizam no intestino dos insetos suscetíveis, liberando as  $\delta$ -endotoxinas, que são ativadas pelo pH e proteases intestinais (Gill et al., 1992). Em insetos suscetíveis, a intoxicação por proteínas Bt ocorre após a ligação dos monômeros da toxina a receptores localizados na membrana do intestino médio (Gill et al., 1992). Esses monômeros então se agregam, ocasionando a formação de poros no epitélio intestinal, desequilíbrio osmótico entre os meios intra e extracelular, culminando em lise das células epiteliais. Conseqüentemente, há um desbalanceamento iônico e de pH entre o lúmen intestinal e a hemolinfa, ocasionando a

morte dos indivíduos devido à inibição da alimentação ou à septicemia (Höfte & Whiteley, 1989; Gill et al, 1992; Bravo et al. 2007).

Inseticidas microbiológicos contendo toxinas Cry são utilizados como alternativa aos inseticidas convencionais desde a década de 40 (Romeis et al., 2006). As primeiras plantas transgênicas desenvolvidas para expressar toxinas Bt foram manipuladas para sintetizar protoxinas. Entretanto o nível de expressão dessas moléculas foi muito baixo e, conseqüentemente, o controle de pragas não foi efetivo. A partir desses resultados, trabalhou-se no desenvolvimento de que plantas geneticamente modificadas que sintetizassem as toxinas ativas. Essas plantas são muito mais eficazes para estratégias de controle de insetos-praga porque, ao ingerirem essas plantas, os indivíduos estão expostos às toxinas ativas, não sendo necessárias a solubilização e a ativação das proteínas tóxicas no intestino (Mazier et al., 1997).

A liberação em escala comercial de culturas Bt ocorreu pela primeira vez em 1996, nos Estados Unidos (Bates et al., 2005). A resistência de plantas a insetos, baseada nas toxinas Bt, é a segunda característica (depois da tolerância a herbicidas) mais utilizada em culturas geneticamente modificadas (O`Callaghan et al., 2005). Desde então, o rápido crescimento do cultivo em várias regiões do mundo tem provocado intensos debates sobre a biossegurança alimentar e ambiental desses organismos. Dentre os riscos ambientais, destacam-se o fluxo gênico de plantas GM para variedades convencionais, selvagens ou para espécies filogeneticamente próximas; o desenvolvimento de resistência em insetos alvo, impactos sobre a dinâmica das populações associadas à cultura e efeitos diretos ou indiretos sobre espécies não-alvo (Hunter, 2000; Caprio, 2001; Dale et al., 2002; Naranjo et al., 2005; O`Callaghan et al., 2005). Além disso, o uso de culturas transgênicas resistentes a insetos pode ser limitado pela probabilidade de surgimento de pragas secundárias, influências ambientais na expressão gênica, alergenicidade e toxicidade em humanos e fatores socioeconômicos (Sharma et al., 2004).

Por outro lado, a utilização de toxinas Bt tem sido apontada, por vários autores, como uma importante alternativa para o manejo de

insetos-praga, pois a utilização de inseticidas sintéticos coloca em risco a saúde humana, além de causar problemas ambientais e estar associada à resistência em insetos-alvo. Também constituem vantagens do uso de plantas GM resistentes a insetos o aumento da produtividade, a redução dos custos de produção, a contribuição para conservação de inimigos naturais e a facilidade da biodegradação das toxinas (Hunter, 2000; Naranjo et al., 2005; Romeis et al., 2006).

Dentre outras modificações que conferem às culturas resistência a insetos, está a expressão em plantas GM de inibidores de protease (IPs). Essas moléculas interferem no metabolismo larval, podendo ocasionar a morte dos insetos imaturos (Jouanin et al., 1998). A produção de inibidores de protease é uma estratégia de defesa utilizada por muitas plantas. Essas moléculas podem ser naturalmente encontradas em diversos tecidos vegetais, ou ter a produção induzida em resposta ao ataque de herbívoros (Jongsma & Bolter, 1997). Os insetos possuem, principalmente no intestino médio, enzimas digestivas (proteases) que catalizam a liberação de peptídeos e aminoácidos a partir das proteínas ingeridas (Jongsma & Bolter, 1997). Os inibidores de protease, assim como as toxinas Bt, atuam no intestino dos insetos suscetíveis, porém com diferente modo de ação. Os IPs bloqueiam a ação das proteases intestinais, inibindo a digestão das proteínas vegetais, ocasionando a morte dos indivíduos por deficiência nutricional (Jongsma & Bolter, 1997; Carlini & Grossi-de-Sá, 2002; Haq et al., 2004).

Para que a utilização de plantas GM seja bem sucedida no manejo integrado de pragas, ela deve substituir, completa ou parcialmente, o uso de inseticidas na produção agrícola, ocasionando aumento na produtividade e melhoria na preservação dos ecossistemas (Sharma et al., 2004). De acordo com o Protocolo de Cartagena, a realização de análises de risco deve fornecer informações científicas para avaliação dos possíveis efeitos adversos dos organismos geneticamente modificados sobre o ambiente e saúde humana (Jank & Gaugitsch, 2001). Dessa forma, análises de riscos ambientais devem ser realizadas com os objetivos de se conhecer, minimizar e manejar prováveis riscos causados por essas plantas aos ecossistemas.

## **Plantas transgênicas prejudicam artrópodes não-alvo?**

Apesar dos benefícios oferecidos pelos organismos geneticamente modificados (OGMs), o desenvolvimento e a utilização de plantas transgênicas devem ser analisados com cautela, devido aos possíveis danos ambientais que essas plantas possam oferecer. Segundo Andow (2003), o impacto ecológico de um produto transgênico depende da cultura, do sistema de produção, dos efeitos ambientais e de outros fatores pouco conhecidos. Uma das principais preocupações ecológicas relacionadas às culturas transgênicas resistentes a insetos-praga são os possíveis efeitos deletérios sobre organismos não-alvo (Michelle, 2001).

Efeitos sobre espécies não-alvo são definidos como efeitos não desejáveis do transgene (que geralmente confere resistência a pragas ou doenças) sobre organismos benéficos aos ecossistemas (Dale et al., 2002). Na tentativa de minimizar esses impactos, caso eles existam, agências governamentais exigem a realização de testes toxicológicos para um determinado número de espécies não-alvo como pré-requisito para a liberação comercial de culturas GM (Naranjo et al., 2005). As preocupações com danos de produtos transgênicos sobre insetos não-alvo aumentaram após a publicação do trabalho desenvolvido por Losey et al. (1999). Estes autores observaram que lagartas da borboleta monarca (*Danaus plexippus*) que ingeriram pólen de milho Bt se alimentaram menos, desenvolveram-se mais lentamente e apresentaram maiores índices de mortalidade. Estudos posteriores entretanto, demonstraram que o risco dessas lagartas serem expostas ao pólen do milho Bt, em condições de campo, era baixo (Hellmich et al., 2001; Anderson et al., 2004).

Dentre os insetos não-alvo, destacam-se três grandes grupos de interesse agroecológico para as culturas e que podem ser prejudicados em consequência das modificações genéticas nas plantas: herbívoros não-alvo (incluindo pragas não-alvo da transgenia, pragas em potencial, espécies que se alimentam de pólen e néctar), inimigos naturais e espécies detritívoras que atuam na decomposição de matéria orgânica

(Fontes et al., 2003; O'Callaghan et al., 2005). Para que esses organismos sofram efeitos das plantas transgênicas, deve haver exposição e suscetibilidade do inseto à proteína entomotóxica (O'Callaghan et al., 2005).

Vários trabalhos foram desenvolvidos para avaliar a ocorrência de efeitos de diferentes culturas GM sobre insetos não-alvo, principalmente em inimigos naturais. A maior parte desses estudos concluiu que culturas Bt apresentam baixo risco para os artrópodes não-alvo (revisado por O'Callaghan et al., 2005; Naranjo et al., 2005). Porém, existem vários exemplos documentados de efeitos adversos de toxinas e plantas Bt sobre diferentes taxons de artrópodes (revisado por Hilbeck & Schmidt, 2006). Segundo estes autores, as pesquisas publicadas sobre efeitos de plantas Bt em espécies não-alvo, em condições de laboratório, são inconsistentes, incoerentes e foram desenvolvidas utilizando metodologias não padronizadas, o que dificulta a interpretação e comparação dos resultados de diferentes trabalhos. Além disso, muitos testes desenvolvidos em laboratório não apresentaram modelos experimentais adequados e não foram ecologicamente realistas (Lövei & Arpaia, 2005). Portanto, há uma grande necessidade de estabelecimento de protocolos para a análise de risco de culturas transgênicas sobre organismos não-alvo e é importante que os efeitos sejam investigados ao longo de todo ciclo de desenvolvimento da cultura (Hunter, 2000).

Os polinizadores constituem um dos grupos de insetos benéficos que podem ser prejudicados em consequência da ingestão de pólen e néctar de plantas GM. A polinização é o primeiro passo para a formação de sementes. A deficiência neste processo ocorre devido à chegada de uma pequena quantidade de pólen ao estigma, ao excesso de deposição dos gametas masculinos no órgão reprodutor feminino das flores, ao atraso nessa transferência ou à chegada ao estigma de grãos de pólen inviáveis ou de outras espécies (Wilcock & Neiland, 2002). A baixa abundância de polinizadores pode ocasionar dispersão ineficiente dos grãos de pólen, levando à diminuição ou ausência da produção de frutos (Wilcock & Neiland, 2002).

A polinização é um processo crucial na manutenção de quase todos os ecossistemas terrestres (Kevan, 1999). A maioria das plantas cultivadas depende dos polinizadores para a produção de frutos e sementes, sendo os insetos os principais vetores de pólen (revisado por Klein et al., 2007). Devido às adaptações corporais e à frequência com que visitam as flores, as abelhas são os polinizadores mais efetivos de várias culturas e plantas nativas não polinizadas pelo vento (Batra, 1995).

Fatores como fragmentação e perda de habitats, introdução de espécies exóticas, pragas e doenças, adoção de práticas agrícolas, aumento de áreas de pastagem e uso inadequado de pesticidas e herbicidas têm contribuído para o declínio das populações de invertebrados polinizadores (Kearns & Inouye, 1997; Goulson, 2003; Batra, 2005; Ghazoul, 2005). A redução global dos polinizadores, especialmente abelhas melíferas e silvestres, alertou para a necessidade de conservá-los com o intuito de manter a produção de alimentos e os ecossistemas terrestres naturais. Concluiu-se que o decréscimo do serviço de polinização pode ter implicações econômicas e ecológicas a longo prazo (Allen-Wardell et al., 1998).

Apesar da “crise global dos polinizadores” ser questionada por alguns autores (e.g. Richards, 2001; Thomson, 2001; Ghazoul, 2005), a diminuição das populações e da diversidade desses animais foi discutida durante a “Convention on Biological Diversity”, onde foram fundadas iniciativas internacionais e regionais para sua preservação. A “Iniciativa Internacional para Conservação e Uso Sustentável dos Polinizadores” estabeleceu como um dos objetivos a promoção da conservação, da restauração, e do uso sustentável da diversidade dos polinizadores na agricultura e ecossistemas relacionados (UNEP, 2002).

Para alcançar essa meta, o uso de pesticidas e herbicidas em agroecossistemas deve ser avaliado com cautela, pois essas práticas agrícolas podem causar altos índices de mortalidade em abelhas (Kearns & Inouye, 1997; Kevan, 1999). Além disso, avaliações de efeitos letais e

subletais de pesticidas sobre polinizadores foram estabelecidas como uma das prioridades para sua preservação (Allen-Wardell et al., 1998).

Recentemente, o desaparecimento de abelhas melíferas em colméias nos Estados Unidos, causou preocupação entre os apicultores, agricultores e a comunidade científica. Notificado pela primeira vez em 2006, o fenômeno conhecido como "colony collapse disorder" (CCD) é caracterizado por uma diminuição abrupta da população de abelhas adultas das colméias, sem que sejam observados indivíduos mortos no interior ou proximidades dos ninhos. Ao final do processo, restam na colméia a rainha, poucas operárias recém-emergidas, prole no estágio final de desenvolvimento e reservas alimentares (Oldroyd, 2007). Apicultores norte-americanos cujas colméias apresentaram sintomas da CCD relataram perdas de 45 a 100% das colônias (Oldroyd, 2007, Vanengelsdorp et al., 2007).

Inúmeras hipóteses foram levantadas para explicar o desaparecimento das abelhas e a expansão de culturas GM no país foi apontada como uma das prováveis causas (Oldroyd, 2007). Apesar de não existirem evidências de que plantas transgênicas ocasionem os sintomas da CCD (Oldroyd, 2007), e pesquisas indicarem que a síndrome esteja associada a uma infecção viral (Cox-Foster et al., 2007), os prejuízos ocasionados pela CCD alertam para a importância de se avaliar os possíveis efeitos de plantas GM sobre as abelhas, principalmente aquelas que expressam algum tipo de proteína.

A exposição, direta ou indireta, de abelhas às entomotoxinas produzidas por plantas GM pode, potencialmente, ocasionar danos a esses insetos. Efeitos diretos podem surgir após a ingestão de proteínas inseticidas expressas pelas plantas; indiretos podem ser consequência de alterações no fenótipo da planta em consequência da introdução do transgene (Malone & Pham-Delègue, 2001; Arpaia et al., 2006). Além disso, efeitos sobre organismos que vivem associados às colônias poderiam prejudicar os ninhos indiretamente (Silveira, 2003).

Dentre os recursos apícolas coletados nas plantas (néctar, pólen e resinas), o pólen é provavelmente o principal veículo de transmissão de

produtos transgênicos, devido ao seu elevado teor protéico quando comparado aos demais produtos forrageados pelas abelhas (Malone & Pham-Delègue, 2001; Malone et al., 2002). Por ser a principal fonte protéica desses insetos, principalmente na fase larval (Simpson, 1955; Michener, 1974), grãos de pólen expressando proteínas tóxicas podem oferecer riscos às populações que visitam culturas GM. Após ser coletado pelos adultos, o pólen é transportado para o ninho, onde é armazenado e fornecido para as larvas, sendo indispensável ao desenvolvimento dos imaturos. Portanto, plantas que expressam no pólen proteínas ou outras substâncias derivadas da transgenia devem ter a toxicidade sobre abelhas avaliada.

### **Toxicidade de substâncias transgênicas sobre abelhas**

Até o momento, poucas espécies de abelhas foram utilizadas em avaliações de toxicidade de produtos transgênicos inseticidas. Devido ao grande valor como polinizador, além da importância econômica da produção de mel, pólen, própolis e geléia real, vários trabalhos verificaram se essas toxinas oferecem riscos à abelha *Apis mellifera* (revisado por Malone & Pham-Delègue, 2001; Quadro I).

A maioria das pesquisas desenvolvidas sobre toxicidade de Bt nesta espécie não observou alterações na mortalidade em diferentes fases de desenvolvimento (Arpaia, 1996; Anon, 2000; Hanley et al., 2003; Malone et al., 2004; Babendreier et al., 2005; Bailey et al., 2005; Ramirez-Romero et al., 2005; Rose et al., 2007); longevidade, taxa de consumo de alimento e comportamento de vôo de operárias (Malone et al., 1999; Malone et al., 2001; Liu et al., 2005; Ramirez-Romero et al., 2005; Rose et al., 2007); concentração protéica na hemolinfa dos adultos, massa das pupas e dos adultos (Arpaia, 1996; Hanley et al., 2003; Rose et al., 2007); desenvolvimento da glândula hipofaringeana (Malone et al., 2004; Babendreier et al., 2005) e na comunidade intestinal bacteriana de operárias (Babendreier et al., 2007). Em abelhas do gênero *Bombus* tratadas com pólen misturado à toxina Cry1Ac não foram observados efeitos no consumo de pólen, massa corporal das operárias, tamanho da

colônia, quantidade de prole, número de rainhas e machos produzidos e atividade forrageadora das campeiras (Morandin & Winston, 2003).

Em contrapartida, Malone et al. (1999) demonstraram que a taxa de consumo de alimento em *A. mellifera* tratadas com pólen Bt foi menor do que em abelhas que ingeriam pólen sem a toxina. Segundo esses autores, a adição de toxina Bt ao pólen provocou um comportamento de repelência nas abelhas. Ramirez-Romero et al. (2005) verificaram uma redução na atividade forrageadora dessa espécie durante e após o tratamento com a toxina Bt Cry1Ab. Nesse trabalho, as alterações no forrageamento não foram relacionadas com o comportamento de repelência, mas com efeitos fisiológicos ocasionados pela ingestão da toxina (Ramirez-Romero et al., 2005). Abelhas melíferas alimentadas com dieta contaminada com estirpes de *B. thuringiensis* desenvolveram mecanismos de defesa em resposta à introdução bacteriana, sofrendo alterações na morfologia da membrana peritrófica e no sistema de defesa da hemolinfa (Saltykova et al., 2005).

Da mesma forma que os testes desenvolvidos com Bt, a maioria dos trabalhos que testou a toxicidade dos IPs sobre abelhas foi realizada com *A. mellifera* (Quadro II). Porém, ao contrário das proteínas Bt, a grande maioria desses estudos tem indicado que os inibidores de protease causam danos às abelhas. Algumas dessas pesquisas forneceram concentrações de inibidores baseadas em doses letais de pesticidas químicos para as abelhas (*e.g.* Girard et al., 1998), não correspondendo, provavelmente, à proporção de inibidores encontrada em condições naturais. Em geral, esses trabalhos também só foram conduzidos com abelhas adultas.

Baixas doses de inibidores de protease não interferiram na mortalidade a curto prazo, na capacidade de aprendizado e na atividade proteolítica na hemolinfa das operárias de *A. mellifera* (Girard et al., 1998). Entretanto, tal resultado negativo pode ter sido consequência da baixa dose administrada às abelhas durante o experimento. Como o mecanismo de ação dos IPs está associado às ligações entre moléculas,

os impactos dessas proteínas sobre os insetos são geralmente dose-dependentes (Malone & Pham-Delègue, 2001).

Abelhas melíferas alimentadas com pólen misturado ao inibidor aprotinina começaram a voar e morreram mais precocemente do que abelhas alimentadas com pólen sem aditivos (Malone et al., 2001). Outros estudos demonstraram que inibidores de protease prejudicam a memória olfativa das abelhas campeiras, diminuindo a capacidade de forrageamento (Picard-Nizou et al., 1997; Pham-Delègue et al., 2000). Porém, Dechaume-Moncharmont et al. (2005) demonstraram que a ingestão do inibidor "Bowman-Birk inhibitor", na concentração semelhante à expressa em plantas GM, não modifica a atividade forrageadora de *A. mellifera*. Alterações na atividade enzimática intestinal foram observadas em *A. mellifera* adultas alimentadas com inibidores de protease da batata (Malone et al., 1998).

Alguns trabalhos desenvolvidos com *A. mellifera*, utilizando o mesmo tipo de inibidor, apresentam resultados conflitantes. A adição de inibidor SBTI ("Soybean Trypsin Inhibitor") à dieta das larvas de *A. mellifera* aumentou a taxa de mortalidade larval, retardou o desenvolvimento juvenil, diminuiu a massa corporal dos adultos (Brodsgaard et al., 2003). Em operárias adultas, esse inibidor reduziu o conteúdo protéico da glândula hipofaringeana, a atividade enzimática intestinal e diminuiu a longevidade (Malone et al., 1995; Burgess et al., 1996; Babendreier et al., 2005; Sagili et al., 2005). Entretanto Malone et al. (1999) não observaram alterações na mortalidade e na taxa de consumo de alimento quando trataram operárias recém-emergidas com este mesmo produto.

De forma semelhante aos resultados obtidos com *A. mellifera*, alguns estudos comprovaram a toxicidade de inibidores de proteases sobre *Bombus*. Malone et al. (2000) realizaram bioensaios com *B. terrestris* para testar os efeitos de quatro inibidores de protease sobre a sobrevivência das operárias. Apenas um dos quatro IPs testados por estes autores não diminuiu a longevidade das operárias. Inibidores

adicionados a preparações *in vitro* de proteases intestinais de *B. terrestris* inibiram a atividade enzimática (Malone et al., 2000).

Outras plantas GM, ou proteínas produzidas por elas, também foram testadas em abelhas. Proteínas expressas por culturas resistentes a fungos não apresentaram toxicidade sobre operárias de *A. mellifera* (Picard-Nizou et al., 1997; Morandin & Winston, 2003). Proteínas inseticidas que inibem a assimilação de vitaminas também não afetaram o desenvolvimento larval, a taxa de consumo de alimentos, a sobrevivência de larvas, de adultos e o desenvolvimento da glândula hipofaringeana dessa espécie (Malone et al. 2002; Malone et al. 2004). Colméias de abelhas melíferas, quando mantidas em plantações de canola resistente ao herbicida glifosato, não apresentaram efeitos adversos em adultos ou larvas (Huang et al., 2004). Entretanto Morandin & Winston (2005) observaram que abelhas silvestres são menos abundantes em culturas de canola resistente ao glifosato do que em plantios orgânicos e convencionais, ocasionando um déficit na polinização e uma baixa produção de sementes da espécie. Esses resultados indicam um possível efeito indireto do sistema de cultivo utilizando plantas GM resistentes ao herbicida mencionado.

A maioria dos estudos sobre efeitos de plantas transgênicas em abelhas realizou apenas testes com operárias adultas. Porém, a expressão de proteínas GM no pólen também expõe as larvas à toxicidade dessas substâncias, pois os imaturos ingerem o pólen coletado pelas operárias e armazenado nas colônias. Impactos de inseticidas sobre a prole de abelhas têm grande importância, pois o aumento na mortalidade de imaturos leva a um decréscimo na população das colônias, ocasionando uma inibição na atividade de polinização (van der Steen, 2001).

Compostos letais à cria podem ter efeitos sobre os ninhos por vários dias após o contato com as abelhas (van der Steen, 2001). As larvas de abelhas são provavelmente mais sensíveis do que os adultos, porque necessitam de uma dieta complexa para se desenvolverem e não são capazes de escolherem o próprio alimento, pois se alimentam no interior

das células de cria (Brodsgaard et al., 2003). Estudos desenvolvidos por Banbendreier et al. (2004) demonstraram que, ao menos em *A. mellifera*, a ingestão direta de pólen é a única fonte significativa de produtos transgênicos para as larvas. Segundo esses autores, em estudos de avaliação de risco a taxa de consumo de pólen pelas larvas deve ser conhecida. Dessa forma, poderão ser estabelecidas doses mais realistas dos produtos transgênicos que serão administradas à cria. Portanto, dependendo da substância administrada, os estágios imaturos também podem estar expostos à toxicidade dos produtos derivados da transgenia. Além disso, as abelhas geralmente não coletam grãos de pólen com baixa concentração de proteína (Roulston et al., 2000), o que aumenta a probabilidade de exposição das larvas e adultos às entomotoxinas protéicas. Conseqüentemente, análises de risco de plantas GM sobre abelhas devem ser realizadas com indivíduos em diferentes fases de desenvolvimento.

Dentre as abelhas eussociais, os meliponíneos (Hymenoptera, Apidae, Meliponina) – conhecidos popularmente como “Abelhas Indígenas sem Ferrão” (Nogueira-Neto, 1970) – destacam-se pela riqueza e abundância de espécies que habitam regiões tropicais do mundo e subtropicais da América do Sul (Silveira et al., 2002). A tribo é representada por várias centenas de espécies (Michener, 2000) que são responsáveis pela polinização de diversas espécies de plantas nativas e cultivadas (Kevan & Imperatriz-Fonseca, 2002). Slaa et al. (2000) verificaram que as abelhas sem ferrão podem ser polinizadores efetivos em plantações, tornando-se uma alternativa importante, em relação às abelhas melíferas, para a polinização comercial.

Apesar da sua importância ecológica e econômica, existe apenas um estudo de toxicidade de proteínas inseticidas usadas em plantas GM sobre meliponíneos. Moraes et al. (2000) observaram que a aplicação tópica de proteínas Bt em operárias de *Scaptotrigona tubiba* aumentou a taxa de mortalidade dessas abelhas, em condições de laboratório. Quando comparada com a ação de inseticidas sintéticos, a letalidade ocasionada por Bt foi considerada baixa (Moraes et al., 2000). Entretanto, em condições naturais, é pouco provável que a mortalidade

causada, nesta espécie, pelo contato tópico com toxinas Bt seja observada, uma vez que a toxicidade do Bt atua no intestino, após a ingestão das proteínas pelos insetos.

Em virtude da escassez de estudos toxicológicos de proteínas expressas por plantas transgênicas sobre meliponíneos, é necessário que sejam desenvolvidos protocolos para a realização de testes de biossegurança de plantas GM sobre esses insetos. Tais protocolos devem ser amplos de forma a permitir a adequação de testes com diferentes espécies de abelhas sem ferrão e com diferentes proteínas. Assim, poderão ser testados produtos expressos em várias culturas visitadas por essas abelhas.

Apesar de vários trabalhos terem sido realizados com *A. mellifera*, existem poucos estudos que avaliaram efeitos letais e subletais de entomotoxinas sintetizadas por plantas transgênicas sobre as larvas dessas abelhas. Devido à importância dos imaturos para o desenvolvimento das colônias e conseqüentemente para a polinização, métodos para a criação de larvas de abelhas em condições controladas devem ser desenvolvidos com o objetivo de testar a toxicidade de inseticidas sobre para indivíduos (van der Steen, 2001). Dentre os estudos que avaliaram efeitos de plantas GM sobre larvas da espécie, as metodologias utilizadas não foram adequadas para avaliações de toxicidade ao longo de todo o desenvolvimento (*e.g.* Hanley et al., 2003), não avaliaram efeitos subletais (Malone et al., 2002) ou testaram a toxicidade em condições de campo, dificultando as avaliações de sobrevivência larval devido à remoção da cria morta pelas operárias (Huang et al., 2004). Brodsgaard et al. (2003) verificaram, em condições controladas de laboratório, o efeito do inibidor de protease SBTI em larvas de *A. mellifera* e observaram aumento na mortalidade larval, atraso no desenvolvimento e diminuição na massa corporal dos adultos. Porém, não existem estudos semelhantes avaliando efeitos de toxinas Bt sobre larvas de *A. mellifera*.

## **Algodão GM e avaliações de biossegurança em abelhas**

O Brasil é um dos maiores produtores de algodão do mundo e a produção das fibras tem grande importância no agronegócio do país (CONAB, 2008). Estimativas indicam que o país irá se tornar, em pouco tempo, o principal pólo produtor mundial. Três espécies do gênero *Gossypium* são encontradas no Brasil: *G. hirsutum*, *G. barbadense* e *G. mustelinum*, sendo que esta é endêmica do nordeste brasileiro (Wendel et al., 1994; Fontes et al., 2006).

Os principais problemas fitossanitários da cotonicultura brasileira são resultantes de doenças e pragas - principalmente insetos - que reduzem a produtividade e qualidade das fibras e sementes (Ramalho, 1994). A utilização indiscriminada de inseticidas sintéticos nessas culturas tem provocado danos ambientais, surgimento de pragas resistentes aos inseticidas e surgimento de pragas secundárias (Luttrell et al., 1994). Conseqüentemente, métodos de controle alternativos, como o manejo integrado de pragas tem sido propostos (Luttrell et al., 1994).

O algodão transgênico Bollgard® (Bt), comercializado pela Monsanto a partir de 1996, tem sido apontado como uma alternativa revolucionária no combate a insetos-praga desta cultura (Agi et al., 2001; Perlak et al., 2001). Na China, por exemplo, o algodão Bt resultou em uma diminuição drástica no uso de inseticidas e ocasionou, em alguns plantios, o aumento das populações de insetos benéficos (Wu & Guo, 2005). Em março de 2005, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança do Brasil (CTNBio) aprovou o cultivo e a comercialização do algodoeiro Bollgard I no país. Essa variedade transgênica expressa a proteína Cry1Ac, tóxica a várias espécies de Lepidoptera que causam danos à cultura algodoeira (Agi et al., 2001), dentre as quais estão o curuquerê-do-algodão (*Alabama argillacea*), a lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*) e a lagarta da maçã (*Heliothis virescens*), importantes pragas no Brasil.

Vários tecidos do algodão transgênico expressam a toxina Cry1Ac (Greenplate, 1997, 1999), aumentando a possibilidade de que artrópodes não-alvo entrem em contato com as proteínas inseticidas. Portanto, as análises de risco do algodão Bt devem envolver estudos sobre possíveis

efeitos das proteínas sobre os organismos associados aos plantios. As pesquisas desenvolvidas, até o momento, sobre a abundância de artrópodes em cultivos convencionais e transgênicos forneceram resultados contraditórios. A maioria dos trabalhos mostrou que não existe diferença significativa entre os dois plantios (Sisterson et al., 2004; Men et al., 2005; Flint et al., 1995; Wei-Di et al., 2004; Hagerty et al., 2005) ou que a menor abundância de artrópodes em plantações de algodão Bt não deve ser considerada ecologicamente importante (Naranjo, 2005). Entretanto, plantações de algodão Bt diminuíram a diversidade de algumas comunidades e populações na cultura, incluindo importantes insetos benéficos, como inimigos naturais (Men et al., 2003; Whitehouse et al., 2005).

As abelhas estão entre os artrópodes benéficos associados às plantações de algodão. Apesar de o algodão ser uma planta autógama, a polinização por insetos, especialmente abelhas, aumenta a produtividade. Devido à abundância de *A. mellifera* nas flores, esta espécie é considerada o polinizador mais importante do algodão em diversas partes do mundo (Free, 1993), apesar das operárias visitarem as flores apenas quando não existem plantas mais atrativas (Eisikowitch & Loper, 1984). As abelhas saem das flores de *Gossypium* com o corpo coberto de pólen e geralmente entram em outras flores sem realizarem a limpeza corporal (Mcgregor, 1959). O forrageamento das campeiras de *A. mellifera* em plantações de algodão aumenta a produtividade e qualidade das fibras, produção de sementes normais e híbridas, taxa de germinação, diminui o tempo de colheita e causa melhoria na qualidade das sementes (McGregor, 1976; Tanda, 1984; Waller et al., 1985; Phillips & Simpson, 1989; Rhodes, 2002).

Aplicações de inseticidas sintéticos às culturas de *Gossypium* aumentam a mortalidade das operárias de *A. mellifera* que entram em contato com as flores ou folhas tratadas. Rhodes (2002) observou uma diminuição na atividade forrageadora desta abelha em plantações de algodão tratadas com diferentes pesticidas. Estes et al. (1992) analisaram a toxicidade de 17 inseticidas aplicados em plantações de algodão sobre operárias de *A. mellifera* e observaram que, logo após a

aplicação, alguns compostos causaram a morte de 100% dos indivíduos testados. A suscetibilidade das abelhas aos inseticidas sintéticos está estimulando a procura de alternativas para o controle de pragas que não causem prejuízos a esses insetos (Atkins et al., 1975; Estes et al., 1992).

Devido à eficiência na polinização, eventuais prejuízos causados às populações de abelhas em consequência de visitas a agroecossistemas GM podem levar não apenas ao aumento da mortalidade das colônias, como também afetar, indiretamente, a própria produção agrícola. Ao coletarem recursos florais em plantios de algodão GM, é provável que as operárias entrem em contato com a proteína Cry1Ac, expressa no pólen das flores de *Gossypium* modificado (Greenplate, 1997; Malone & Pham-Delégue, 2001; Monsanto, 2002).

É importante ressaltar que as abelhas melíferas visitantes de flores de algodão geralmente apresentam preferência por coletarem néctar, principalmente em nectários extra-florais, e que essa espécie não constitui uma boa fonte de pólen para *A. mellifera* (Eisikowitch & Loper, 1984; Waller et al., 1985; Vaissière & Vinson, 1994). A morfologia do grão de pólen do algodão, que é grande e possui muitos espinhos quando comparado com outras espécies, pode dificultar a agregação do grão à corbícula de *A. mellifera* (Vaissière & Vinson, 1994). Entretanto Danka (2005) observou que até 59% do pólen transportado para colméias de abelhas melíferas é de algodão, quando os ninhos são mantidos próximos à área de cultivo. Segundo esse autor, uma hipótese para explicar esse elevado índice de coletas seria o aumento da umidade, que facilitaria a adesão dos grãos ao corpo das abelhas. Portanto, em regiões tropicais, deve-se avaliar melhor o forrageamento de pólen de algodão por diferentes espécies de abelhas.

Apesar dos benefícios ocasionados pelas abelhas à cotonicultura, existem poucos dados sobre as espécies que polinizam ou coletam recursos florais do algodão no Brasil. As principais espécies que visitam flores de *Gossypium* em diferentes regiões de produção foram determinadas recentemente (Arpaia et al., 2006). Dentre estas espécies

sugere-se que duas tenham prioridade nas avaliações de risco do algodão GM no país: *A. mellifera* e *Bombus* spp (Arpaia et al., 2006).

Porém, a utilização de meliponíneos como alternativa para a realização desse tipo de estudo não deve ser descartada, especialmente em virtude da abundância e riqueza de espécies na região Neotropical. Dentre as abelhas sem ferrão, espécies do gênero *Trigona* são eficientes polinizadores (revisado por Heard, 1999 e Slaa et al., 2006). Forrageiras de *Trigona* podem percorrer distâncias de até 1,5km (Roubik & Aluja, 1983), além de terem elevado índice de constância floral (White et al., 2001), fatores que aumentam a eficiência da polinização realizada por essas abelhas.

*Trigona spinipes* tem sido uma das espécies mais abundantes encontrada em flores de algodão em diferentes localidades do Brasil (Arpaia et al., 2006). Os ninhos dessa espécie podem conter milhares de indivíduos, fazendo com que a existência de apenas uma colônia em determinado local seja suficiente para tornar a espécie mais abundante nas flores do que outras abelhas (Almeida & Laroca, 1988). Recursos florais podem ser coletados pelas operárias a distâncias consideráveis, pois o raio de forrageamento ao redor do ninho é de aproximadamente 840 metros e as campeiras são capazes de comunicar a direção de fontes de alimento que distem até 630 metros das colônias (Almeida & Laroca, 1988).

A abundância de *T. spinipes* em flores de diferentes espécies provavelmente está relacionada também à eficiência do comportamento de forrageamento dessas abelhas. Operárias dessa espécie são eficientes na exclusão de abelhas competidoras (Nieh et al., 2005) e capazes de explorar trilhas de odor deixadas por outros meliponíneos para localização de alimento (Nieh et al., 2004a). Além disso, as campeiras são capazes de indicar, aos demais indivíduos da colônia, distância, direção e altura de uma determinada fonte de alimento (Nieh et al., 2004b). Devido a essas características, *T. spinipes* é uma importante espécie para ser utilizada em avaliações de toxicidade de plantas GM, incluindo o algodão, sobre insetos não-alvo.

Por outro lado, a abundância de *A. mellifera* em flores de *Gossypium*, além da sua importância econômica e como polinizador, a torna uma espécie fundamental para análise de risco do algodão transgênico. Em operárias adultas, não foram observados efeitos do algodão resistente a insetos sobre a sobrevivência, ação da enzima superóxido dismutase e longevidade (Liu et al., 2005). Porém, não existem estudos semelhantes realizados com larvas da espécie.

## **Objetivos**

### **Objetivo geral:**

Desenvolver e implementar protocolos para avaliações de toxicidade de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos sobre abelhas, fornecendo subsídios para a análise de risco dessas plantas de maneira a cumprir com as exigências da regulamentação brasileira de biossegurança (Brasil, Lei nº 11.105). Devido à importância do algodão no agronegócio brasileiro e à liberação para plantio comercial de variedades Bt dessa planta no país, o algodão geneticamente modificado Bollgard, que sintetiza a proteína Cry1Ac, foi escolhido como estudo de caso.

### **Objetivos específicos:**

- 1) estabelecer protocolos para avaliação de toxicidade, em larvas de *Trigona spinipes*, de proteínas Bt utilizadas em plantas GM;
- 2) verificar se a entomotoxina Cry1Ac, quando adicionada ao alimento larval de *T. spinipes* e *Apis mellifera*, tem efeitos letais ou subletais em abelhas criadas em condições controladas.

**Quadro I - Proteínas Bt testadas em abelhas por meio de testes de toxicidade oral**

<b>Espécie testada</b>	<b>Toxina testada</b>	<b>Concentração</b>	<b>Tipo de alimento</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>Apis mellifera</i>	Cry3B	0,066% e 0,332% de toxina e o restante de solução de açúcar	Solução de açúcar	Mortalidade larval e peso seco das pupas tratadas com as duas concentrações inalteradas	Arpaia, 1996
<i>Apis mellifera</i>	Cry1Ba	1, 0,25, e 0,025% de massa de toxina e o restante de dieta de pólen	Pólen misturado a complementos alimentares	Sobrevivência e taxa de consumo de alimento pelas operárias adultas inalteradas	Malone et al., 1999
<i>Apis mellifera</i>	Cry1Ba	625µg toxina /g dieta de pólen	Pólen misturado a complementos alimentares	Idade do 1º vôo, duração dos vôos e longevidade inalteradas	Malone et al., 2001
<i>Apis mellifera</i>	Cry1Ab e Cry1F	Não especificada	Pólen de milho Bt expressando Cry1Ab ou Cry1F	Mortalidades larval e pupal, massa pupal e concentração protéica da hemolinfa inalterados	Hanley et al., 2003
<i>Apis mellifera</i>	Cry1Ba	0,625mg toxina /g dieta de pólen	Pólen misturado a complementos alimentares	Sobrevivência, largura dos ácidos e massa da glândula hipofaríngea de operárias adultas inalteradas	Malone et al., 2004
<i>Apis mellifera</i>	Cry1Ab	5ng de toxina/ g de pólen seco e 14,4µg de toxina/ml de solução de açúcar	Pólen de milho Bt e solução de açúcar misturada à toxina	Sobrevivência, largura dos ácidos e massa da glândula hipofaríngea de operárias adultas inalteradas	Babendreier et al., 2005
<i>Apis mellifera</i>	Cry1Ab	Não especificada	Pólen de milho Bt expressando Cry1Ab	Mortalidade de operárias inalterada	Bailey et al., 2005
<i>Apis mellifera</i>	Cry1Ac	0,4; 0,2 e 0,1 de pólen/ml de solução de açúcar	Pólen de algodão Bt expressando Cry1Ac	Mortalidade e atividade da enzima superóxido dismutase de operárias inalteradas	Liu et al., 2005

**Quadro I** - Proteínas Bt testadas em abelhas por meio de testes de toxicidade oral (continuação)

<b>Espécie testada</b>	<b>Toxina testada</b>	<b>Concentrações</b>	<b>Tipo de alimento</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>Apis mellifera</i>	Cry1Ab	1000 $\mu$ g Cry1Ab/kg solução	Solução de açúcar	Mortalidade, taxas de consumo do xarope e capacidade de aprendizado inalteradas (operárias). Houve redução na atividade forrageadora durante e depois do tratamento.	Ramirez-Romero et al., 2005
<i>Apis mellifera</i>	Cry1Ab	< 5ng/g de pólen seco e 0,0014% de massa de toxina e o restante de solução de açúcar	Pólen de milho Bt e solução de açúcar misturada à toxina	Comunidade bacteriana intestinal de operárias inalterada	Babendreier et al., 2007
<i>Apis mellifera</i>	Cry1Ab	2,8 ou 6,2ng de toxina/abelha	Pólen de milho Bt puro e misturado a solução de açúcar	Atividade forrageadora, performance da colônia, mortalidade e desenvolvimento de operárias inalterados.	Rose et al., 2007
<i>Bombus occidentalis</i>	Cry1Ac	11ng de toxina/ g de dieta de pólen	Pólen misturado à solução de açúcar (2 partes de massa de pólen: 1 parte de massa de açúcar)	Consumo de pólen, massa das operárias, tamanho da colônia, quantidade de prole e produção de rainhas e machos inalterados	Morandim & Winston, 2003
<i>Bombus impatiens</i>	Cry1Ac	11ng de toxina/ g de dieta de pólen	Pólen misturado à solução de açúcar (2 partes de massa de pólen: 1 parte de massa de açúcar)	Consumo de pólen, peso operárias, tamanho da colônia, quantidade de prole, produção de rainhas e machos e capacidade de forrageamento inalterados	Morandim & Winston, 2003

**Quadro II** - Inibidores de protease testados em abelhas por meio de testes de toxicidade oral

<b>Espécie testada</b>	<b>Inibidor testado <sup>1</sup></b>	<b>Concentrações</b>	<b>Tipo de alimento</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>Apis mellifera</i>	BPTI e SBTI	1% de inibidor (massa:volume)	Solução de açúcar	Diminuição da longevidade e da atividade de proteases intestinais de operárias	Malone et al., 1995
<i>Apis mellifera</i>	BPTI e SBTI	1; 0,5; 0,1% (massa:volume)	Solução de açúcar	Diminuição da longevidade e da atividade das proteases intestinais de operárias	Burgess et al., 1996
<i>Apis mellifera</i>	CpTI	330µg/ml	Solução de açúcar	Mortalidade inalterada; diminuição da capacidade de aprendizado de operárias	Picard-Nizou et al., 1997
<i>Apis mellifera</i>	Cystatin, OCI e BBI	330µg/ml	Solução de açúcar	Mortalidade inalterada; ingestão de BBI induziu formação de nova protease de operárias	Girard et al., 1998
<i>Apis mellifera</i>	POT-1 e POT-2	1 e 0,2% (massa:volume)	Pólen misturado a complementos alimentares	Diminuição da longevidade e da atividade de proteases intestinais de operárias	Malone et al., 1998
<i>Apis mellifera</i>	POT-1 POT-2	0,2 e 0,01% (massa:volume)	Solução de açúcar	Diminuição da longevidade e da atividade de proteases intestinais de operárias	Malone et al., 1998
<i>Apis mellifera</i>	SBTI	1; 0,5 e 0,05% (massa:massa)	Pólen misturado a complementos alimentares	Longevidade e taxa de consumo de alimento de operárias inalteradas	Malone et al., 1999
<i>Apis mellifera</i>	BBI e SBTI	0,01; 0,1 e 0,1 mg/ml	Solução de açúcar	Aumento da mortalidade, diminuição da capacidade de aprendizado e da atividade de proteases intestinais de operárias	Pham-Delègue et al., 2000

**Quadro II** - Inibidores de protease testados em abelhas por meio de testes de toxicidade oral (continuação)

Espécie testada	Inibidor testado 1	Concentrações	Tipo de alimento	Resultados	Referência
<i>Apis mellifera</i>	Aprotinina	2,5mg/g	Pólen misturado a complementos alimentares	Diminuição da longevidade de operárias, que voaram precocemente	Malone et al., 2001
<i>Apis mellifera</i>	SBTI	0,1 e 1% do total de proteínas (massa:massa)	Dieta artificial	Diminuição da sobrevivência, tempo de desenvolvimento e massa corporal das larvas	Brodsgaard et al., 2003
<i>Apis mellifera</i>	Aprotinina	2,5 mg/g de dieta	Pólen misturado a complementos alimentares	Glândula hipofaringeana de operárias tratadas apresentou maior massa; longevidade e taxa de consumo de alimento de operárias inalteradas	Malone et al., 2004
<i>Apis mellifera</i>	BBI	100µg.ml <sup>-1</sup>	Solução de açúcar	Atividade forrageadora inalterada	Dechaume-Moncharmont et al., 2005
<i>Apis mellifera</i>	SBTI	1%, 0,5% e 0,1% da dieta	Solução de pólen e açúcar	Redução do teor de proteína da glândula hipofaringeana, da atividade proteolítica intestinal e da sobrevivência de operárias adultas	Sagili et al., 2005
<i>Apis mellifera</i>	SBTI	0,1% e 1% (massa:volume)	Solução de açúcar	Redução da sobrevivência e da comunidade bacteriana intestinal de operárias	Babendreier et al., 2007
<i>Bombus terrestris</i>	BPTI POT-1 POT-2	10; 5; 1; 0,1 e 0,001 mg.g <sup>-1</sup>	Pólen misturado a complementos alimentares	Efeitos na sobrevivência (adultas)	Malone et al., 2000

1- Inibidores de protease descritos na tabela: BPTI= Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor; SBTI= Kunitz Soybean Trypsin Inhibitor; CptI= Kowpea Trypsin Inhibitor ;OCI = oryzacystatin; BBI= Bowman-Birk Soybean Inhibitor; Pot-1 e Pot-2= inibidores de protease isolados da batata;

## Referências bibliográficas

- Agi AL, Mahaffey JS, Bradley-Jr JR, Van-Duyn JW. Efficacy of seed mixes of transgenic *Bt* and nontransgenic cotton against bollworm, *Helicoverpa zea* Boddie. The Journal of Cotton Science 5, 74-80. 2001.
- Allen-Wardell G, Bernhardt P, Bitner R, Burquez A, Buchmann S, Cane J, Cox Pa, Dalton V, Feinsinger P, Ingram M, Inouye D, Jones CE, Kennedy K, Kevan P, Koopowitz H, Medellin R, Medellin-Morales S, Nabhna GP, Pavlik B, Tepedino V, Torchio P, Walker S. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. Conservation Biology 12, 8-17. 1998.
- Almeida MC, Laroca S. *Trigona spinipes* (Apidae, Meliponinae): taxonomia, bionomia e relações tróficas em áreas restritas. Acta Biológica Paranaense 17, 67-108. 1988.
- Anderson PL, Hellmich RL, Sears MK, Sumerford DV, Lewis LC. Effects of Cry1Ab expressing corn anthers on monarch butterfly larvae. Environmental Entomology 33, 1109-1115.
- Andow DA. UK farm-scale evaluations of transgenic herbicide-tolerant crops. Nature Biotechnology 21, 1453-1454. 2003.
- Anon. Bt plant-pesticides biopesticides registration action document, United States Environmental Protection Agency. [on line]. [http://www.epa.gov/scipoly/sap/2000/october/brad2\\_scienceassessment.pdf](http://www.epa.gov/scipoly/sap/2000/october/brad2_scienceassessment.pdf). 2000. (Consultado em 20/09/2005)
- Arpaia S. Ecological impact of Bt-transgenic plants: 1. Assessing possible effects of CryIIIb toxin on honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. Journal of Genetic and Breeding 50, 315-319. 1996.

- Arpaia, S; Imperatriz-Fonseca, VL; Pires, CSS; Silveira, FS. Non-target and biodiversity impacts on pollinators and flower visiting insects. In: Hilbeck, A., Andow, D., Fontes, E. (eds). *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms: Methodologies for Assessing Bt cotton in Brazil*. Cambridge, CABI Publishing, p.155-174. 2006.
- Atkins EL, MacDonald RL, Greywood-Hale EA. Repellent additives to reduce pesticide hazards to honey bees: field tests. *Environmental Entomology* 4, 207-210. 1975.
- Babendreier D, Joller D, Romeis J, Bigler F, Widmer F. Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *Microbiological Ecology* 59, 610. 2007.
- Babendreier D, Kalberer N, Romeis J, Fluri P, Bigler F. Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. *Apidologie* 35, 293-300. 2004.
- Babendreier D, Kalberer NM, Romeis J, Fluri P, Mulligan E, Bigler F. Influence of Bt-transgenic pollen, Bt-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. *Apidologie* 36, 585-594. 2005.
- Bailey J, Scott-Dupree C, Harris R, Tolman J, Harris B. Contact and oral toxicity to honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada. *Apidologie* 36, 623-633. 2005.
- Bates SL, Zhao JH, Roush RT, Shelton AM. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nature* 23, 57-62. 2005.
- Batra SWT. Bees and pollination in our changing environment. *Apidologie* 26, 361-370. 1995.
- Bobrowski VL, Fiuza LM, Pasquali G, Bodanese-Zanettini MH. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Ciência Rural* 34, 843-850. 2003.

- Bravo, A., Gill, S.S. Soberon, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control *Toxicon* 49, 423-435. 2007.
- Brasil. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Diário Oficial (da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 28 de março de 2005. Disponível em: <[www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11105.htm)> (Consultado em 22/07/2005).
- Brodsgaard HF, Brodsgaard CJ, Hansen H, Lövei GL. Environmental risk assessment of transgene products using honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *Apidologie* 34, 139-145. 2003.
- Burgess EPJ, Malone LA, Christeller JT. Effects of two proteinase inhibitors on the digestive enzymes and survival of honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* 42, 823-828. 1996.
- Caprio MA. Source-sink dynamics between transgenic and non-transgenic habitats and their role in the evolution or resistance. *Journal of Economic Entomology* 94, 698-705. 2001.
- Carlini CR, Grossi-de-Sá MF. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potencialiteis as bioinsecticides. *Toxicon* 40, 1539. 2002. [content/sci\\_tech/prod\\_safety/bollgard/es.pdf](http://content/sci_tech/prod_safety/bollgard/es.pdf). 2002. (Consultado em 15/08/2005).
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos: sétimo levantamento. Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília. 2008.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan P-L, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, Vanengelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283-287. 2007.
- Dale PJ, Clarke B, Fontes EMG. Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nature Biotechnology* 20, 567-843. 2002.

- Danka RG. High levels of cotton pollen collection observed for honey bees (Hymenoptera: Apidae) in South-Central Louisiana. *Journal of Entomological Science* 40, 316-326. 2005.
- Dechaume-Moncharmond FX, Azzouz H, Pons O, Pham-Delègue MH. Soybean proteinase inhibitor and the foraging strategy of free flying honeybees. *Apidologie* 36, 421-430. 2005.
- Eisikowitch D, Loper GM. Some aspects of flower biology and bee activity on hybrid cotton in Arizona, USA. *Journal of Apicultural Research* 23, 243-248. 1984.
- Estensen BJ, Buck NA, Waller GD, Taylor KS, Mamood A. Residual life and toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) of selected insecticides applied to cotton in Arizona. *Journal of Economic Entomology* 85, 700-709. 1992.
- Flint HM, Hennenberry TJ, Wilson FD, Holguin E, Parks N, Buehler RE. The effects of transgenic cotton, *Gossypium hirsutum* L., containing *Bacillus thuringiensis* toxin genes for the control of the pink bollworm, *Pectinofora gossypiella* (Saunders) and other arthropods. *Southwestern Entomology* 20, 281-292. 1995.
- Fontes EM, Pires CSS, Sujii ER. O impacto de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos sobre a biodiversidade. *In*: Pires CSS, Fontes EM, Sujii ER. (Eds.). *Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas - O algodão geneticamente modificado como estudo de caso*. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p65-83. 2003.
- Fontes EMG, Ramalho FS, Underwood E, Barroso PAV, Simon MF, Sujii ER, Pires CSS, Beltrão N, Lucena WA, Freire EC The cotton agricultural context in Brazil. *In*: Hilbeck A, Andow D, Fontes E. (Eds.). *Environmental risk assessment of genetically modified organisms: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil*. Cambridge, CABI Publishing, p. 21-66. 2006.
- Free JB. *Insect Pollination of crops*. Academic Press, Londres, 684p. 1993.

- Ghazoul J. Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. *Trends in Ecology and Evolution* 20, 367-373. 2005.
- Gill SS, Cowles EA, Pietrantonio PV. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology* 37, 615-636. 1992.
- Girard C, Picard-Nizou AL, Grallien E, Zacommer B, Jouanin L, Pham-Delegue MH. Effects of protease inhibitor ingestion on survival, learning abilities and digestive proteinases of the honeybee. *Transgenic Research* 7, 239-246. 1998.
- Goulson F. Effects of introduced bees on native ecosystems. *Annual Review of Entomology* 34, 1-26. 2003.
- Greenplate JT. Quantification of *Bacillus thuringiensis* insect control protein Cry1Ac over time in Bollgard cotton fruit an terminals. *Journal of Economic Entomology* 92, 1377-1383. 1999.
- Greenplate JT. Response to reports of early damage in 1996 commercial Bt-transgenic cotton (Bollgard®) plantings. *Society of Invertebrate Pathology Newsletter* 29, 15-18. 1997.
- Hagerty A, Kilpatrick A, Turnipseed S, Sullivan M, Bridges W. Predaceous arthropods and Lepidopteran pests on convetional, Bollgard, and Bollgard II cotton under untreated and disrupted conditions. *Environmental Entomology* 34, 105-114. 2005.
- Hanley AV, Huang ZY, Pett WL. Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. *Journal of Apicultural Research* 42, 77-81. 2003.
- Haq SK, Atif SM, Khan RH. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 431, 145-159. 2004.
- Heard TA. The hole of stingless bees in crop pollination. *Annual Review of Entomology* 44, 183-203. 1999.

- Hellmich RA, Sigfried BD, Sears MK, Stanley-Horn DE, Mattila HR, Spencer T, Bidine KD, Daniels MJ, Lewis, LC. Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis* – purified proteins and pollen. Proceedings of the National Academy of Sciences – USA 98, 11925-11930.
- Hilbeck A, Schmitt JED. Another view on Bt proteins - How specific are they and what else might they do? Biopesticides International 2, 1-50. 2006.
- Höfte H, Whiteley HR. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews 53, 242-255. 1989.
- Huang ZY, Hanley AV, Pett WL, Langenberger M, Duan JJ. Field and semifield evaluation of impacts of transgenic canola pollen on survival and development of worker honey bees. Journal of Economic Entomology 97, 1517-1523. 2004.
- Hunter MD. Between hyperbole and hysteria. Entomological issues and the deployment of transgenic plants. Agricultural and Forest Entomology 2, 84. 2000.
- Jank B, Gaugitsch H. Decision making under the Cartagena Protocol on Biosafety. Trends in Biotechnology 19, 194-197. 2001.
- Jongsma MA, Bolter C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. Journal of Insect Physiology 43, 885-895. 1997.
- Jouanin L, Bonadé-Bottino M, Girard C, Morrot G, Giband M. Transgenic plants for insect resistance. Plant Science 131, 1-11. 1998.
- Kearns CA, Inouye W. Pollinators, flowering plants, and conservation biology. BioScience 47, 297-307. 1997.
- Kevan PG, Baker HG. Insects as flowers visitors and pollinators. Annual Review of Entomology 28, 407-453. 1983.
- Kevan PG. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. Agriculture Ecosystems and Environment 74, 373-393. 1999.

- Kevan PG, Imperatriz-Fonseca, VL. (Eds.). Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature. Ministry of Environment, Brasília, 313p. 2002.
- Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C & Tscharntke T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B* 274, 303–313. 2007.
- Liu B, Xu C, Yan F, Gong R. The impacts of the pollen of insect-resistant transgenic cotton on honeybees. *Biodiversity and Conservation* 14, 3487-3496. 2005.
- Losey JE, Rayor LS, Carter ME. Transgenic pollen harms on monarch larvae. *Nature* 399, 214. 1999.
- Lövei GL, Arpaia S. The impact of transgenic plants on natural enemies: a critical review of laboratory studies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 114, 1-14. 2005.
- Luttrell RG, Fitt GP, Ramalho FS, Sugonyaev ES. Cotton pest management: Part 1. A worldwide perspective. *Annual Review of Entomology* 39, 517-526. 1994.
- Malone LA, Burgess EPJ, Christeller JT, Gatehouse HS. *In vivo* responses of honey bee midgut proteases to two protease inhibitors from potato. *Journal of Insect Physiology* 44, 141-147. 1998.
- Malone LA, Burgess EPJ, Gatehouse HS, Voisey CR, Tregidga EL, Philip BA. Effects of ingestion of a *Bacillus thuringiensis* toxin and a trypsin inhibitor on honey bee flight activity and longevity. *Apidologie* 32, 57-68. 2001.
- Malone LA, Burgess EPJ, Stefanovic D, Gatehouse HS. Effects of four protease inhibitors on the survival of worker bumblebees, *Bombus terrestris* L. *Apidologie* 31, 25-38. 2000.
- Malone LA, Burgess EPJ, Stefanovic D. Effects of a *Bacillus thuringiensis* toxin, two *Bacillus thuringiensis* biopesticide formulations, and a soybean trypsin inhibitor on honey bee (*Apis mellifera* L.) survival and food consumption. *Apidologie* 30, 465-473. 1999.

- Malone LA, Giacon HA, Burgess EPJ, Maxwell JZ, Christeller JT, Laing WA. Toxicity of trypsin endopeptidase inhibitors to honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 88, 46-49. 1995.
- Malone LA, Pham-Delègue M-H. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees. *Apidologie* 32, 287-304. 2001.
- Malone LA, Todd JH, Burgess EPJ, Christeller JT. Development of hypopharyngeal glands in adult honey bees fed with a Bt toxin, a biotin-binding protein and a protease inhibitor. *Apidologie* 35, 655-664. 2004.
- Malone LA, Tregidga EL, Todd JH, Burgess EPJ, Philip BA, Markwick NP, Poulton J, Christeller JT, Lester MT, Gatehouse HS. Effects of ingestion of a biotin-binding protein on adult and larval honey bees. *Apidologie* 33, 447-458. 2002.
- Mazier M, Pannetier C, Tourneur J, Jouanin L, Giband M. The expression of *Bacillus thuringiensis* genes in plant cells. *Biotechnology Annual Review* 3, 313-347, 1997.
- McGregor SE. Insect pollination of cultivated crop plants. Agriculture Research Service - USDA, Washington D.C., 411 p. 1976.
- Michelle, M. Ecology of transgenic crops. *American Scientist* 89, 160-197. 2001
- Michener, CD. The social behavior of the bees: a comparative study. Harvard University Press, Massachusetts, 404p. 1974.
- Monsanto Co. Safety assessment of Bollgard Cotton Event 531. *Product Safety Description*; Monsanto Co.: Disponível em <http://www.monsanto.com/monsanto/>. (Consultado em 10/09/2005).
- Morandin LA, Winston M. Effects of novel pesticides on bumble bee (Hymenoptera: Apidae) colony health and foraging ability. *Environmental Entomology* 32, 555-563. 2003.

- Moraes SS, Bautista ARL, Blandina FV. Avaliação da toxicidade aguda (DL<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub>) de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): Via de Contato. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 29, 31-37. 2000.
- Naranjo SE, Head G, Dively GP. Field studies assessing arthropod nontarget effects in Bt transgenic crops: introduction. Journal of Entomological Science 34, 1178-1180. 2005.
- Nieh JC, Barreto LS, Contrera FAL, Imperatriz-Fonseca, VL. Olfactory eavesdropping by a competitively foraging stingless bee, *Trigona spinipes*. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 271, 1633-1640. 2004a.
- Nieh JC, Contrera FAL, Yoon RR, Barreto LS, Imperatriz-Fonseca VL. Polarized short odor-trail recruitment communication by a stingless bee, *Trigona spinipes*. Behavioural Ecology and Sociobiology 56, 435-448. 2004b.
- Nieh JC, Kruizinga K, Barreto LS, Contrera FAL, Imperatriz-Fonseca VL. Effect of group size on the aggression strategy of an extirpating stingless bee, *Trigona spinipes*. Insectes Sociaux 52, 147-154. 2005.
- Nogueira-Neto, P. A criação das abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae). Chácaras e quintais, São Paulo, 365p. 1970.
- O'Callaghan M, Glare TR, Burgess EPJ, Malone LA. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. Annual Review of Entomology 50, 292. 2005.
- Oldroyd BP. What's killing american honey bees? PLoS Biology 5, 1195-1199. 2007.
- Pham-Delègue M-H, Girard C, Le Métayer M, Picard-Nizou AL, Hennequet C, Pons O, Jouanin L. Long-term effects of soybean protease inhibitors on digestive enzymes, survival and learning abilities of honeybees. Entomologia Experimentalis et Applicata 95, 21-29. 2000.
- Phillips SA, Simpson JL. Hybrid cotton pollination in relation to accumulated degree days. Agronomy Journal 81[6], 975-980. 1989.

- Picard-Nizou AL, Grison R, Olsen L, Pioche C, Arnold G, Pham-Delegue MH. Impact of proteins used in plant genetic engineering: toxicity and behavioural study in the honeybee. *Journal of Economic Entomology* 90, 1710-1716. 1997.
- Ramirez-Romero R, Chaufaux J, Pham-Delègue M-H. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie* 36, 601-611. 2005.
- Rhodes J. Cotton pollination by honeybees. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 42, 513-518. 2002.
- Romeis J, Meissle M, Bigler F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology* 24, 63-71. 2006.
- Rose R, Dively GP, Pettis J. Effects of Bt corn pollen on honey bees: emphasis on protocol development. *Apidologie* 38, 1-11. 2007.
- Sagili RR, Pankiw T, Zhu-Salzman K. Effects of soybean trypsin inhibitor on hypopharyngeal gland protein content, total midgut protease activity and survival on the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 51, 953-957. 2005.
- Saltykova ES, Ben'kovskaya GV, Gaifullina LR, Novitskaya OP, Poskryakov AV, Nikolenko AG. Reaction of individual physiological barriers in bacterial infection in different races of the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 41, 318-324. 2005.
- Sharma HC, Sharma KK, Crouch JH. Genetic transformation of crops for insect resistance: potential and limitations. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23, 47-72. 2004.
- Silveira FA. As abelhas e o algodão Bt no Brasil – uma avaliação preliminar. *In: Pires CSS, Fontes EM, Sujii ER. (Eds.). Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas - O algodão geneticamente modificado como estudo de caso. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p185-215. 2003.*

- Silveira FA, Melo GAP, Almeida EAB. Abelhas Brasileiras: sistemática e classificação. Silveira FA, Belo Horizonte, 253p. 2002.
- Slaa EJ, Sanchez LA, Sandi M, Salazar W. A scientific note on the use of stingless bees for commercial pollination in enclosures. *Apidologie*, 31, 141-142. 2000.
- Tanda AS. Bee pollination increases yield of 2 interplanted varieties of Asiatic cotton (*Gossypium arboreum* L.). *American Bee Journal* 124, 539-540. 1984.
- UNEP. Action for a sustainable future. Decisions from the sixth meeting of the conference of the parties to the convention on biological diversity, United Nations, The Hague, The Netherlands, Disponível em: <http://www.biodiv.org/doc/meetings/cop/cop-06/official/cop-06-20-en.pdf> (Consultado em 01/03/2006).
- van der Steen JJM. Review of the methods to determine the hazard and toxicity of pesticides to bumblebees. *Apidologie* 32, 399-406. 2001.
- Waller GD, Moffet JO, Loper GM, Martin JH. An evaluation of honey bee foraging activity and pollination efficacy for male-sterile cotton. *Crop Science* 25, 211-214. 1985.
- Wendel JF, Rowley R, Stewart JM. Genetic diversity in and phylogenetic relationships of the Brazilian endemic cotton, *Gossypium mustelinum* (Malvaceae). *Plant Systematics and Evolution* 192, 49-59. 1994.

# Capítulo 1

## Protocolos para avaliação dos efeitos de entomotoxinas em *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina)

### Introdução

Técnicas de biologia molecular permitem a inserção e expressão de genes responsáveis pela síntese de proteínas entomotóxicas em plantas de interesse agrônomico, tornando-as resistentes a insetos-praga (Jouanian et al., 1998). Uma das principais preocupações ecológicas relacionadas às culturas transgênicas resistentes a insetos são os possíveis efeitos deletérios sobre organismos não-alvo (Michelle, 2001).

As primeiras plantas transgênicas resistentes a insetos foram desenvolvidas com o uso de genes que codificam proteínas entomotóxicas derivadas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt). O uso dessas plantas apresenta inúmeros benefícios, como ausência de toxicidade sobre humanos e animais domésticos, redução do uso de inseticidas químicos, eficiência no controle de insetos-alvo ocasionando maior produtividade, preservação de insetos benéficos como inimigos naturais e redução de doenças fúngicas transmitidas às plantas por insetos-praga (Bobrowski et al., 2003).

O algodão transgênico Bollgard® (Bt), comercializado pela Monsanto a partir de 1996, combate de maneira eficaz algumas pragas importantes dessa cultura (Agi et al., 2001). Na China, por exemplo, o algodão Bt resultou em uma diminuição drástica no uso de inseticidas e ocasionou, em alguns plantios, o aumento das populações de insetos benéficos (Wu & Guo, 2005). Essa variedade transgênica expressa a proteína Cry1Ac, tóxica a várias espécies de Lepidoptera que causam importantes danos à cultura algodoeira (Agi et al., 2001).

Apesar das larvas de Lepidoptera se alimentarem somente de folhas, o promotor mais utilizado em plantas transgênicas é constitutivo, ocasionando a expressão da entomotoxina em todos os tecidos vegetais (Grossi-de-Sá & Romano, 2003). Vários tecidos do algodão transgênico expressam a toxina Cry1Ac (Greenplate, 1997, 1999), aumentando a

probabilidade de ocorrência de feitos não desejáveis sobre artrópodes não-alvo. Portanto, as análises de risco do algodão Bt devem envolver estudos de efeitos letais e subletais das proteínas sobre as espécies mais abundantes na cultura algodoeira.

De acordo com o Protocolo de Cartagena, a realização de análises de risco deve fornecer informações científicas e avaliar os possíveis efeitos adversos dos organismos geneticamente modificados sobre o ambiente, biodiversidade e saúde humana (Jank & Gaugitsch, 2001). No caso de plantas transgênicas, o risco ocorreria após a exposição dessas plantas ao ambiente (Wilkinson et al., 2003). Portanto, análises de risco de plantas transgênicas devem incluir testes toxicológicos em espécies que podem ser expostas às proteínas sintetizadas por essas plantas em condições de campo. Esses trabalhos devem ser conduzidos baseados na premissa do “pior cenário possível” (Wilkinson et al., 2003; Wilkinson, 2004), nos quais as espécies cujo risco de exposição será avaliado devem ser submetidas a altas concentrações de toxinas.

Potencialmente, a ingestão de pólen e néctar de plantas GM pode prejudicar os polinizadores (Malone & Pham-Delègue, 2001; Malone et al., 2002), animais fundamentais para o funcionamento de quase todos os ecossistemas terrestres, incluindo agroecossistemas (Kevan, 1999). Portanto, as análises de risco de plantas transgênicas devem incluir investigações sobre esses animais.

Importantes visitantes florais de plantas nativas e cultivadas, as abelhas são polinizadores-chave em regiões tropicais (Cane, 2001), além de serem os principais polinizadores da maioria das culturas agrícolas (Kevan, 1999). Abelhas podem ser prejudicadas devido ao contato direto ou indireto com substâncias produzidas por plantas GM. Efeitos diretos podem surgir após a ingestão de proteínas inseticidas expressas pelas plantas; indiretos podem ser consequência de alterações no fenótipo da planta devido à introdução do transgene (Malone & Pham-Delègue, 2001).

Devido ao seu valor econômico e como polinizador, *Apis mellifera* é a abelha que foi mais utilizada em estudos de análise de risco de entomotoxinas sintetizadas por plantas GM (revisado por Malone & Pham-

Delègue, 2001). Mesmo nessa espécie, poucos estudos desenvolveram metodologias para testes em larvas (Hanley et al., 2003; Banbendreier et al., 2004), período no qual provavelmente as abelhas estarão, em condições de campo, mais expostas às toxinas devido ao maior consumo de pólen do que durante a fase adulta.

Conhecidos popularmente como “abelhas indígenas sem ferrão” (Nogueira-Neto, 1970), os meliponíneos (Hymenoptera, Apidae, Meliponina) destacam-se pela riqueza e abundância de espécies nas regiões tropicais do mundo e subtropicais da América do Sul (Silveira et al., 2002). Vários trabalhos verificaram que essas abelhas podem ser polinizadores efetivos em plantações, tornando-se uma alternativa importante, em relação às abelhas melíferas, para a polinização comercial (revisado por Heard, 1999 e Slaa et al., 2006).

Apesar da sua importância ecológica e econômica, não existem estudos que avaliaram a toxicidade de proteínas expressas por plantas GM sobre espécies de meliponíneos. Dessa forma, é necessário que sejam desenvolvidos protocolos para a realização de testes de biossegurança de plantas GM sobre esses insetos. Tais protocolos devem permitir a adequação dos testes para serem realizados com diferentes espécies de meliponíneos e com diferentes proteínas. Assim, poderão ser avaliados produtos expressos em várias culturas visitadas por essas abelhas.

Em diferentes localidades do Brasil, *Trigona spinipes* é um dos meliponíneos mais abundantes em flores de algodão (Pires et al., 2006). A ocorrência de apenas uma colônia em determinado local pode ser suficiente para torná-la mais abundante nas flores do que outras abelhas, pois os ninhos possuem milhares de indivíduos (Almeida & Laroca, 1988). O raio de forrageamento ao redor do ninho é de 840 metros e as campeiras são capazes de comunicar a direção de fontes alimentares localizadas a 630 metros das colônias (Almeida & Laroca, 1988). A eficiência na capacidade de recrutamento e a capacidade das operárias de coletarem em flores de algodão em locais onde essa planta é a principal fonte de alimento também podem aumentar a ocorrência da espécie em plantações de *Gossypium* (Arpaia et al., 2006).

A abundância de *T. spinipes* em flores de algodão provavelmente está relacionada à habilidade no comportamento de forrageamento. As operárias são eficientes na exclusão de espécies competidoras (Nieh et al., 2005) e capazes de explorar trilhas de odor deixadas por outros meliponíneos para localização de alimento (Nieh et al., 2004a). As campeiras são capazes de indicar aos demais indivíduos da colônia distância, direção e altura de uma determinada fonte de alimento (Nieh et al., 2004b). Devido a essas características, *T. spinipes* é uma importante espécie para ser utilizada em avaliações de toxicidade de plantas geneticamente sobre insetos não-alvo.

A frequência de operárias de *T. spinipes* em flores de algodão, aumenta a probabilidade de que as larvas sejam expostas à ingestão da toxina Cry1Ac, pois os imaturos se alimentam do pólen coletado pelas campeiras e armazenado nas colônias. Estudos desenvolvidos por Babendreier et al. (2004) demonstraram que a ingestão direta de pólen é a única fonte significativa de produtos transgênicos para as larvas de abelhas. Segundo esses autores, a taxa de consumo de pólen pelas larvas deve ser conhecida para que sejam estabelecidas doses mais realistas de produtos transgênicos que serão administrados às larvas em estudos de avaliação de risco.

A primeira etapa das avaliações de risco de plantas GM sobre abelhas consiste na realização de testes com as proteínas purificadas (Malone et al., 2004). Portanto, as avaliações de toxicidade desenvolvidas durante este trabalho foram realizadas por meio de bioensaios com proteínas purificadas. Os objetivos desse estudo foram: a) desenvolver metodologias para a realização de testes de toxicidade de proteínas sintetizadas por OGMs sobre *T. spinipes* e b) testar a hipótese de que a ingestão da toxina Cry1Ac prejudica a sobrevivência, altera o tempo de desenvolvimento, das formas imaturas e/ou resulta na formação de operárias de *T. spinipes* menores.

## Material e Métodos

### Coleta e manutenção das colônias

Todas as colônias de *T. spinipes* utilizadas neste trabalho foram coletadas no município de Viçosa, MG, Brasil (20°45'S e 42°52'W), durante o primeiro semestre de 2006 e transferidas para o Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, onde foram mantidas em condições de campo.

### Teste da atividade da toxina

Para avaliar se essa proteína não seria inativada quando em contato com o alimento larval das abelhas, verificou-se o pH da dieta ingerida pelas larvas e a atividade da toxina após incorporação no alimento das abelhas.

Para análise do pH do alimento larval de *T. spinipes*, entre os dias 08/02 e 04/04/2006, coletaram-se favos de cria contendo ovos em 8 ninhos da espécie. O material foi transferido para laboratório, onde as células de cria foram desoperculadas e os ovos retirados com o auxílio de um estilete com a ponta dobrada em ângulo reto. Posteriormente recolheu-se 10ml de alimento larval em cada ninho, com o auxílio de uma bomba de sucção. O pH foi então medido com o auxílio de um pHmetro digital.

Bioensaios para avaliar efeitos de toxinas sobre organismos não-alvo devem ser conduzidos em condições que propiciem a exposição dos insetos à substância testada. Além disso, a presença e a atividade das toxinas devem ser comprovadas (Hilbeck & Schmidt 2006). Para verificar se as larvas de *T. spinipes* seriam realmente expostas à toxina Cry1Ac ativa, a proteína foi previamente testada em larvas de *Anticarsia gemmatalis*, lepidoptera suscetível à toxina Cry1Ac. As larvas de *A. gemmatalis*, utilizadas para os ensaios de atividade das toxinas, foram criadas em dieta artificial sólida preparada à base de feijão e gérmen de trigo, em câmara climatizada a  $25 \pm 20^{\circ}\text{C}$ , 70% U.R. e fotoperíodo de 12 horas.

A proteína Cry1Ac utilizada nos testes de toxicidade com *A. gemmatalis* e com *T. spinipes* foi produzida no Departamento de Bioquímica da Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, Estados Unidos. A toxina purificada foi armazenada na forma liofilizada, à temperatura de -15°C. Imediatamente antes da realização dos experimentos, a toxina era dissolvida em água e esta solução era misturada à dieta das lagartas ou das abelhas, para a realização dos bioensaios.

Verificou-se que as larvas de *T. spinipes* alimentam-se durante sete dias consecutivos do alimento larval. Em virtude disto, foram montados experimentos com *A. gemmatalis*, nos quais a toxina foi misturada ao alimento e este material foi mantido nas condições de criação das larvas ( $34 \pm 1^\circ\text{C}$  e 99%UR). Nos bioensaios, lagartas de segundo instar de *A. gemmatalis* foram submetidas à ingestão de dieta artificial misturada a quatro tratamentos: (1) água; (2) 50µg de Cry1Ac (quantidade tóxica às lagartas); (3) alimento larval de *T. spinipes* (4) alimento larval de *T. spinipes* misturado a 50µg de Cry1Ac. O experimento foi repetido 5 vezes, com 30 lagartas em cada repetição. As lagartas foram observadas por sete dias, e as taxas de mortalidade utilizadas como indicativo da atividade de Cry1Ac.

### **Determinação da concentração de toxina a ser testada**

É importante que os organismos não-alvo testados sejam expostos a padrões, duração e dosagens de produtos transgênicos no mínimo iguais às aquelas com que eles entrarão em contato na natureza (Marvier, 2002). Portanto, para que seja administrada a concentração adequada de proteína para as larvas de abelhas, deve-se conhecer o total de pólen ingerido aproximadamente por cada larva durante o desenvolvimento e multiplicá-lo pela concentração de proteína expressa no pólen das plantas modificadas. Para atingir esse objetivo, avaliou-se a proporção de pólen contida no alimento larval de *T. spinipes*.

Foram coletados favos contendo cria em fase de ovo em 4 ninhos de *T. spinipes*. As células de cria foram desoperculadas com o auxílio de

uma pinça e, após a retirada dos ovos, o alimento larval foi removido utilizando-se uma bomba de sucção. Coletaram-se 30ml de alimento em cada ninho, que foram distribuídos em 6 tubos de centrífuga (5ml por tubo). O alimento contido em cada tubo teve a massa avaliada em uma balança de precisão. O alimento então foi centrifugado até a total separação dos grãos de pólen da porção líquida do alimento larval. O sobrenadante foi descartado e o pólen deixado depositado na base dos tubos da centrífuga. Posteriormente, esse material foi mantido em estufa de secagem a 60°C até a desidratação completa, quando a massa seca do pólen foi determinada, utilizando a mesma balança de precisão.

### **Protocolos para criação de operárias de *T. spinipes***

O desenvolvimento de protocolos para a avaliação de toxicidade de proteínas GM sobre *T. spinipes* e a realização dos bioensaios com abelhas submetidas à ingestão de toxina Bt foram conduzidos em condições de laboratório, no Laboratório de Patologia Apícola da Universidade Federal de Viçosa.

Para adequação das técnicas de criação de *T. spinipes* em condições controladas foram montados experimentos preliminares utilizando larvas de primeiro instar coletadas nas colônias mantidas no Apiário da UFV. O desenvolvimento do protocolo para avaliação de toxicidade de proteínas Bt sobre a espécie envolveu modificações na metodologia original de criação de *T. spinipes* proposta por Buschini & Campos (1995) (Tabela I). Todo o material utilizado para montagem dos experimentos, coleta das larvas e sucção e acondicionamento do alimento foi autoclavado ou esterilizado com luz ultravioleta germicida em capela de segurança biológica.

O alimento fornecido às larvas foi obtido nas mesmas colônias onde foram coletadas as abelhas. Favos contendo cria jovem foram retirados dos ninhos com cuidado para que os ovos permanecessem em posição vertical sobre o alimento. Esse material era transferido para o laboratório, onde as células de cria foram desoperculadas e tiveram os ovos removidos com o auxílio de um estilete de metal com extremidade dobrada em

ângulo reto. O alimento larval foi removido dessas células sob condições assépticas, armazenado em frascos de vidro estéreis e homogeneizado. Posteriormente, com o auxílio de uma micropipeta de repetição, células artificiais foram preenchidas com 36µl de alimento, quantidade necessária para uma larva de operária de *T. spinipes* se alimentar (Buschini & Campos, 1995). Inicialmente testaram-se cápsulas de plástico transparente, com 50µl de volume, para criação das abelhas. Como os resultados não foram satisfatórios, passou-se a utilizar células artificiais confeccionadas com cera de *Apis mellifera*, conforme sugerido por Buschini & Campos (1995).

As células foram dispostas em placas de polipropileno de fundo arredondado (Placas de Elisa) e identificadas individualmente (Figura1A). Em bioensaios preliminares, após o provisionamento das células, larvas de primeiro ínstar (total de 30 unidades por repetição) foram retiradas dos favos e colocadas sobre o alimento com o auxílio do estilete. Cada célula foi mantida em uma cavidade da Placa de Elisa e fechada com opérculos também confeccionados com cera natural de *A. mellifera*.

As placas foram colocadas em frascos dessecadores mantidos em estufa do tipo B.O.D. a  $34 \pm 1^\circ\text{C}$ , 99% de umidade relativa e 24 horas de escotofase até o término do período de alimentação. Um disco de algodão de 5 cm de diâmetro era umedecido com água estéril e mantido no interior dos frascos para controle da umidade. Esse material permanecia sem contato direto com as Placas de Elisa e era trocado diariamente para evitar contaminação por fungos. Posteriormente, as células artificiais de cria foram retiradas dos frascos e mantidas na mesma estufa a  $34 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  de umidade e no escuro. A temperatura de  $34^\circ\text{C}$  foi escolhida por corresponder à da área de cria das colônias naturais da espécie (Sakagami, 1981). Durante a realização dos bioensaios preliminares, observou-se que, dependendo da localização no interior da estufa, a temperatura poderia variar em até  $1^\circ\text{C}$ . Com o objetivo de evitar que essa variação interferisse nos resultados dos experimentos, todos os frascos dessecadores contendo as placas eram modificados de posição no interior da estufa diariamente.

## **Avaliação da toxicidade da proteína Cry1Ac em operárias de *T. spinipes***

Nos bioensaios para testes de toxicidade foi utilizada a mesma metodologia descrita acima, porém transferiram-se ovos, ao invés de larvas, para as células artificiais de cera (Figura 1B). Cada tratamento continha 40 ovos da abelha individualizados em células de cera. Os experimentos foram repetidos 5 vezes, sendo que cada repetição continha ovos provenientes de uma colônia diferente, para evitar pseudorepetições. Os bioensaios foram montados entre os dias 12/07/2006 e 10/08/2006.

As operárias de *T. spinipes* foram submetidas aos seguintes tratamentos:

**Tratamento 1:** 35,1µl de alimento de *T. spinipes* + 0,9µl de solução de proteína Cry1Ac diluída em água destilada e autoclavada. A toxina foi fornecida às abelhas a uma concentração de 500µg/ml de dieta. Portanto, cada abelha se alimentou de 18µg de toxina, misturada ao alimento larval;

**Tratamento 2:** 35,1µl de alimento de *T. spinipes* + 0,9µl de água destilada e autoclavada (mesmo volume utilizado para adicionar Cry1Ac ao alimento no tratamento 1);

**Tratamento 3:** 36µl de alimento de *T. spinipes* puro (tratamento controle).

As formas imaturas das abelhas foram mantidas em estufa até a emergência dos adultos e observadas todos os dias, com o objetivo de se avaliar a mortalidade em cada estágio de desenvolvimento (ovo, larva e pupa) e ao longo dos dias (eclosão à emergência). O tempo de desenvolvimento, em dias, das formas imaturas foi medido nos diferentes tratamentos. As abelhas adultas foram coletadas logo após a emergência (prazo máximo de 24 horas) e anestesiadas a frio ( $-4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) por sete minutos. Como a toxina Cry1Ac inibe a alimentação em insetos-alvo (Gill et al., 1992; Bravo et al. 2007), cada abelha adulta, após ter sido anestesiada, teve a massa corporal avaliada utilizando-se uma balança de precisão.

As abelhas recém-emergidas foram fixadas em solução de metanol-ácido-acético (3:1), durante 24 horas, e mantidas em etanol a 70%. Posteriormente, tomaram-se medidas morfométricas de cada indivíduo, com o auxílio de uma ocular micrométrica acoplada a um microscópio estereoscópico. Os caracteres morfológicos analisados foram: largura da cabeça (distância máxima entre as margens laterais externas dos olhos compostos) e distância intertegular (distância mínima entre as margens das tégulas) (Bosch & Vicens, 2002). As medidas foram posteriormente convertidas para milímetros. Todos os parâmetros foram avaliados por meio de teste cego.

## **Avaliação da toxicidade da proteína Cry1Ac em rainhas de *T. spinipes***

A técnica de criação de rainhas de *T. spinipes* em condições controladas foi adaptada a partir da metodologia proposta por Buschini & Campos (1995). Segundo esses autores, fêmeas da espécie alimentadas com 306µl de alimento larval transformam-se em rainhas. Utilizando a mesma metodologia descrita para os testes com operárias, o alimento larval foi coletado nos favos e distribuído em células de cera com dimensões para receber 306µl de alimento e permitir o desenvolvimento adequado das rainhas. Placas de polipropileno para cultura de tecidos foram utilizadas como suporte para as células. Os testes foram montados com ovos coletados nos ninhos da espécie. Após a transferência dos ovos, as células artificiais foram fechadas com opérculos confeccionados com cera de *A. mellifera*.

As placas foram colocadas em frascos dessecadores mantidos em estufa do tipo B.O.D. a  $34 \pm 1^\circ\text{C}$ , 99% de umidade relativa e em 24 horas de escotofase até o término do período de alimentação. Posteriormente, as células artificiais foram retiradas dos frascos e mantidas na mesma estufa a  $34 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  de umidade e em 24 horas de escotofase. As larvas foram submetidas a três modos de exposição:

**Tratamento 1:** 298,35µl de alimento de *T. spinipes* + 7,65µl de solução de proteína Cry1Ac diluída em água destilada e autoclavada. Cada abelha se alimentou de 50µg de toxina, quantidade de Cry1Ac tóxica a espécies-alvo (Wright et al., 1997; Cerda et al., 2003);

**Tratamento 2:** 298,35µl de alimento de *T. spinipes* + 7,65µl de água destilada e autoclavada (mesmo volume utilizado para adicionar Cry1AC ao alimento no tratamento 1);

**Tratamento 3:** 306µl de alimento de *T. spinipes* puro (tratamento controle)

Cada tratamento continha 34 ovos provenientes da mesma colônia e individualizados em células de cera. A quantidade de água adicionada ao alimento larval nos tratamentos 1 e 2 correspondeu a 2,5% do total da solução fornecida para a alimentação das abelhas. Essa proporção foi escolhida por ser a mesma utilizada nos experimentos com operárias e

por ser o menor volume de água necessário para diluir a toxina. O experimento foi montado no dia 17/10/2006 e as abelhas foram observadas diariamente até a pupação e durante os dias próximos ao período de emergência.

### **Análises estatísticas**

A atividade da toxina após incorporação no alimento larval foi testada por meio de ANOVA e do teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer ( $p < 0,05$ ). O mesmo procedimento foi utilizado para comparar a proporção de pólen contida nos ninhos de *T. spinipes*. Todos os dados foram testados e não necessitaram ser transformados para satisfazer os pré-requisitos de igualdade de variância e de distribuição normal.

Diariamente, ao longo de todo o ciclo de desenvolvimento, registrou-se o número de abelhas mortas em cada Placa de Elisa e esses indivíduos foram removidos. A proporção de indivíduos mortos e o tempo de desenvolvimento nas fases de larva e pupa foram comparados por ANOVA, após a realização de testes para verificar os pré-requisitos de normalidade e homogeneidade de variância. A transformação dos dados não foi necessária.

Os efeitos das dietas sobre as abelhas foram determinados por meio de comparações da mortalidade e do tempo de desenvolvimento dos imaturos e da massa corporal, largura da cápsula cefálica e distância intertegular das abelhas recém-emergidas entre os diferentes tratamentos. Os dados foram inicialmente submetidos à análise de correlação de Pearson, utilizando o procedimento PROC CORR (SAS Institute, 2001). Como foram obtidas correlações significativas entre as variáveis morfológicas e a massa corporal, analisou-se os dados pelo método multivariado denominado MANOVA (SAS Institute, 2001). A análise multivariada (MANOVA) é recomendada quando duas ou mais variáveis são tomadas para cada indivíduo (Zar, 1999). A transformação dos dados não foi necessária.

## Resultados

### Teste da atividade da toxina

Os valores de pH obtidos no alimento de cada colônia encontram-se na Tabela II. O alimento larval de *T. spinipes* é ácido, tendo em média pH=3,74 (desvio padrão=0,14).

A mortalidade das larvas de *A. gemmatalis* variou entre os tratamentos (ANOVA, F=166,14; g.l.=3,16; p<0,0001; Figura 2). Não houve diferença entre as mortalidades de *A. gemmatalis* que ingeriram Cry1Ac pura e misturada ao alimento das abelhas (p>0,05; Figura 2). Além disto, a mortalidade de *A. gemmatalis* foi significativamente maior quando as larvas ingeriram alimento larval e Cry1Ac do que quando se alimentaram de água (p<0,001; Figura 2) ou de alimento larval puro (p<0,001; Figura 2). Estes resultados indicam que o elevado índice de mortalidade das larvas suscetíveis à toxina ocorreu devido à ingestão de Cry1Ac e não por causa de um efeito do alimento larval das abelhas. Portanto, o alimento larval de *T. spinipes* não inibiu a atividade de Cry1Ac após sete dias de incubação.

### Determinação da concentração de toxina a ser testada

A porcentagem de pólen seco no alimento larval diferiu significativamente entre os diferentes ninhos (F=29,22, g.l.=3,20, p<0,0001, Figura 3). A maior proporção de pólen encontrada foi de 11,51 ± 0,33% (média ± erro padrão) da massa do alimento e este valor foi utilizado para estimar a concentração mínima de Cry1Ac para ser fornecida às larvas, de acordo com a premissa do pior cenário possível (Wilkinson et al., 2003; Wilkinson, 2004).

O algodão transgênico Bollgard® expressa a toxina Bt no pólen a uma concentração de 0,6µg/g (Greenplate, 1997). Sabendo-se que as larvas ingerem 36µl de alimento durante o desenvolvimento e que aproximadamente 11,5% da massa desse alimento é composta por pólen, pode-se afirmar que as abelhas consomem cerca de 4,14mg de

pólen durante o desenvolvimento. Baseando-se nesse resultado e na concentração de Cry1Ac no pólen, conclui-se que se cada indivíduo se alimentasse exclusivamente de pólen de algodão GM, ingeriria 0,002484 $\mu$ g de Cry1Ac.

A proporção de toxinas Bt expressa nesse tecido pode variar de acordo com o tipo de promotor utilizado (Malone et al., 2004). Outros fatores como temperatura, idade da planta e limitação de nutrientes também podem interferir no nível de expressão das proteínas Cry no algodão (Greenplate, 1999; Chen et al., 2005; Coviella et al., 2000). Além disso, a toxina Cry1Ac produzida nos tecidos pode interagir com metabólitos secundários produzidos pelo algodão, interferindo na eficácia do controle sobre espécies-alvo (Olsen, 2005).

Por esta razão, nos bioensaios foi fornecida 18,0 $\mu$ g da toxina/larva, quantidade aproximadamente 7 mil vezes maior do que a que seria ingerida pelos indivíduos da colônia, se todo pólen armazenado no ninho fosse de algodão transgênico expressando a proteína Cry1Ac.

### **Protocolos para criação de operárias de *T. spinipes***

A utilização de células artificiais de plástico para criação das abelhas resultou na morte precoce de 100% das larvas, devido à rápida desidratação do alimento, razão pela qual esta metodologia foi descartada. Entretanto a utilização de células artificiais feitas com cera de *A. mellifera*, utilizando Placas de Elisa como base para sua fixação, foi adequada para o desenvolvimento de *T. spinipes* (Figuras 1 e 4), pois houve 91% de sobrevivência no tratamento com dieta pura (Tabela III).

A utilização de indivíduos na fase larval para montagem dos experimentos pode interferir nas análises de tempo de desenvolvimento dos imaturos, uma vez que é difícil a padronização da idade das larvas durante a transferência das abelhas. Para eliminar tal possibilidade, passamos a usar indivíduos na fase de ovo para a montagem dos bioensaios (Figuras 1A-C). Portanto nos bioensaios para testes de toxicidade, foram transferidos ovos (Figura 1B) - e não larvas - para as

cúpulas de cera. Como os bioensaios foram avaliados diariamente, pôde-se observar a data de eclosão de cada ovo e, conseqüentemente, determinar com precisão o tempo de desenvolvimento de cada larva estudada.

### **Avaliação da toxicidade da proteína Cry1Ac em operárias de *T. spinipes***

A mortalidade das operárias foi baixa em todas as fases de desenvolvimento e em todos os tratamentos (Tabela III). As análises não revelaram diferenças significativas entre os tratamentos quanto às mortalidades nas fases de ovo, larva e pupa (Tabela III), indicando que não há efeito da ingestão de Cry1Ac sobre a mortalidade das abelhas desde a eclosão até a emergência.

Os tempos de desenvolvimento nos estágios larval, pupal e da eclosão à emergência também não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela IV). Estes resultados demonstram que as ingestões de alimento larval diluído em água e misturado à solução de água e Cry1Ac não interferiram no tempo de desenvolvimento dos imaturos.

Houve correlações significativas entre a massa corporal das abelhas adultas com a largura da cápsula cefálica e com a distância intertegular (Tabela V). As medidas morfométricas também apresentaram correlações significativas entre si (Tabela V). A MANOVA não indicou diferenças significativas entre os tratamentos (Wilks lambda=0,4429; F=0,80; g.l.=10,16; p=0,6281), demonstrando que não há efeito da ingestão de Cry1Ac sobre os parâmetros avaliados.

### **Avaliação da toxicidade da proteína Cry1Ac em rainhas de *T. spinipes***

Apesar da metodologia utilizada para os testes com imaturos de rainhas ter sido adaptada dos protocolos desenvolvidos para testes com operárias, os resultados obtidos com a casta reprodutora não foram

satisfatórios. No tratamento controle, 79,41% das abelhas completaram o desenvolvimento, demorando em média  $69,37 \pm 3,66$  dias (média  $\pm$  desvio padrão) para empuparem e  $86,61 \pm 3,67$  dias (média  $\pm$  desvio padrão) para emergirem. Nos demais tratamentos, porém, 100% das abelhas morreram. No tratamento com a solução de água e toxina, 91,18% dos ovos eclodiram, mas as larvas não desenvolveram adequadamente e sobreviveram por no máximo 10 dias após a eclosão. No tratamento no qual se misturou apenas água ao alimento larval, 52,94% dos ovos eclodiram e o maior tempo de desenvolvimento larval foi de 6 dias.

Verificou-se que, nesses dois últimos tratamentos, o alimento larval mudou nitidamente de consistência ao longo do tempo e que as larvas não conseguiram ingeri-lo adequadamente, quando comparadas com as abelhas do tratamento controle. Conseqüentemente, o desenvolvimento das larvas que se alimentaram do alimento diluído foi mais lento do que as abelhas que consumiram alimento puro, e as larvas morreram precocemente.

## Discussão

A metodologia desenvolvida durante este trabalho é adequada para a realização de testes de toxicidade de proteínas sintetizadas por plantas GM sobre larvas de operárias de *T. spinipes* e pode ser utilizada para testes com outras toxinas e com pesticidas sintéticos, uma vez que 91% das abelhas que ingeriram alimento larval puro sobreviveram até a emergência. O protocolo também pode ser aplicado a outros meliponíneos, desde que alguns parâmetros como a quantidade de alimento a ser fornecida às larvas e o tamanho das células artificiais sejam adaptados a cada espécie.

Os testes realizados para verificar a atividade da toxina antes da montagem dos bioensaios são fundamentais para que as análises de toxicidade sejam válidas. O pH pode influenciar nos resultados, pois em alguns casos interfere na toxicidade das proteínas (Vegunopal et al., 1992; Tran et al., 2001). O pH ácido encontrado no alimento de *T. spinipes* não interferiu na atividade de Cry1Ac, verificado nos experimentos com *A. gemmatalis*.

O estabelecimento de dosagens das proteínas para os testes de toxicidade sobre abelhas depende do conhecimento da quantidade de pólen ingerido pelas larvas (Babendreier et al., 2004). Segundo esses autores, a ingestão direta de pólen é a única fonte significativa de produtos transgênicos para as larvas de abelhas. Em *T. spinipes*, observamos que cada larva ingere cerca de 4,14mg de pólen seco, o que exporia cada imaturo, em condições de campo, à ingestão de no máximo 0,002484 $\mu$ g de toxina Cry1Ac presente no pólen do algodão Bt.

A criação em células de plástico também foi ineficaz, uma vez que o alimento sofreu rápida desidratação, ocasionando a morte de todos os indivíduos. Esta alternativa foi testada porque larvas de *A. mellifera* são criadas em células artificiais de plástico (Rembold & Lackner, 1981; Silva et al., 2005). Porém as larvas de abelha melífera são alimentadas de forma progressiva, em intervalos regulares, não havendo tempo para a desidratação do alimento antes do consumo pelas abelhas. Já larvas de

meliponíneos recebem alimentação massal e, no caso de *T. spinipes*, levam em torno de 8 dias para terminar o consumo do alimento. Por esta razão, as larvas não conseguiam ingerir todo o alimento disponível, que desidratava antes desse período, causando a morte das abelhas na fase larval.

Os resultados dos bioensaios com *T. spinipes* demonstram que a proteína Cry1Ac, mesmo sendo fornecida às abelhas em uma concentração muito maior do que a correspondente aos níveis de expressão em pólen de algodão GM (Greenplate, 1997), não interferiu na mortalidade das operárias ao longo dos diferentes estágios de desenvolvimento. Além disso, a ingestão da toxina misturada ao alimento larval não alterou o tempo de desenvolvimento dos imaturos, a massa corporal das abelhas adultas e as medidas morfométricas estudadas. Como a alta dose de Cry1Ac oferecida às abelhas não alterou os parâmetros biológicos avaliados, é improvável que ocorram modificações nas condições de campo.

A ausência de efeitos diretos da toxina Cry1Ac observada no presente estudo difere dos encontrados em *Scaptotrigona tubiba*, outra espécie de abelha sem ferrão (Moraes et al., 2000). Estes autores observaram que a aplicação tópica de proteínas Bt em operárias aumentou a taxa de mortalidade dessas abelhas em condições de laboratório. Quando comparada com a ação de inseticidas sintéticos, entretanto, a letalidade ocasionada por Bt foi considerada baixa (Moraes et al., 2000). Em condições naturais, entretanto, é provável que mesmo a baixa mortalidade causada nesta espécie pelo contato tópico com toxinas Bt não seja observada, uma vez que essas proteínas atuam no intestino, após serem ingeridas pelos insetos.

A maioria das pesquisas desenvolvidas sobre a toxicidade de proteínas Bt em *A. mellifera* não verificou alterações na mortalidade em diferentes fases de desenvolvimento (Arpaia, 1996; Hanley et al., 2003; Malone et al., 2004); longevidade, taxa de consumo de alimento e comportamento de vôo (Malone et al., 1999; Malone et al., 2001; Liu et al., 2005); peso pupal e concentração proteica na hemolinfa dos adultos

(Arpaia, 1996; Hanley et al., 2003); desenvolvimento da glândula hipofaringeana (Malone et al., 2004) e atividade enzimática (Liu et al., 2005). Estes resultados estão de acordo com os obtidos durante o presente estudo com *T. spinipes*, sugerindo que a toxina Cry1Ac não é tóxica para as abelhas e que é pouco provável que ocorram alterações nos parâmetros avaliados quando as abelhas entrem em contato com flores de algodão Bt. É importante ressaltar, entretanto, que apesar da elevada concentração de toxina testada não ter indicado toxicidade para as abelhas ao longo do desenvolvimento, a hipótese de que o comportamento das operárias, em condições de campo, possa ser modificado não deve ser descartada. Dessa forma, pesquisas em condições de campo que avaliem, por exemplo, o comportamento de forrageamento, devem ser conduzidas para complementar os testes toxicológicos feitos em condições controladas.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que Cry1Ac não altera a sobrevivência das larvas de operárias, não afeta o tempo de desenvolvimento, das formas imaturas e/ou resulta na formação de operárias de *T. spinipes* menores. Porém, outros aspectos da bionomia das operárias devem ser investigados e também devem ser desenvolvidos protocolos para testes com rainhas. Como as toxinas Cry são tóxicas aos insetos-alvo durante a fase larval, a metodologia desenvolvida neste trabalho, envolvendo a criação de larvas desde o momento da eclosão, deve ser considerada em testes futuros de toxicidade de plantas GM sobre diferentes espécies de meliponíneos e, quando possível, aplicada a outros grupos de abelhas.

## Referências bibliográficas

- Agi, A.L., Mahaffey J.S., Bradley-Jr, J.R. & Van-Duyn, J.W. Efficacy of seed mixes of transgenic *Bt* and nontransgenic cotton against bollworm, *Helicoverpa zea* Boddie. *The Journal of Cotton Science* 5, 74-80. 2001.
- Almeida, M.C. & Laroca, S. *Trigona spinipes* (Apidae, Meliponinae): taxonomia, bionomia e relações tróficas em áreas restritas. *Acta Biológica Paranaense* 17, 67-108. 1988.
- Arpaia, S. Ecological impact of Bt-transgenic plants: 1. Assessing possible effects of CryIIIb toxin on honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Genetic and Breeding* 50, 315-319. 1996.
- Arpaia, S., Imperatriz-Fonseca, V.L., Pires, C.S.S., Silveira, F.S. Non-target and biodiversity impacts on pollinators and flower visiting insects. In: Hilbeck, A., Andow, D., Fontes, E. (eds). *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms: Methodologies for Assessing Bt cotton in Brazil*. Cambridge: CABI Publishing, 155-174. 2006.
- Babendreier, D., Kalberer, N., Romeis, J., Fluri, P. & Bigler, F. Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. *Apidologie* 35, 293-300. 2004.
- Bravo, A., Gill, S.S. Soberon, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control *Toxicon* 49, 423-435. 2007.
- Bobrowski, V. L., Fiuza, L.M., Pasquali, G. & Bodanese-Zanettini, M.H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Ciência Rural* 34, 843-850. 2003.
- Bosch, J. & Vicens, N. Body size as an estimator of production costs in a solitary bee. *Ecological Entomology* 27, 129-137. 2002.
- Buschini, M.L.T. & Campos, L.A.O. Caste determination in *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apidae): influence of the available food and the juvenile hormone. *Revista Brasileira de Biologia* 55, 121-129. 1995.

- Cane, J.H. Habitat fragmentation & native bees: a premature verdict? Conservation Ecology 5. Disponível em: <http://www.consecol.org/vol5/iss1/art3>. 2001. (Consultado em 20/09/2005)
- Cerda, H., Sayyed, A.H. & Wright, D.H. Laboratory culture conditions affect stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac in *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae). Journal of Applied Entomology 127, 142-145. 2003.
- Chen, D., Ye, G., Yang, C., Chen, Y. & Wu Y. The effect of high temperature on the insecticidal properties of Bt cotton. Environmental and Experimental Botany 53, 333-342. 2005.
- Coviella, C.E., Morgan, D.J.W., Trumble, J.T. Interactions of elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen fertilization: Effects on production of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic plants. Environmental Entomology, 29, 781-787.
- Gill SS, Cowles EA, Pietrantonio PV. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annual Review of Entomology 37, 615-636. 1992.
- Greenplate, J.T. Response to reports of early damage in 1996 commercial Bt-transgenic cotton (Bollgard®) plantings. Society of Invertebrate Pathology Newsletter 29, 15-18. 1997.
- Greenplate, J.T. Quantification of *Bacillus thuringiensis* insect control protein Cry1Ac over time in Bollgard cotton fruit an terminals. Journal of Economic Entomology 92, 1377-1383. 1999.
- Grossi-de-Sá, M.F. & Romano, E. Genética molecular de plantas para resistência a insetos. In: Pires, C.S.S., Fontes, E.M., Sujii, E.R. (Eds.). Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas - O algodão geneticamente modificado como estudo de caso. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 238p. 2003.

- Hanley, A.V., Huang, Z.Y. & Pett, W.L. Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. *Journal of Apicultural Research* 42, 77-81. 2003.
- Heard, T.A. The hole of stingless bees in crop pollination. *Annual Review of Entomology* 44, 183-203. 1999.
- Hilbeck, A. & Schmitt, J.E.D. Another view on Bt proteins - How specific are they and what else might they do? *Biopesticides International* 2, 1-50. 2006.
- Jouanin, L., Bonadé-Bottino, M., Girard C., Morrot, G. & Giband, M. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science* 131, 1-11. 1998.
- Kevan, P.G. 1999. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74, 373-393.
- Liu, B., Xu, C., Yan, F. & Gonc, R. The impacts of the pollen of insect-resistant transgenic cotton on honeybees. *Biodiversity and Conservation* 14, 3487-3496. 2005.
- Malone, L.A., Burgess, E.P.J., Gatehouse, H.S., Voisey, C.R., Tregidga, E. L. & Philip B.A. Effects of ingestion of a *Bacillus thuringiensis* toxin and a trypsin inhibitor on honey bee flight activity and longevity. *Apidologie* 32, 57-68. 2001.
- Malone, L.A., Burgess, E.P.J. & Stefanovic, D. Effects of a *Bacillus thuringiensis* toxin, two *Bacillus thuringiensis* biopesticide formulations, and a soybean trypsin inhibitor on honey bee (*Apis mellifera* L.) survival and food consumption. *Apidologie* 30, 465-473. 1999.
- Malone, L.A., Tregidga, E.L., Todd, J.H., Burgess E.P.J., Philip, B.A., Markwick, N.P., Poulton, J., Christeller, J.T., Lester, M.T. & Gatehouse, H.S. Effects of ingestion of a biotin-binding protein on adult and larval honey bees. *Apidologie* 33, 447-458. 2002.
- Malone, L. A. & Pham-Delégue, M-H. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees. *Apidologie* 32, 287-304. 2001.

- Malone, L.A., Todd, J.H., Burgess, E.P.J. & Christeller, J.T. Development of hypopharyngeal glands in adult honey bees fed with a Bt toxin, a biotin-binding protein and a protease inhibitor. *Apidologie* 35, 655-664. 2004.
- Marvier, M. Improving risk assessment for nontarget safety of transgenic crops. *Ecological Applications* 12, 1119-1124. 2002.
- Michelle, M. Ecology of transgenic crops. *American Scientist* 89, 160-197. 2001.
- Moraes, S.S., Bautista, A.R.L. & Blandina, F.V. Avaliação da toxicidade aguda (DL<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub>) de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): Via de Contato. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 29, 31-37. 2000.
- Nieh, J.C., Barreto, L.S., Contrera, F.A.L. & Imperatriz-Fonseca, V.L. Olfactory eavesdropping by a competitively foraging stingless bee, *Trigona spinipes*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271, 1633-1640. 2004a.
- Nieh, J.C., Contrera, F.A.L., Yoon, R.R., Barreto, L.S. & Imperatriz-Fonseca, V.L. Polarized short odor-trail recruitment communication by a stingless bee, *Trigona spinipes*. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 56, 435-448. 2004b.
- Nieh, J.C., Kruizinga K., Barreto, L.S., Contrera, F.A.L., & Imperatriz-Fonseca, V.L. Effect of group size on the aggression strategy of an extirpating stingless bee, *Trigona spinipes*. *Insectes Sociaux* 52, 147-154. 2005.
- Nogueira-Neto, P. A criação das abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae). São Paulo, Chácaras e quintais, 365p. 1970.
- Olsen K.M., Daly J.C., Finnegan E.J. & Mahon R.J. Changes in Cry1Ac Bt transgenic cotton in response to two environmental factors: temperature and insect damage. *Journal of Economic Entomology* 98, 4, 1382-1390. 2005.
- Pires, C.S.S., Silveira, F.A., Cardoso, C.F., Oliveira, G.M., Pereira, F.F.O., Souza, V.V., Nakasu, E.Y.T., Paes, J.S.O., Teles, E., Silvie, P.,

- Rodrigues, S., Miranda, J., Scomparini, A., Bastos, C., Oliveira, G.S., Oliveira, J.E., Santos, J.B., Barroso, P.A.V., Sujii, E. & Fontes, E.M.G. Visitantes florais em espécies cultivadas e não cultivadas de algodoeiro (*Gossypium spp*), em diferentes regiões do Brasil. Série Embrapa, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia 148, 1-40. 2006.
- Rembold, H. & Lackner, B. Rearing of honeybee larvae in vitro: effect of yeast extract on queen differentiation. Journal of Apicultural Research 20, 165-171. 1981.
- Sakagami, S.F. Stingless Bees. *In*: Hermann, H.R. (ed.). Social insects. Vol. 3, New York, Academic Press. 1981.
- SAS Institute. User's Guide: Statistics, Version 8.2, 6th Edition. Cary, NC., SAS Institute, 2001.
- Silva, I.C., Message, D., Damião-Cruz, C., & Silva, M.V.G.B. Aplicação de análises multivariadas para determinação de casta de abelhas *Apis mellifera* L. (africanizadas), obtidas em laboratório. Revista Brasileira de Zootecnia 34, 635-640. 2005.
- Silveira, F.A., Melo, G.A.P. & Almeida, E.A.B. Abelhas Brasileiras: sistemática e classificação. Belo Horizonte, Silveira, F.A., 253p. 2002.
- Slaa, E.J., Sanchez, L.A., Sandi, M. & Salazar, W. A scientific note on the use of stingless bees for commercial pollination in enclosures. Apidologie, 31, 141-142. 2000.
- Tran, L.B., Vachon V., Schwartz J.L., & Laprade, R.. Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins. Applied and Environmental Microbiology 67, 488-4494. 2001.
- Vegunopal, M.G., M.G. Wolfersberger, & B.A. Wallace. Effects of pH on conformational properties related to the toxicity of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. Biochimica et Biophysica Acta 1159, 185-192. 1992.
- Wilkinson, M.J. Abandoning 'responsive' GM risk assessment. Trends in Biotechnology 22, 438-439. 2004.

- Wilkinson, M.J., Sweet, J. & Poppy, G.M. Risk assessment of GM plants: avoiding gridlock? *Trends in Plant Science* 8, 208-212. 2003.
- Wright, D.J., Lobal, M., Granero, F., & Ferré, J. A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only in part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1814-1819. 1997.
- Wu, K.M. & Guo, Y.Y. The evolution of cotton pest management practices in China. *Annual Review of Entomology* 50, 31-52. 2005.
- Zar, J.H. *Biostatistical analysis*. New Jersey, Prentice-Hall, 4th ed., 663p. 1999.

**Tabela I** – Alterações realizadas, em relação à metodologia original, para adequar a criação de *T. spinipes* em condições controladas para testes de toxicidade com proteínas entomopatogênicas.

<b>Material e métodos utilizados para criação</b>	<b>Metodologia original (Buschini &amp; Campos, 1995)</b>	<b>Modificações realizadas para testes de toxicidade</b>
Suporte para cúpulas de cera	Placas de Petri contendo disco de Isopor® perfurado	Placas de Elisa
Estágio de desenvolvimento das abelhas	Larvas recém-emergidas	Ovos
Número de abelhas utilizadas por repetição	30 ou 15 indivíduos	40 indivíduos

**Tabela II** – pH do alimento larval de colônias de *T. spinipes* coletadas no município de Viçosa, MG

<b>Colônia</b>	<b>Data de coleta</b>	<b>pH do alimento larval</b>
A	8/02/06	3,96
B	22/02/06	3,64
C	10/03/06	3,53
D	17/03/06	3,83
E	22/03/06	3,67
F	29/03/06	3,7
G	04/04/06	3,87
H	04/04/06	3,73
Média		3,74
Desvio Padrão		0,14

**Tabela III** – Mortalidade média (%)  $\pm$  erro padrão de operárias de *T. spinipes* alimentadas com alimento larval puro, diluído em água e misturado à solução de água e proteína Cry1Ac, ao longo das fases de desenvolvimento.

<b>Fases do desenvolvimento</b>	<b>Alimento puro (controle)</b>	<b>Alimento + água</b>	<b>Alimento + água + Cry1Ac</b>
Ovo <sup>1</sup>	3,5 $\pm$ 1,87 a	3,5 $\pm$ 1a	4,5 $\pm$ 2,29 a
Larva <sup>2</sup>	4,5 $\pm$ 2,67 a	8,5 $\pm$ 2,32 a	7,5 $\pm$ 2,5 a
Pupa <sup>3</sup>	0,5 $\pm$ 0,5 a	1,5 $\pm$ 1 a	1 $\pm$ 1 a
Total <sup>4</sup>	8,5 $\pm$ 3,02 a	13,5 $\pm$ 2,45 a	13 $\pm$ 3,66 a

Letras iguais indicam que não há diferenças significativas entre os resultados das linhas.

<sup>1</sup> ANOVA, F=0,1, g.l. 2,12, p=0,9

<sup>2</sup> ANOVA, F=0,52, g.l. 2,12, p=0,69

<sup>3</sup> ANOVA, F=0,33, g.l. 2,12, p=0,72

<sup>4</sup> ANOVA, F=0,8, g.l. 2,12, p=0,47

**Tabela IV.** Período médio de desenvolvimento, em dias, de imaturos de *T. spinipes* submetidos à ingestão de alimento larval puro, diluído em água e misturado à solução de água e proteína Cry1Ac.

<b>Fases do desenvolvimento</b>	<b>Alimento puro (controle)</b>	<b>Alimento + água</b>	<b>Alimento + água + Cry1Ac</b>
Período larval <sup>1</sup>	17,02 ± 0,42 a	16,92 ± 0,27 a	17,02 ± 0,37 a
Período pupal <sup>2</sup>	17,34 ± 0,52 a	17,29 ± 0,34 a	17,31 ± 0,59 a
Período total <sup>3</sup>	34,36 ± 0,41 a	34,21 ± 0,24 a	34,33 ± 0,46 a

Letras iguais indicam que não há diferenças significativas entre os resultados das linhas

1- ANOVA, F=0,13, p=0,879, g.l.=2,12

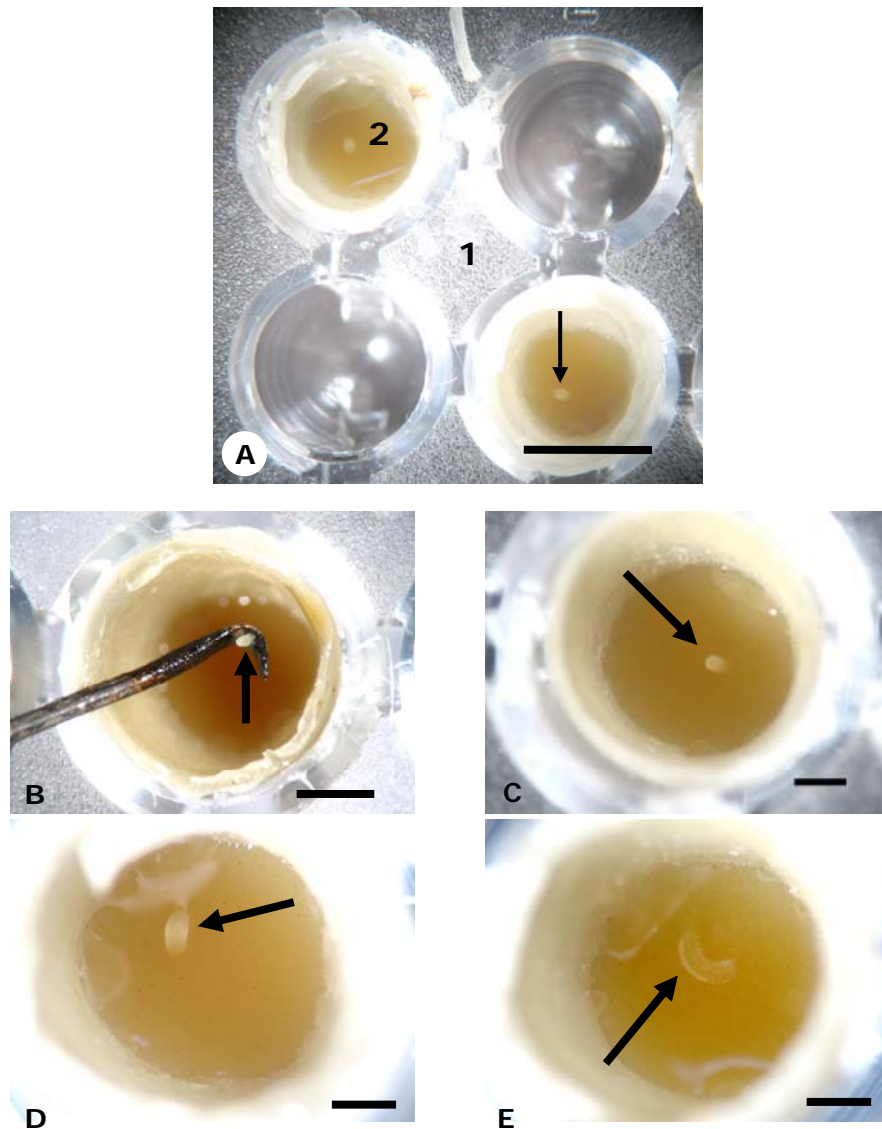
2- ANOVA, F=0,013, p=0,987, g.l.=2,12

3- ANOVA, F=0,217, p=0,808, g.l.=2,12

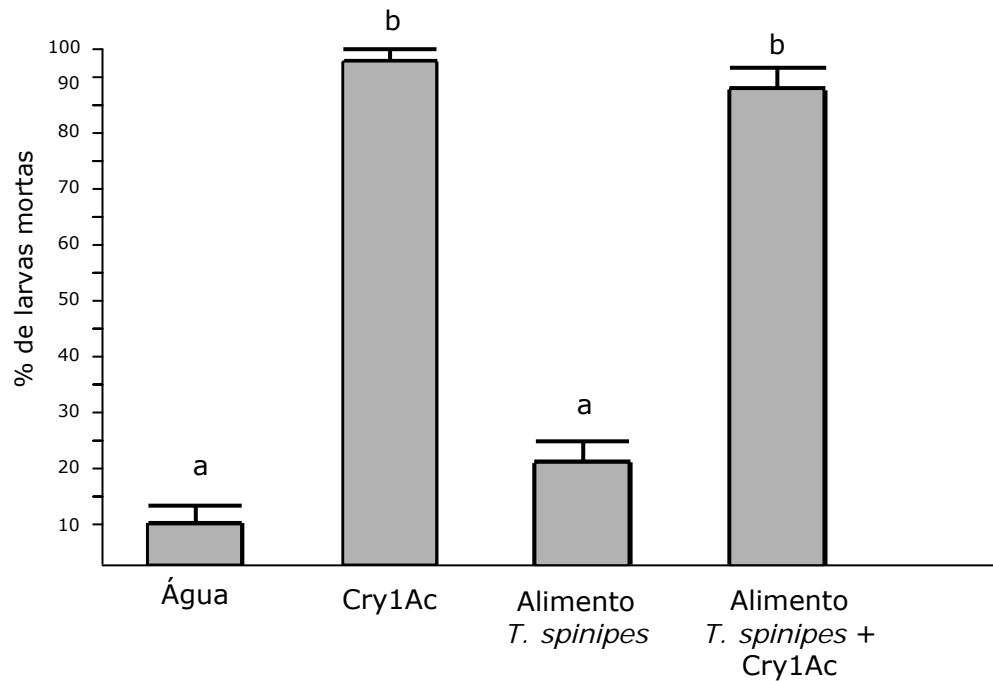
**Tabela V-** Correlações de Pearson (r) entre as variáveis estudadas para avaliar efeitos da ingestão de Cry1Ac sobre *Trigona spinipes*.

<b>Variável 1</b>	<b>Variável 2</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
Mortalidade	Massa corporal	-0,40017	0,1394 <sup>ns</sup>
Mortalidade	Tempo de desenvolvimento	-0,04258	0,8802 <sup>ns</sup>
Mortalidade	Distância intertegular	-0,32955	0,2303 <sup>ns</sup>
Mortalidade	Largura da cápsula cefálica	0,32186	0,2421 <sup>ns</sup>
Tempo de desenvolvimento	Massa corporal	0,35266	0,1973 <sup>ns</sup>
Tempo de desenvolvimento	Distância intertegular	0,23753	0,3940 <sup>ns</sup>
Tempo de desenvolvimento	Largura da cápsula cefálica	0,42890	0,1107 <sup>ns</sup>
Massa corporal	Distância intertegular	0,90704	<0,0001*
Massa corporal	Largura da cápsula cefálica	0,92311	<0,0001*
Distância intertegular	Largura da cápsula cefálica	0,90182	<0,0001*

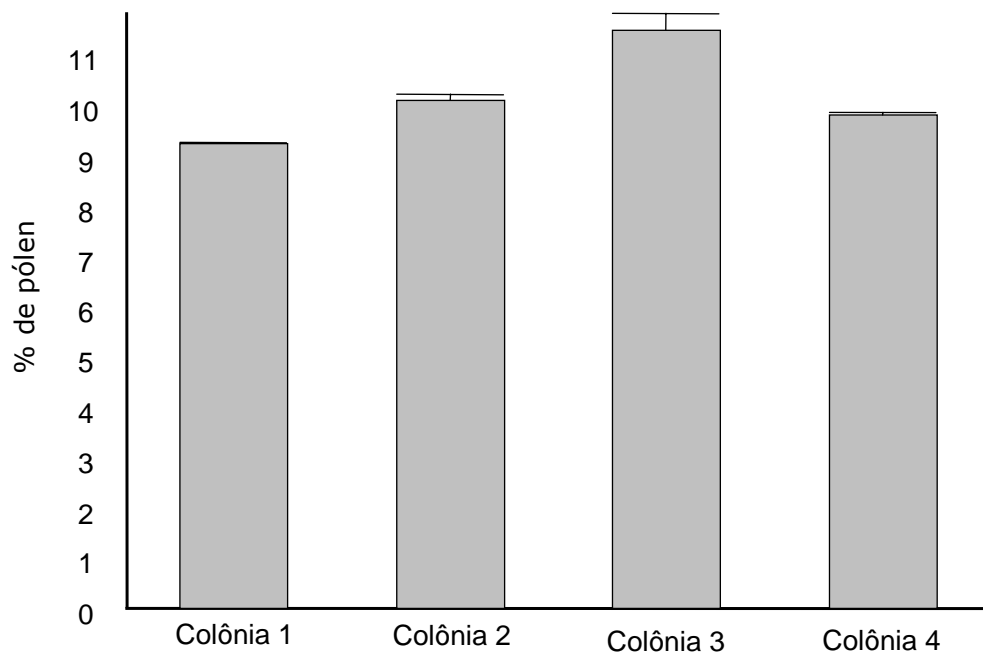
\* Significativo a 0,01% de probabilidade



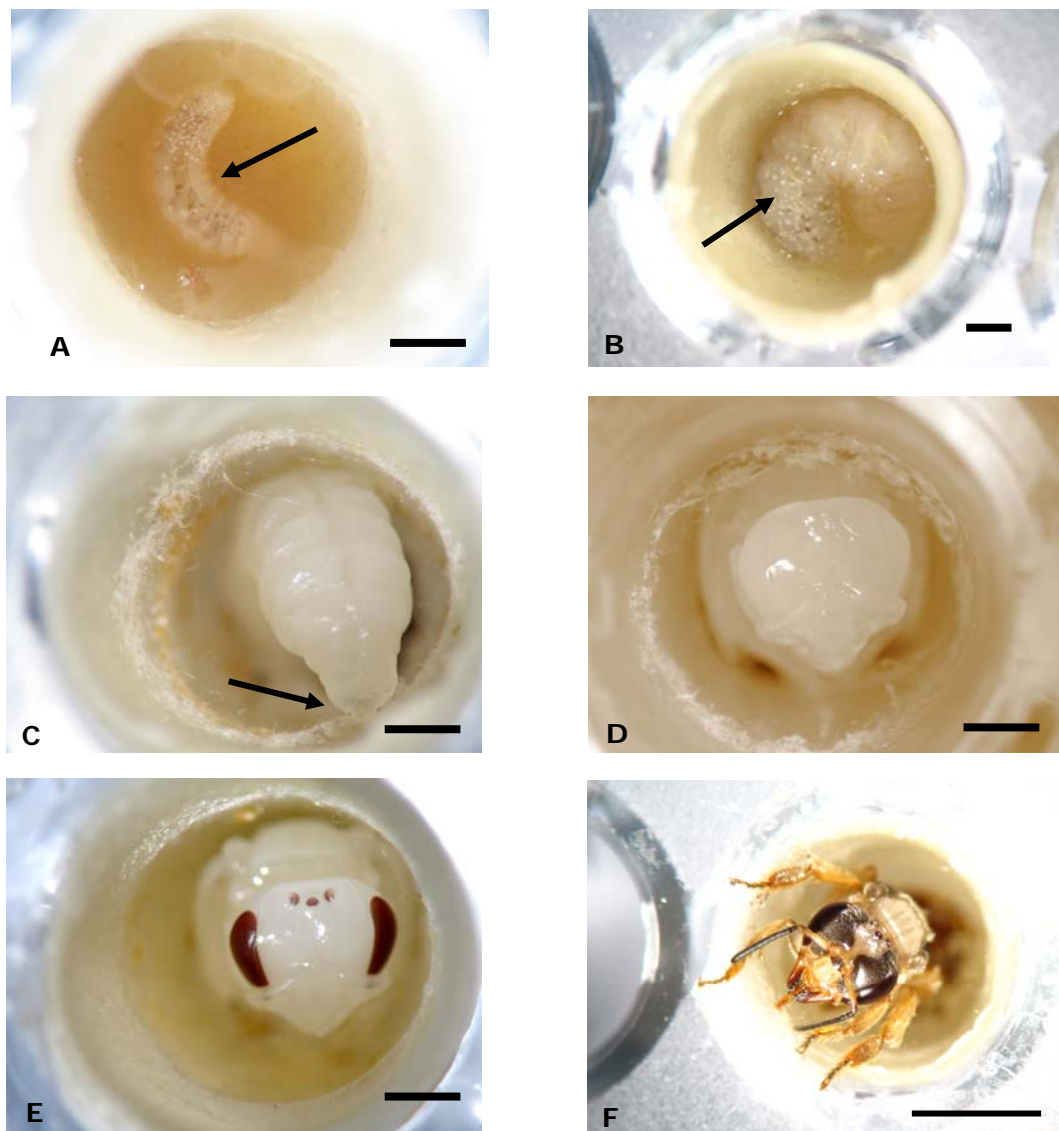
**Figura 1** – Bioensaios com *Trigona spinipes*. Figura 1A: Placa de Elisa (1) com células artificiais contendo larvas de primeiro instar (seta) sobre alimento larval (2); Figura 1B: Transferência de ovo (seta) para célula previamente preenchida com alimento; Figura 1C: Ovo sobre alimento larval após transferência; Figura 1D: Larva logo após eclosão (seta); Figura 1E: Larva com idade de dois dias (seta). Barras: A = 5 mm, B-E = 1 mm.



**Figura 2** – Mortalidade média (%) de larvas de *Anticarsia gemmatalis* ( $\pm$  erro padrão) submetidas à ingestão de dieta artificial com água (controle), dieta artificial misturada com a proteína Cry1Ac (50 $\mu$ g/larva), dieta artificial + alimento larval de *T. spinipes* e dieta artificial + alimento larval de *T. spinipes* incubado + Cry1Ac (50 $\mu$ g/larva). A mortalidade foi avaliada sete dias após a montagem dos bioensaios. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,001$ ).



**Figura 3** – Porcentagem de massa seca do pólen (média  $\pm$  erro padrão) contido no alimento larval de *Trigona spinipes*.



**Figura 4** – Bioensaios com *Trigona spinipes*. Figura 4A: Larva com seis dias de idade (seta) sobre alimento larval; Figura 4B: Larva com nove dias de idade (seta) após término da ingestão do alimento larval; Figura 4C: Larva com quinze dias de idade tecendo casulo (seta); Figura 4D: Pupa com 18 dias de idade; Figura 4E: Pupa com 26 dias de idade. Figura 4F: Abelha adulta (35 dias) emergindo. Barras: A-E = 1 mm, F = 2,5 mm.

## Capítulo 2

## **Biossegurança da toxina Cry1Ac do *Bacillus thuringiensis* em larvas de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae)**

### **Introdução**

A área de plantio de culturas transgênicas que expressam entomotoxinas derivadas de *Bacillus thuringiensis* tem aumentado em vários países (Hilbeck & Schmidt, 2006), inclusive no Brasil. A coleta de recursos nas flores dessas variedades, expõe as abelhas ao contato com esses produtos. Por esta razão, vários estudos avaliaram a toxicidade de proteínas sintetizadas por variedades Bt em abelhas (revisado por Malone & Pham-Delègue, 2001).

Como proposto para outros organismos não-alvo, a análise de risco de plantas GM em *Apis mellifera* deve seguir uma seqüência de testes realizados em laboratório, condições de confinamento – como casas de vegetação – e em condições de campo. As primeiras avaliações devem ser conduzidas em condições controladas de laboratório, onde abelhas individualizadas devem ser expostas a altas doses de produtos transgênicos para verificar efeitos da toxina (Dechaume-Moncharmont et al., 2005).

Recentemente, relatos do desaparecimento de operárias das colméias de *A. mellifera* nos Estados Unidos e Europa, ocasionando altas taxas de mortalidade dos ninhos, chamaram a atenção para a necessidade de se implementar protocolos adequados para investigar as prováveis causas do fenômeno. Conhecido como “colapso das colméias” (colony collapse disorder – CCD), o processo é caracterizado pela queda na população de adultos da colméia, mas indivíduos mortos não são observados no interior e proximidades dos ninhos (Oldroyd, 2007; Stockstad, 2007).

Dentre as hipóteses levantadas para as causas do processo estão a expansão de culturas GM, o uso de inseticidas e a qualidade dos alimentos ingeridos pelas abelhas (Oldroyd, 2007; Stockstad, 2007). Apesar de o contato com plantas GM ser uma improvável causa do CCD (Cox-Foster et al., 2007; Oldroyd, 2007), devem ser desenvolvidas

metodologias para avaliar os efeitos dessas plantas e outros pesticidas sobre *A. mellifera*, importante polinizador de diversos agroecossistemas (Allen-Wardell et al., 1998).

A maioria dos trabalhos sobre análise de risco de plantas Bt em *A. mellifera* avaliou os efeitos das entomotoxinas apenas em operárias adultas (e.g. Arpaia, 1996; Malone et al., 1999; Malone et al., 2001; Malone et al., 2004; Babendreier et al., 2005; Bailey et al., 2005; Liu et al., 2005; Ramirez-Romero et al., 2005; Babendreier et al., 2007; Rose et al., 2007). Porém a toxicidade de inseticidas sobre abelhas pode acarretar aumento da mortalidade larval, provocando decréscimo da população das colméias e diminuição da polinização (van der Steen, 2001). Além disso, compostos letais à cria podem ter efeitos sobre os ninhos por vários dias após o contato com as abelhas (van der Steen, 2001). Por não serem capazes de escolher o próprio alimento, larvas de abelhas são provavelmente mais sensíveis do que os adultos aos produtos sintetizados por plantas GM (Brodsgaard et al., 2003) e a ingestão de pólen pode expor larvas de *A. mellifera* às toxinas Bt (Babendreier et al., 2004). Segundo Aupinel et al. (2005) testes realizados *in vitro* sobre larvas devem ser a primeira etapa para a realização de análises de risco sobre a prole da abelha melífera.

Investigações sobre os efeitos do alimento larval sobre o desenvolvimento das abelhas não podem ser realizadas em colméias, devido à detecção e remoção de larvas doentes pelas abelhas nutrizas (Brodsgaard et al., 2000). Por esta razão, técnicas para criação de larvas de *A. mellifera* em condições controladas têm sido desenvolvidas por vários autores (Michael & Abramovitz, 1955; Herbert & Shimanuki, 1978; Shuel & Dixon, 1986; Brodsgaard et al., 1998; Mckee et al., 2004; Aase et al., 2005; Aupinel et al., 2005; Silva et al., 2005).

A criação de larvas desta espécie *in vitro* deve ser adaptada para testes de toxicidade de proteínas sintetizadas por plantas transgênicas resistentes a insetos. Essas avaliações devem ser incluídas nos procedimentos para análise de risco de plantas GM (Brodsgaard et al., 2003). Larvas da abelha melífera foram submetidas à ingestão de

algumas dessas toxinas em condições controladas (Malone et al., 2002; Brodsgaard et al., 2003) ou na própria colméia (Arpaia, 1996; Hanley et al., 2003;). Porém, a toxicidade da entomotoxina Cry1Ac, expressa no pólen do algodão GM (Greenplate, 1997), não foi avaliada em larvas dessas abelhas.

O plantio comercial do algodão Bt foi liberado no Brasil em março de 2005. *A. mellifera* é considerada o principal polinizador do algodão em diversas partes do mundo (Free, 1993) e é a abelha mais abundante em plantações de algodão no país (Arpaia et al., 2006). O forrageamento das operárias em plantações de algodão aumenta a produtividade e qualidade das fibras, a produção de sementes normais e híbridas, a taxa de germinação, diminui o tempo de colheita e causa melhoria na qualidade das sementes (McGregor, 1976; Tanda, 1984; Waller et al., 1985; Phillips & Simpson, 1989; Rhodes, 2002).

Os objetivos do presente estudo foram testar as seguintes hipóteses: 1) a ingestão da toxina Cry1Ac pelas larvas aumenta a mortalidade ou altera o tempo de desenvolvimento de imaturos de *A. mellifera*; 2) larvas alimentadas com Cry1Ac originam operárias menores do que larvas não tratadas com a entomotoxina. Para verificar a primeira hipótese determinou-se a mortalidade diária e o tempo de desenvolvimento das larvas e pupas. A massa corporal, a largura da cápsula cefálica e a distância intertegular das abelhas recém-emergidas foram utilizadas como parâmetros para avaliações de efeitos sub-letais da toxina sobre as larvas tratadas.

## Material e métodos

### Coleta e manutenção das colônias

Cinco colméias de *Apis mellifera* coletadas no município de Viçosa, MG, Brasil (20°45'S e 42°52'W) foram transferidas para o Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa e utilizadas para obtenção das larvas.

### Criação *in vitro* de operárias de *A. mellifera*

A avaliação de toxicidade de Cry1Ac em *A. mellifera* foi conduzida em condições controladas, no Laboratório de Patologia Apícola da Universidade Federal de Viçosa. Todo material utilizado para montagem dos experimentos, coleta das larvas, preparo e acondicionamento da dieta, foi autoclavado ou esterilizado com luz ultravioleta germicida em capela de segurança biológica.

Para a criação das larvas, foram utilizadas cúpulas de polietileno (9,8mm de altura x 5,6 mm de largura inferior x 8,8 mm de largura superior), previamente montadas em placas de Petri, utilizando como base um disco de E.V.A. perfurado (Figura 1A). Em cada placa foram colocadas 40 cúpulas, identificadas individualmente. Imediatamente antes da transferência das larvas, as cúpulas foram preenchidas, com o auxílio de uma micropipeta de repetição, com 4µl de dieta artificial conforme sugerido por Vandenberg & Shimanuki, 1987 modificada por Silva et al., 2005.

A dieta artificial era constituída por 49,0% de geléia real (produzida no Apiário da UFV), 36,3% de água, 6,8% de d-frutose, 6,8% de d-glicose e 1,1% de extrato de lêvedo (Rembold & Lackner, 1981 modificado por Silva et al., 2005). Os açúcares e o extrato de lêvedo foram dissolvidos na água e filtrados em membrana Millipore de 0,22µm. Essa solução era em seguida misturada à geléia real. A dieta foi homogeneizada e armazenada em frascos de vidro estéreis, envoltos por papel alumínio, à 5°C, por no máximo 6 dias após preparo. Antes da alimentação das larvas, a dieta era aquecida em banho-maria a 34°C por aproximadamente 5 minutos.

Favos de cria contendo larvas de operárias foram obtidos das colméias e transferidos para o laboratório. A metodologia utilizada para a criação das larvas foi proposta por Vandenberg & Shimanuki, 1987 e modificada por Silva et al. (2005). Larvas de 1º instar (com idade máxima de 24h) foram coletadas com o auxílio de um estilete de metal com extremidade dobrada em ângulo reto e colocadas sobre a dieta contida no interior das cúpulas.

Após a transferência, as larvas eram observadas com o auxílio de um estereomicroscópio, para verificar se todos os indivíduos utilizados nos bioensaios estavam vivos durante o início do experimento. As larvas que não apresentavam movimento dos espiráculos eram descartadas e tinham suas cúpulas substituídas por outras contendo indivíduos vivos.

As larvas foram alimentadas por 5 dias consecutivos, contados a partir do dia da transferência, com 4, 15, 25, 50 e 70µl de dieta em todos os tratamentos. A quantidade de alimento diária foi escolhida por ser a melhor quantidade de dieta para ser fornecida às larvas no 1º, 2º, 3º, 4º e 5º dia respectivamente (Silva et al., 2005).

As placas de Petri (contendo 40 larvas por repetição) foram colocadas em frascos dessecadores mantidos em estufa do tipo B.O.D. a  $34 \pm 1^\circ\text{C}$ , 99% de umidade relativa e em escotofase de 24 horas até o término do período de alimentação. Após o término da ingestão da dieta, as placas foram retiradas dos frascos e mantidas na mesma estufa a  $34 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $70 \pm 10\%$  de umidade até a emergência dos adultos. A posição dos frascos dessecadores no interior da incubadora era escolhida por sorteio, para evitar que uma provável variação de temperatura no interior da estufa interferisse nos resultados dos experimentos.

### **Bioensaios com operárias de *A. mellifera***

A metodologia descrita acima foi utilizada nos bioensaios para testes de toxicidade da proteína Cry1Ac. Cada repetição continha 40 larvas individualizadas nas cúpulas de polipropileno, que foram submetidas a três tratamentos. Os experimentos foram repetidos 5 vezes, sendo que

cada repetição continha larvas provenientes de uma colônia diferente. Os bioensaios foram montados entre os dias 14/11/06 e 16/01/07.

A proteína Cry1Ac utilizada nos testes de toxicidade com *A. mellifera* foi produzida no Departamento de Bioquímica da Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, Estados Unidos. A toxina purificada foi armazenada na forma liofilizada, à temperatura de -15°C. Imediatamente antes da realização dos experimentos, a toxina era dissolvida em água e esta solução era misturada à dieta das abelhas, para a realização dos bioensaios.

As larvas de operárias de *A. mellifera* foram submetidas aos seguintes tratamentos:

**Tratamento 1:** 164µl de dieta artificial para *A. mellifera* (Rembold & Lackner, 1981 modificado por Silva et al., 2005) fornecida progressivamente + 50µg de proteína Cry1Ac diluída em água destilada e autoclavada, quantidade de Cry1Ac tóxica às espécies-alvo (Wright et al., 1997; Cerda et al., 2003);

**Tratamento 2:** 164µl de dieta artificial para *A. mellifera* fornecida progressivamente + água destilada e autoclavada (mesmo volume utilizado para adicionar Cry1AC ao alimento no tratamento 1);

**Tratamento 3:** 164µl de dieta artificial para *A. mellifera* fornecida pura e progressivamente (tratamento controle).

As abelhas foram mantidas em estufa até a emergência dos adultos e observadas diariamente, para se avaliar a mortalidade e o tempo de desenvolvimento, em dias, em cada estágio (larva e pupa). As abelhas adultas foram coletadas logo após a emergência (prazo máximo de 24 horas) e anestesiadas a frio. Cada indivíduo teve a massa corporal avaliada utilizando-se uma balança de precisão.

As abelhas recém-emergidas foram fixadas em solução de metanol-ácido-acético (3:1), durante 24 horas, e mantidas em álcool a 70%. Posteriormente, foram tomadas medidas morfométricas de cada indivíduo, com o auxílio de uma ocular micrométrica acoplada a um microscópio estereoscópico. Os caracteres morfológicos analisados

foram: largura da cabeça (distância máxima entre as margens laterais externas dos olhos compostos) e distância intertegular (distância mínima entre as margens das tégulas) (Bosch & Vicens, 2002). As medidas foram posteriormente convertidas para milímetros.

### **Análises estatísticas**

O número de abelhas mortas em cada Placa de Petri foi registrado diariamente, ao longo de todo o ciclo de desenvolvimento e esses indivíduos foram removidos. A proporção de indivíduos mortos e o tempo de desenvolvimento nas fases de larva e pupa foram comparados por ANOVA, após a realização de testes para verificar os pré-requisitos de normalidade e homogeneidade de variância. A transformação dos dados não foi necessária.

A mortalidade e o tempo de desenvolvimento dos imaturos e a massa corporal, largura da cápsula cefálica e distância intertegular das operárias recém-emergidas foram comparados entre os diferentes tratamentos para avaliar os efeitos da ingestão de Cry1Ac sobre as abelhas. Os dados foram inicialmente submetidos à análise de correlação de Pearson, utilizando o procedimento PROC CORR (SAS Institute, 2001). Os resultados indicaram correlações significativas entre alguns parâmetros. Como a análise multivariada (MANOVA) é recomendada quando duas ou mais variáveis são tomadas para cada indivíduo e há correlações entre elas (Zar, 1999), posteriormente os dados foram analisados utilizando o método multivariado (SAS Institute, 2001). A transformação dos dados não foi necessária.

## Resultados

### **Criação *in vitro* de operárias de *A. mellifera***

A metodologia para criação de larvas de *A. mellifera* proposta por Rembold & Lackner (1981) e modificada por Silva et al. (2005), assim como o fornecimento de dieta às larvas nas proporções sugeridas por Silva et al. (2005) foram adequados para a análise de risco da toxina Cry1Ac sobre *A. mellifera*, pois 76,5% das larvas do controle sobreviveram até o final do desenvolvimento larval (Figuras 1A e B). No estágio de pupa a mortalidade aumentou consideravelmente em todos os tratamentos (Tabela I) e foram observadas algumas pupas mal-formadas que não emergiram. Entretanto não houve efeito dos tratamentos sobre a mortalidade pupal (ANOVA,  $F=0,201$ ; g.l.=2,12;  $p=0,821$ , Tabela I).

### **Bioensaios com operárias de *A. mellifera***

No tratamento com água a sobrevivência das larvas foi de 72,5% e 70% dos indivíduos que se alimentaram de Cry1Ac diluída em água atingiram o estágio de pupa (Tabela I). A mortalidade das larvas não diferiu significativamente entre os tratamentos (ANOVA,  $F=0,4665$ ; g.l.=2,12;  $p=0,6381$ , Tabela I).

A mortalidade de *A. mellifera* ao longo de todo o desenvolvimento também não foi alterada devido à ingestão de Cry1Ac durante a fase larval, pois não houve diferenças significativas entre os três tratamentos (ANOVA,  $F=0,321$ , g.l.=2,12,  $p=0,7316$ , Tabela I).

A alimentação com dieta diluída em água ou misturada à solução de Cry1Ac também não modificou o tempo de desenvolvimento das larvas (ANOVA,  $F=1,038$ , g.l.=2,12,  $p=0,383$ , Tabela II) ou das pupas (ANOVA,  $F=0,0878$ , g.l.=2,12,  $p=0,9165$ , Tabela II) em relação ao controle, indicando que as ingestões de água e de toxina não interferem no tempo necessário para as abelhas completarem o desenvolvimento. As fases de desenvolvimento podem ser observadas na Figura 1.

A correlação de Pearson demonstrou que massa corporal, largura da cápsula cefálica e distância intertegular foram correlacionados

significativamente (Tabela III). As medidas morfométricas também foram correlacionadas (Tabela III). A mortalidade apresentou correlações negativas com a massa corporal, com a distância intertegular e com a largura da cápsula cefálica (Tabela III). A MANOVA não indicou diferenças significativas entre os tratamentos (Wilks lambda=0,407; F=0,91; g.l.=10,16; p=0,5483), comprovando que não há efeito da ingestão de Cry1Ac sobre os parâmetros avaliados.

## Discussão

Os resultados dos bioensaios com operárias de *A. mellifera* demonstraram que larvas que ingerem a toxina Cry1Ac não apresentam diferentes índices de mortalidade em relação aos controles com dieta pura e dieta diluída, além da entomotoxina não alterar o tempo de desenvolvimento larval. Além disto, após a ingestão da proteína, operárias imaturas se transformaram em pupas e adultos com tempo de desenvolvimento e sobrevivência normais e com massa corporal e parâmetros morfométricos iguais aos das abelhas que se alimentaram de dieta pura ou diluída.

A metodologia utilizada para a criação das formas imaturas de operárias de *A. mellifera* em condições controladas (Rembold & Lackner, 1981 modificada por Silva et al., 2005) foi adequada para a concretização dos bioensaios que auxiliem a análise de risco de entomotoxinas sobre larvas da espécie. Apesar da mortalidade até a emergência dos adultos ter sido elevada, a emergência de abelhas normais no tratamento controle indica que esse protocolo pode ser utilizado para testes de toxicidade, principalmente durante o estágio larval. Entretanto, para que a análise de risco de plantas GM sobre a espécie seja otimizada, deve ser realizado o aprimoramento da criação *in vitro* de *A. mellifera* com o objetivo de aumentar a sobrevivência das abelhas no tratamento controle.

Diversos autores desenvolveram e testaram metodologias semelhantes à utilizada neste trabalho com os objetivos de pesquisar a determinação de castas (Rembold, 1987; Silva et al., 2005), os efeitos de patógenos sobre a cria (Michael & Abramovitz, 1955; Brodsgaard et al., 1998; Mckee et al., 2004), o desenvolvimento de dietas artificiais (Shuel & Dixon, 1986; Vandenberg & Shimanuki, 1987), a criação de protocolos para testes de toxicidade de inseticidas (Aupinel et al., 2005) e avaliar os efeitos de produtos com potencial para utilização em plantas GM resistentes a insetos (Malonet et al., 2002; Brodsgaard et al., 2003).

A criação de larvas de *A. mellifera in vitro* geralmente resulta em altos índices de mortalidade, mesmo quando a alimentação é feita com

dieta sem aditivos. Vandenberg & Shimanuki (1987) relataram uma sobrevivência de 57% das larvas criadas em cúpulas de polietileno mas, quando a prole foi mantida em células artificiais de cera, 92% das larvas sobreviveram. Malone et al. (2002), ao testarem produtos com potencial para utilização em plantas resistentes a insetos, obtiveram uma mortalidade de 75% das larvas criadas *in vitro* e de 48,4% dos adultos do tratamento controle, resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo. Elevados índices de mortalidade em larvas da abelha melífera criadas em condições controladas podem ser atribuídos às injúrias mecânicas ou ao afogamento das mesmas na dieta (McKee et al., 2004). É provável que efeitos semelhantes tenham ocorrido durante o desenvolvimento deste trabalho, uma vez que não houve diferenças entre os tratamentos avaliados.

As correlações negativas entre mortalidade e massa corporal, mortalidade e distância intertegular e mortalidade e largura da cápsula cefálica indicam que, nas repetições onde o índice de mortalidade foi maior, as abelhas emergiram com menor massa e tamanho reduzido. As correlações entre massa corporal e medidas morfométricas demonstram que, em experimentos futuros, a avaliação desses três caracteres é dispensável para análise de risco de entomotoxinas. A utilização de apenas um desses parâmetros é suficiente para a verificação de efeitos de produtos sintetizados por plantas GM em abelhas. As avaliações de tamanho são importantes, pois abelhas maiores são forrageadoras mais eficientes (Pyke, 1978) e transportam cargas maiores de pólen e néctar (Klostermeyer et al., 1973).

Pesquisas anteriores com *A. mellifera* concluíram que toxinas Bt não prejudicam operárias adultas (Malone et al., 1999; Malone et al., 2001; Malone et al., 2004; Babendreier et al., 2005; Bailey et al., 2005; Liu et al., 2005; Ramirez-Romero et al., 2005; Babendreier et al., 2007; Rose et al., 2007) e formas imaturas (Arpaia et al., 1996; Hanley et al., 2003). Porém a toxina Cry1Ac só havia sido testada em operárias adultas da abelha melífera (Liu et al., 2005) ou em adultos e larvas de *Bombus occidentalis* e *Bombus impatiens* (Morandim & Winston, 2003). Nestes

trabalhos também não foram observados efeitos sobre as abelhas, resultados que estão de acordo com os obtidos no presente estudo.

Os estudos que avaliaram os efeitos de toxinas Bt em larvas mantidas em colméias de abelhas melíferas não foram apropriados para testar alterações da mortalidade. Hanley et al. (2003) alimentaram as larvas artificialmente com pólen de milho Bt na própria colônia, o que pode ter interferido no comportamento das abelhas adultas e conseqüentemente no desenvolvimento dos imaturos. Arpaia (1996) forneceu às colméias a toxina Cry3B dissolvida em solução de açúcar e verificou a mortalidade das larvas nos favos, porém operárias jovens podem ter retirado os indivíduos mortos dos ninhos devido ao comportamento higiênico (Gramacho & Spivak 2003).

Malone et al. (2002) e Brodsgaard et al. (2003) realizaram testes de entomotoxinas com larvas de *A. mellifera* criadas em condições semelhantes às do presente estudo. Malone et al. (2002) observaram que toxinas que inibem a absorção de vitaminas em insetos não aumentaram a mortalidade larval, mas efeitos sub-letais não foram avaliados. A ingestão do inibidor de protease SBTI aumentou a mortalidade da prole, retardou o desenvolvimento juvenil e diminuiu a massa corporal das abelhas recém-emergidas (Brodsgaard et al., 2003). Estes resultados demonstram que os parâmetros escolhidos, no presente estudo, para avaliação de efeitos de Cry1Ac sobre a prole da espécie foram adequados.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a mortalidade, o tempo de desenvolvimento, a massa corporal, a largura da cápsula cefálica e a distância intertegular de *A. mellifera* não são alterados pela ingestão da toxina Cry1Ac durante a fase larval. Porém, devem ser desenvolvidas metodologias para testes com larvas que originem rainhas e zangões. Grande parte dos estudos desenvolvidos com análise de risco de plantas GM sobre abelhas realizou apenas testes com operárias adultas. Não existem estudos sobre efeitos de produtos sintetizados por plantas geneticamente modificadas sobre rainhas e machos e a ausência de danos sobre as operárias não implica, necessariamente, na falta de

efeitos sobre as colméias. Portanto, análises de risco em abelhas de entomotoxinas sintetizadas por culturas transgênicas devem utilizar protocolos para testes com larvas de operárias – como os mencionados neste trabalho – e serem ampliados para incluir pesquisas com rainhas e machos.

## Referências bibliográficas

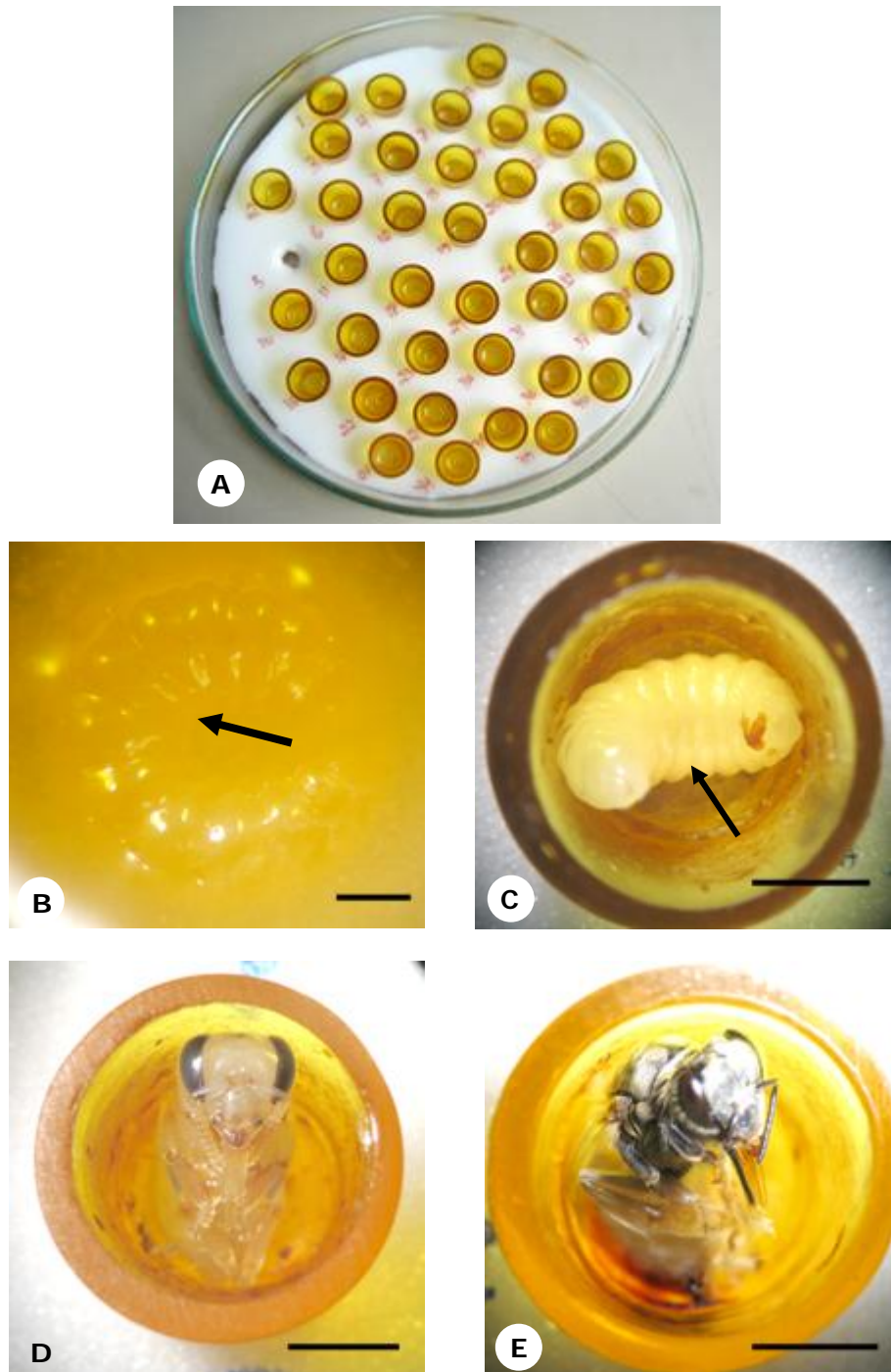
- Aase ALTO, Amdam GV, Hagen A, Omholt ST. A new method for rearing genetically manipulated honey bees workers. *Apidologie* 36, 293-299. 2005.
- Allen-Wardell G, Bernhardt P, Bitner R, Burquez A, Buchmann S, Cane J, Cox Pa, Dalton V, Feinsinger P, Ingram M, Inouye D, Jones CE, Kennedy K, Kevan P, Koopowitz H, Medellin R, Medellin-Morales S, Nabhna GP, Pavlik B, Tepedino V, Torchio P, Walker S. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conservation Biology* 12, 8-17. 1998.
- Arpaia S. Ecological impact of Bt-transgenic plants: 1. Assessing possible effects of CryIIIB toxin on honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Genetic and Breeding* 50, 315-319. 1996.
- Arpaia, S; Imperatriz-Fonseca, VL; Pires, CSS; Silveira, FS. Non-target and biodiversity impacts on pollinators and flower visiting insects. In: Hilbeck, A., Andow, D., Fontes, E. (eds). *Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms: Methodologies for Assessing Bt cotton in Brazil*. CABI Publishing, Cambridge, p.155-174. 2006.
- Aupinel P, Fortini D, Dufour H, Tasei JN, Michaud B, Odoux JF, Pham-Delègue M-H. Improvement of artificial feeding in a standard *in vitro* method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of Insectology* 58, 107-111. 2005.
- Babendreier D, Joller D, Romeis J, Bigler F, Widmer F. Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *Microbiological Ecology* 59, 610. 2007.
- Babendreier D, Kalberer N, Romeis J, Fluri P, Bigler F. Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. *Apidologie* 35, 293-300. 2004.

- Babendreier D, Kalberer NM, Romeis J, Fluri P, Mulligan E, Bigler F. Influence of Bt-transgenic pollen, Bt-toxin and protease inhibitor (SBTI) ingestion on development of the hypopharyngeal glands in honeybees. *Apidologie* 36, 585-594. 2005.
- Bailey J, Scott-Dupree C, Harris R, Tolman J, Harris B. Contact and oral toxicity to honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada. *Apidologie* 36, 623-633. 2005.
- Bosch J, Vicens N. Body size as an estimator of production costs in a solitary bee. *Ecological Entomology* 27, 129-137. 2002.
- Brodsgaard CJ, Ritter W, Hansen H. Progress of *Paenibacillus larvae larvae* infection in individually inoculated honey bee larvae reared singly *in vitro*, in micro colonies, or in full-size colonies. *Journal of Apicultural Research* 39, 19-27. 2000.
- Brodsgaard CJ, Ritter W, Hansen H. Response of *in vitro* reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae larvae* spores. *Apidologie* 29, 569-578. 1998.
- Brodsgaard HF, Brodsgaard CJ, Hansen H, Lövei GL. Environmental risk assessment of transgene products using honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *Apidologie* 34, 139-145. 2003.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan P-L, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, Vanengelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283-287. 2007.
- Dechaume-Moncharmond FX, Azzouz H, Pons O, Pham-Delègue MH. Soybean proteinase inhibitor and the foraging strategy of free flying honeybees. *Apidologie* 36, 421-430. 2005.
- Free JB. *Insect Pollination of crops*. Academic Press, Londres, 684p. 1993.

- Gramacho KP, Spivak M. Differences in olfactory sensitivity and behavioral responses among honey bees bred for hygienic behavior. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 54, 472-479. 2003.
- Greenplate JT. Response to reports of early damage in 1996 commercial Bt-transgenic cotton (Bollgard®) plantings. *Society of Invertebrate Pathology Newsletter* 29, 15-18. 1997.
- Klostermeyer EC, Mech SJ, Rasmussen WB. Sex and weight of *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae) progeny associated with provision weights. *Journal of the Kansas Entomological Society* 46, 536-548.
- Hanley AV, Huang ZY, Pett WL. Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. *Journal of Apicultural Research* 42, 77-81. 2003.
- Herbert EW, Shimanuki H. Mineral requirements for brood-rearing by honeybees fed a synthetic diet. *Journal of Apicultural Research* 17, 118-122. 1978.
- Hilbeck A, Schmitt JED. Another view on Bt proteins - How specific are they and what else might they do? *Biopesticides International* 2, 1-50. 2006.
- Liu B, Xu C, Yan F, Gonc R. The impacts of the pollen of insect-resistant transgenic cotton on honeybees. *Biodiversity and Conservation* 14, 3487-3496. 2005.
- Malone LA, Burgess EPJ, Gatehouse HS, Voisey CR, Tregidga EL, Philip BA. Effects of ingestion of a *Bacillus thuringiensis* toxin and a trypsin inhibitor on honey bee flight activity and longevity. *Apidologie* 32, 57-68. 2001.
- Malone LA, Burgess EPJ, Stefanovic D. Effects of a *Bacillus thuringiensis* toxin, two *Bacillus thuringiensis* biopesticide formulations, and a soybean trypsin inhibitor on honey bee (*Apis mellifera* L.) survival and food consumption. *Apidologie* 30, 465-473. 1999.

- Malone LA, Pham-Delègue M-H. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees. *Apidologie* 32, 287-304. 2001.
- Malone LA, Todd JH, Burgess EPJ, Christeller JT. Development of hypopharyngeal glands in adult honey bees fed with a Bt toxin, a biotin-binding protein and a protease inhibitor. *Apidologie* 35, 655-664. 2004.
- Malone LA, Tregidga EL, Todd JH, Burgess EPJ, Philip BA, Markwick NP, Poulton J, Christeller JT, Lester MT, Gatehouse HS. Effects of ingestion of a biotin-binding protein on adult and larval honey bees. *Apidologie* 33, 447-458. 2002.
- McGregor, SE. Insect pollination of cultivated crop plants. Agriculture Research Service - USDA, Washington D.C., 411 p. 1976.
- McKee BA, Goodman RD, Hornitzky MA. The transmission of European foulbrood (*Melissococcus plutonius*) to artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* 43, 93-100. 2004.
- Michael AS, Abramovitz M. A method for rearing honeybee larvae in vitro. *Journal of Economic Entomology* 48, 43-44. 1955.
- Morandin LA, Winston M. Effects of novel pesticides on bumble bee (Hymenoptera: Apidae) colony health and foraging ability. *Environmental Entomology* 32, 555-563. 2003.
- Oldroyd BP. What's killing american honey bees? *PLoS Biology* 5, 1195-1199. 2007.
- Phillips SA, Simpson JL. Hybrid cotton pollination in relation to accumulated degree days. *Agronomy Journal* 81, 975-980. 1989.
- Pyke GH. Optimal body size in bumblebees. *Oecologia* 34, 255-266. 1978.
- Ramirez-Romero R, Chaufaux J, Pham-Delègue M-H. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie* 36, 601-611. 2005.

- Rembold, H & Lackner, B Rearing of honeybee larvae in vitro: effect of yeast extract on queen differentiation. *Journal of Apicultural Research* 20, 165-171. 1981.
- Rembold, H. Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry* 17, 1003-1006. 1987.
- Rhodes J. Cotton pollination by honeybees. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 42, 513-518. 2002.
- Rose R, Dively GP, Pettis J. Effects of Bt corn pollen on honey bees: emphasis on protocol development. *Apidologie* 38, 1-11. 2007.
- SAS Institute, 2001. User's Guide: Statistics, Version 8.2, 6th Edition. SAS Institute, Cary, NC.
- Shuel RW, Dixon SE. An artificial diet for laboratory rearing of honeybees. *Journal of Apicultural Research* 25, 35-43. 1986.
- Silva IC, Message D, Damião Cruz C, Silva MVGB. Aplicação de análises multivariadas para determinação de casta de abelhas *Apis mellifera* L. (africanizadas), obtidas em laboratório. *Revista Brasileira de Zootecnia* 34, 635-640. 2005.
- Stockstad, E. The case of empty hives. *Science* 316, 970-972. 2007.
- Tanda AS. Bee pollination increases yield of 2 interplanted varieties of Asiatic cotton (*Gossypium arboreum* L.). *American Bee Journal* 124, 539-540. 1984.
- van der Steen JJM. Review of the methods to determine the hazard and toxicity of pesticides to bumblebees. *Apidologie* 32, 399-406. 2001.
- Vandenberg, JD & Shimanuki H. Isolation and characterization of *Bacillus coagulans* associated with half-moon disorder of honey bees. *Apidologie* 21, 233-241. 1990.
- Waller GD, Moffet JO, Loper GM, Martin JH. An evaluation of honey bee foraging activity and pollination efficacy for male-sterile cotton. *Crop Science* 25, 211-214. 1985.



**Figura 1** – Bioensaios com *Apis mellifera*. Figura 1A: Placa de Petri com cúpulas utilizadas para criação das operárias imaturas; Figura 1B: Larva (seta) com quatro dias de idade sobre dieta artificial; Figura 1C: Larva (seta) após o término da ingestão do alimento; Figura 1D: Pupa; Figura 1E: Abelha adulta (17 dias) emergindo. Barras: B = 1 mm; C-E = 3 mm.

**Tabela I** – Mortalidade média (%)  $\pm$  erro padrão de operárias de *A. mellifera* alimentadas com dieta artificial pura, diluída em água e misturada à solução de água e proteína Cry1Ac do *Bacillus thuringiensis*, ao longo das fases de desenvolvimento.

<b>Fases do desenvolvimento</b>	<b>Alimento puro (controle)</b>	<b>Alimento + água</b>	<b>Alimento + água + Cry1Ac</b>
Larva <sup>1</sup>	23,5 $\pm$ 5,73 a	27,5 $\pm$ 3,62 a	30 $\pm$ 4,81 a
Pupa <sup>2</sup>	19,5 $\pm$ 7,68 a	25,5 $\pm$ 6,86 a	19,5 $\pm$ 8,57 a
Total <sup>3</sup>	43 $\pm$ 13,21 a	53 $\pm$ 5,15 a	49,5 $\pm$ 6,29 a

Letras iguais indicam que não há diferenças significativas entre os resultados das linhas.

<sup>1</sup> ANOVA; F=0,467; g.l. 2,12; p=0,638

<sup>2</sup> ANOVA; F=0,201; g.l. 2,12; p=0,821

<sup>3</sup> ANOVA; F=0,321; g.l. 2,12; p=0,731

**Tabela II.** Período médio de desenvolvimento, em dias, de larvas e pupas de operárias de *A. mellifera* alimentadas com dieta artificial pura, diluída em água e misturada à solução de água e proteína Cry1Ac, ao longo das fases de desenvolvimento.

<b>Fases do desenvolvimento</b>	<b>Alimento puro (controle)</b>	<b>Alimento + água</b>	<b>Alimento + água + Cry1Ac</b>
Período larval <sup>1</sup>	9,11 ± 0,17 a	8,9 ± 0,11 a	9 ± 0,06 a
Período pupal <sup>2</sup>	7,8 ± 0,19 a	7,83 ± 0,09 a	7,89 ± 0,16 a
Período total <sup>3</sup>	16,91 ± 0,11 a	16,73 ± 0,09 a	16,9 ± 0,14 a

Letras iguais indicam que não há diferenças significativas entre os resultados das linhas

1- ANOVA; F=1,038; p=0,384; g.l.=2,12

2- ANOVA; F=0,088; p=0,917; g.l.=2,12

3- ANOVA; F=0,737; p=0,499; g.l.=2,12

**Tabela III-** Correlações de Pearson (r) entre as variáveis estudadas para avaliar efeitos da ingestão de Cry1Ac sobre operárias imaturas de *A. mellifera*.

Variável 1	Variável 2	r	p
Mortalidade	Tempo de desenvolvimento	-0,1059	0,7072 <sup>ns</sup>
Mortalidade	Massa corporal	-0,6955	0,004*
Mortalidade	Distância intertegular	-0,6788	0,0054*
Mortalidade	Largura da cápsula cefálica	-0,8055	0,0003*
Tempo de desenvolvimento	Massa corporal	-0,2388	0,3913 <sup>ns</sup>
Tempo de desenvolvimento	Distância intertegular	-0,1013	0,7195 <sup>ns</sup>
Tempo de desenvolvimento	Largura da cápsula cefálica	-0,1695	0,5458 <sup>ns</sup>
Massa corporal	Distância intertegular	0,6134	0,014**
Massa corporal	Largura da cápsula cefálica	0,6944	0,0041*
Distância intertegular	Largura da cápsula cefálica	0,9152	<0,0001*

\* Significativo a 0,01% de probabilidade

\*\* Significativo a 0,05% de probabilidade

## *Conclusões gerais*

## Conclusões gerais

- O protocolo desenvolvido para avaliar os efeitos de Cry1Ac sobre *T. spinipes* mostrou-se adequado para realização de análise de risco de entomotoxinas sobre a espécie, podendo ser utilizado para ensaios com outras substâncias e adaptado para criação de outros meliponíneos.
- A metodologia de criação das larvas de *A. mellifera* deve ser aprimorada devido à ocorrência de alta mortalidade dos imaturos. Entretanto este resultado não inviabilizou a análise de risco de Cry1Ac sobre essa espécie;
- Estudos prévios sobre o alimento larval das espécies são importantes para validar os bioensaios;
- O alimento larval de *T. spinipes* não inativa a toxina Cry1Ac em condições de laboratório;
- Não foram encontrados efeitos da toxina Cry1Ac sobre a mortalidade, tempo de desenvolvimento, massa corporal, largura da cápsula cefálica e distância intertegular de *T. spinipes* e *A. mellifera* que foram alimentadas com essa toxina na fase larval.