

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**INFLUÊNCIA DO PÓLEN DE MILHO BT E NÃO BT
SOBRE O CONSUMO, MASSA ADQUIRIDA E
SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS E ADULTOS DE *Apis
mellifera* L.**

GABRIELLE DE LIMA MASSON

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2016**

**INFLUÊNCIA DO PÓLEN DE MILHO BT E NÃO BT
SOBRE O CONSUMO, MASSA ADQUIRIDA E
SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS E ADULTOS DE *Apis
mellifera* L.**

GABRIELLE DE LIMA MASSON
Engenheira Agrônoma

Orientador: PROF. DR. MARCOS GINO FERNANDES

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Dourados
Mato Grosso do Sul
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M421i Masson, Gabrielle de Lima

Influência do pólen de milho Bt e não Bt sobre o consumo, massa adquirida e sobrevivência de larvas e adultos de *Aphis mellifera* / Gabrielle de Lima

Masson -- Dourados: UFGD, 2016.

57f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Marcos Gino Fernandes

Co-orientador: Valter Vieira

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Abelhas. 2. Polinizadores. 3. Zea Mays. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

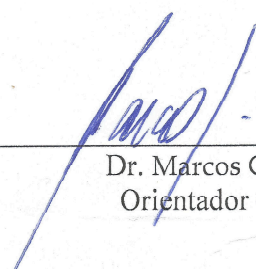
INFLUÊNCIA DO PÓLEN DE MILHO BT E NÃO BT SOBRE O CONSUMO, MASSA
ADQUIRIDA E SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS E ADULTOS DE *Apis mellifera* L.

por

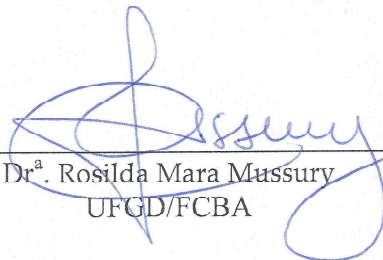
GABRIELLE DE LIMA MASSON

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE EM AGRONOMIA

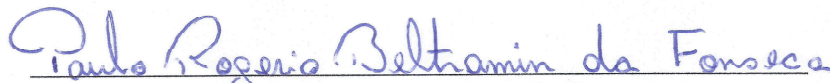
Aprovada em: 23/03/2016



Dr. Marcos Gino Fernandes
Orientador – UFGD/FCA



Dr.^a Rosilda Mara Mussury
UFGD/FCBA



Dr. Paulo Rogério Beltramin da Fonseca
UFAM

A Deus, por abençoar meu caminho e sempre me dar forças para seguir em frente.

DEDICO.

Aos meus avós, Grinauria Gomes de Lima (*in memoriam*) e Valdomiro Alexandre de Lima, e aos meus pais, Luiz Antônio Masson e Cleunice A. de Lima Masson, que muitas vezes abdicaram de seus sonhos para possibilitar a realização dos meus, além de todo amor, apoio e exemplo de vida.

OFEREÇO.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Nada na vida conquistamos sozinhos. Desta forma, eu não poderia deixar de expressar o meu sincero agradecimento a todos aqueles que me apoiaram durante esta longa caminhada, contribuindo para a realização deste sonho.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudo.

À Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de realização do meu curso de pós-graduação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Gino Fernandes, que me ensinou a jamais ter medo na vida, assim como ter paciência e motivação em tudo que fizemos. Além da amizade, orientação, atenção despendida, conhecimentos compartilhados e estímulo para continuar na pesquisa.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Valter Vieira, por toda a atenção, dedicação e orientação durante esses anos, que contribuíram para todo o aprendizado.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Entomologia, que compartilharam comigo cada etapa do trabalho e fizeram companhia, tornando as atividades ainda mais prazerosas. Em especial, Alyne Ciriaco, Núbio Moreira, Rose Trindade e Maria Freire.

Ao Luis Carlos Rossini pela sua disposição e enorme ajuda em campo, sendo fundamental para que déssemos início a este trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, e também em Entomologia, que compartilharam seus conhecimentos e sabedoria, contribuindo para minha formação profissional.

Aos integrantes da banca examinadora da qualificação, pelos comentários e sugestões apresentadas com o objetivo de valorizar o trabalho.

Aos colegas de curso e amigos queridos, que de uma forma ou de outra contribuíram com suas forças e estímulos para que eu alcançasse meus objetivos.

Aos meus pais, Luiz Antônio e Cleunice, minha irmã Izabelle, meu namorado Bruno, meu avô Valdomiro, meus sogros e cunhados, por toda a dedicação e motivação nas horas de fraqueza, vocês foram essenciais para que eu conseguisse chegar até aqui.

Enfim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, me auxiliaram em algum momento, pois mesmo que a ajuda tenha parecido pequena, com certeza foi bastante valiosa.

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO GERAL	x
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	03
CAPÍTULO I - O PÓLEN DE MILHO BT E NÃO BT TEM ALGUM EFEITO SOBRE O DESENVOLVIMENTO LARVAL DE <i>Apis mellifera</i> L.?	06
RESUMO	07
INTRODUÇÃO	08
MATERIAL E MÉTODOS	10
RESULTADOS	14
DISCUSSÃO	18
CONCLUSÕES	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
CAPÍTULO II - O PÓLEN DE MILHO BT E NÃO BT TEM ALGUM EFEITO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE ADULTOS DE <i>Apis mellifera</i> L.?	25
RESUMO	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	29
RESULTADOS	33
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
CAPÍTULO I - O PÓLEN DE MILHO BT E NÃO BT TEM ALGUM EFEITO SOBRE O DESENVOLVIMENTO LARVAL DE <i>Apis mellifera</i> L.?	06
FIGURA 1. Obtenção das larvas (A) e acomodação em cúpulas de cera (B)	11
FIGURA 2. Diferentes colorações de larvas (normal e necrótica) após alimentação	12
FIGURA 3. Massa adquirida por larva de abelha (<i>Apis mellifera</i>) após alimentação durante cinco dias com mel e diferentes dosagens de pólen de milho Bt e não Bt	14
FIGURA 4. Massa diária adquirida por larvas de abelha (<i>Apis mellifera</i>) após alimentação durante cinco dias com mel e diferentes dosagens de pólen de milho Bt e não Bt	15
FIGURA 5. Massa adquirida por larvas de abelha (<i>Apis mellifera</i>) após alimentação com diferentes doses de pólen [0, 20, 40 e 80 mg de pólen de milho da cultivar BALU 188 (A) e BALU 280 PRO (B)] dissolvido em solução de mel a 10% de água durante 5 dias	16
FIGURA 6. Mortalidade corrigida (Abbott) de larvas de abelha (<i>Apis mellifera</i>) em diferentes dias após alimentação com mel e diferentes dosagens de pólen de milho Bt e não Bt	16
FIGURA 7. Sobrevivência diária (%) ao longo de cinco dias de larvas de abelha (<i>Apis mellifera</i>) durante o experimento de alimentação com mel e diferentes dosagens de pólen de milho Bt e não Bt	17
FIGURA 8. Mortalidade final (%) de larvas de abelha (<i>Apis mellifera</i>) após alimentação durante cinco dias com mel e diferentes dosagens de pólen de milho Bt e não Bt	18
 CAPÍTULO II - O PÓLEN DE MILHO BT E NÃO BT TEM ALGUM EFEITO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE ADULTOS DE <i>Apis mellifera</i> L.?	 25
FIGURA 1. Obtenção dos adultos com auxílio de sugador (A) e acomodação em recipientes plásticos preparados com as dietas (B)	30
FIGURA 2. Massa consumida por adultos de abelha (<i>Apis mellifera</i>) após	

alimentação com diferentes dietas compostas por mel e dosagens de pólen de milho Bt e não Bt durante 14 dias	
FIGURA 3. Massa consumida por adultos de abelha (<i>Apis mellifera</i>) após alimentação com diferentes dietas compostas por pasta candi e dosagens de pólen de milho Bt e não Bt durante 14 dias	33
FIGURA 4. Massa consumida por adultos de abelha (<i>Apis mellifera</i>) após alimentação com diferentes dietas e dosagens de pólen de milho Bt e não Bt ...	34
FIGURA 5. Massa de dieta consumida (MDC) por adultos de abelha (<i>Apis mellifera</i>) após alimentação com diferentes doses de pólen [0, 20, 40 e 80 mg de pólen de milho da cultivar BALU 188 (A) e BALU 280 PRO (B)] em solução de mel a 10% de água durante 14 dias	35
FIGURA 6. Massa de dieta consumida (MDC) por adultos de abelha (<i>Apis mellifera</i>) após alimentação com diferentes doses de pólen [0, 20, 40 e 80 mg de pólen de milho da cultivar BALU 188 (A) e BALU 280 PRO (B)] em pasta candi durante 14 dias	35
FIGURA 7. Mortalidade corrigida (%) de adultos de abelha (<i>Apis mellifera</i>) após alimentação com diferentes dietas compostas por mel e dosagens de pólen de milho Bt e não Bt durante 14 dias	36
FIGURA 8. Mortalidade corrigida (%) de adultos de abelha (<i>Apis mellifera</i>) após alimentação com diferentes dietas compostas por pasta candi e dosagens de pólen de milho Bt e não Bt durante 14 dias	38
	39

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
CAPÍTULO II - O PÓLEN DE MILHO BT E NÃO BT TEM ALGUM EFEITO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE ADULTOS DE <i>Apis mellifera</i> L.?	25
TABELA 1. Mortalidade acumulada (%) de adultos de <i>Apis mellifera</i> após alimentação com diferentes dietas (mel e pasta candi) e dosagens de pólen de milho Bt e não Bt	37

INFLUÊNCIA DO PÓLEN DE MILHO BT E NÃO BT SOBRE O CONSUMO, MASSA ADQUIRIDA E SOBREVIVÊNCIA DE LARVAS E ADULTOS DE *Apis mellifera* L.

RESUMO: Os benefícios oferecidos pelas plantas Bt são inúmeros, como por exemplo serem menos impactantes ao meio ambiente do que os agroquímicos. Existe, porém, a preocupação com os possíveis efeitos nocivos a insetos não alvos, como a possibilidade de suas toxinas serem transmitidas pelo pólen e afetarem o desenvolvimento de *Apis mellifera* L. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do pólen de milho Bt, comparativamente com o pólen não Bt, sobre o desenvolvimento de larvas e adultos desses polinizadores. O trabalho foi realizado a partir da semeadura de duas cultivares de milho [BALU 188 RR (não Bt) e BALU 280 PRO (Bt, com toxinas Cry1A.105 e Cry2Ab2)] no ano agrícola de 2015. O pólen das plantas foi coletado durante o florescimento pleno. As abelhas (larvas e adultos) foram coletadas a partir de uma colmeia exposta próxima à lavoura de milho. Foram realizados dois bioensaios, sendo um com larvas (bioensaio 1) e outro com adultos (bioensaio 2). A manutenção das larvas em laboratório foi realizada em cúpulas de cera de abelhas feitas à mão. Já os adultos foram mantidos em recipientes de plástico, também em laboratório. Os insetos (larvas e adultos) foram mantidos em temperatura climatizada de $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ e UR de $70\pm 10\%$, pois essas condições estão próximas às encontradas no interior da colmeia. No bioensaio 1 foram oferecidas sete dietas (tratamentos): mel puro; dieta com 20, 40 e 80 mg de pólen de milho da cultivar BALU 188 dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água; e dieta com 20, 40 e 80 mg de pólen de milho da cultivar BALU 280 PRO dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água. No bioensaio 2 foram oferecidos os mesmos tratamentos com solução de mel e, além disso, também com pasta candi: pasta candi pura; dieta com 20, 40 e 80 mg de pólen de milho da cultivar BALU 188 dissolvido em 1 g de pasta candi; e dieta com 20, 40 e 80 mg de pólen de milho da cultivar BALU 280 PRO dissolvido em 1 g de pasta candi. A massa adquirida, a mortalidade e a sobrevivência das larvas, assim como a massa de dieta consumida e a mortalidade dos adultos, foram avaliadas diariamente durante o experimento. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com sete tratamentos e dez repetições para as larvas e quatorze tratamentos e dez repetições para os adultos. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de médias. As dosagens de pólen foram submetidas à análise de regressão. Os dados obtidos, após serem submetidos à análise estatística, permitiram concluir que a massa adquirida pelas larvas foi influenciada pela procedência do pólen (Bt e não Bt) e, para o caso do Bt, também pela dose utilizada na dieta. As larvas alimentadas com as dietas compostas por pólen Bt, exceto a de menor concentração, apresentaram menor massa adquirida que as dietas compostas por pólen não Bt. As doses de pólen Bt afetaram negativamente a aquisição de massa, segundo modelo de regressão ajustado. Já a mortalidade de larvas pode ser influenciada pela quantidade de pólen na dieta, pois quanto maior a dose utilizada maior a porcentagem obtida, independente da cultivar (Bt e não Bt). As médias das massas de dietas consumidas pelas abelhas adultas, para as compostas por mel e pasta candi, apresentaram diferença estatística significativa de acordo com a quantidade e a qualidade (Bt e não Bt) do pólen. Os adultos se alimentam mais de dietas compostas por solução de mel, quando comparado com pasta candi. Os resultados das análises de regressões nas dosagens de pólen sobre os parâmetros analisados somente foram significativos para a pasta candi com pólen não Bt, indicando efeito quadrático positivo das dosagens de

pólen sobre a massa consumida. A mortalidade é mais elevada e precoce quando acontece o consumo de elevadas doses de pólen de milho, sendo os efeitos mais evidentes e severos naqueles que apresentam a tecnologia Bt. De acordo com os resultados obtidos, nota-se que o pólen Bt quando em alta concentração na dieta, afeta a massa de larvas e a mortalidade de adultos de *A. mellifera*.

Palavras-chave: abelhas, polinizadores, *Zea mays*.

INFLUENCE OF THE CORN BT AND NOT POLLEN ON CONSUMPTION, MASS ACQUIRED AND SURVIVAL OF LARVAE AND ADULTS *Apis mellifera* L.

ABSTRACT: The benefits offered by Bt plants are numerous, such as being less impactful to the environment than agrochemicals. There is, however, concern about the possible harmful effects on non-target insects such as the possibility of their toxins being transmitted by pollen and affect the development of *Apis mellifera*. Thus, this study aimed to evaluate the effects of Bt corn pollen, compared to non-Bt pollen on the development of larvae and adults of these pollinators. The work was carried out from the sowing two varieties of corn [BALU 188 RR (non-Bt) and BALU 280 PRO (Bt toxins with Cry1A.105 and Cry2Ab2)] in the agricultural year 2015. The plant pollen was collected during the full bloom. The bees (larvae and adults) were collected from a nearby hive exposed to the maize crop. Two bioassays were performed with larvae (test 1) and adults (test 2). The maintenance of the larvae in the laboratory was held on bees handmade wax domes. The adults were kept in suitable plastic containers, also in the laboratory. Insects (larvae and adults) were maintained in a temperature of $32 \pm 2^\circ\text{C}$ and RH $70 \pm 10\%$, due this conditions are the nearest found in the inside of the hive. In test 1 were offered seven diets (treatments): pure honey; diet with 20, 40 and 80 mg of maize pollen variety of BALU 188 dissolved in 1 ml of honey solution of 10% water; and diet of 20, 40 and 80 mg of maize pollen variety of BALU 280 PRO dissolved in 1 ml of honey 10% solution in water. In trial 2 the same treatments were offered with honey solution and, in addition, also candy paste: paste pure candy; diet with 20, 40 and 80 mg of BALU range of 188 maize pollen dissolved in 1 g of candy slurry; and diet of 20, 40 and 80 mg of maize pollen variety of BALU 280 PRO dissolved in 1 g of paste candy. The acquired mass, mortality and survival of the larvae, as well as the mass consumed diet and mortality of the adults were assessed daily during the experiment. The experimental design was completely randomized, with seven treatments and ten repetitions for the larvae and fourteen treatments and ten repetitions for adults. The data were submitted to analysis of variance and mean test. Pollen levels were subjected to regression analysis. The data, after being subjected to statistical analysis, concluded that the mass gained by larvae was influenced by the origin of the pollen (Bt and non-Bt) and, in the case of Bt, also the dose used in the diet. Larvae fed diets consisting of Bt pollen, except the lowest concentration showed less weight gained that diets composed of non-Bt pollen. Bt pollen doses adversely affected the mass acquisition, according to adjusted regression model. Since the mortality of larvae can be influenced by the amount of pollen in the diet because the higher the dose the higher the percentage obtained used, regardless of the variety (Bt and non-Bt). The mean mass diets consumed by adult bees for the honey and composed of candy binder, were statistically significant according to the quantity and quality (Bt and non-Bt) pollen. The adults feed over diets comprised of honey solution, compared with candy folder. The results of the regressions from pollen doses on the analyzed parameters were only significant analysis to the candi folder with non-Bt pollen, where there was positive quadratic effect of pollen dosages on the mass consumed. The mortality is higher and, furthermore, early, when it happens consumption of high doses of maize pollen, the most evident and severe effects in those with Bt technology. According to the results, it is noted that Bt pollen when in high concentration in the diet affects some characteristics of adults and larvae of *Apis mellifera*.

Keywords: bees, pollinators, *Zea mays*.

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas provenientes da engenharia genética, também conhecidas como transgênicas ou organismos geneticamente modificados (OGM's), apresentam uma nova combinação de material genético obtida através de técnicas provenientes da biotecnologia moderna (ANDRADE et al., 2012). Esses procedimentos, nos últimos anos, vem gerando um grande número de genes passíveis de serem utilizados nos processos de modificação genética do milho e, assim, progressos expressivos estão sendo alcançados. Portanto, a transformação genética no milho tornou-se, atualmente, um procedimento de rotina para inúmeros genótipos desta cultura na maioria dos laboratórios. Essas plantas, especificamente as quais expressam genes com atividade inseticida, podem ser consideradas como uma ferramenta a mais para o manejo de insetos-praga, com eficácia semelhante ou até mesmo superior aos inseticidas convencionais (CARNEIRO et al., 2009).

Visto que a cultura do milho é hospedeira de um enorme complexo de lepidópteros pragas que desfolham as plantas ou, até mesmo, destroem suas partes reprodutivas, como as espigas, afetando consideravelmente a sua produtividade (MENDES et al., 2011), os OGM's que apresentam toxinas obtidas a partir da bactéria inseticida *Bacillus thuringiensis* Berliner 1911 (Bt), também chamados de plantas Bt, se tornam uma importante alternativa no controle de espécies que são consideradas pragas-chave. Esse efeito entomopatogênico é ocasionado a partir da produção de cristais proteicos, os quais são gerados durante a esporulação do *B. thuringiensis*. Estes cristais são constituídos principalmente pelas chamadas proteínas Cry e apresentam atividade inseticida para várias espécies, destacando-se as ordens dos lepidópteros, dípteros e coleópteros. As proteínas Cry são sintetizadas na forma de protoxinas e a sua ação depende de processos de ativação, os quais ocorrem no interior do aparelho digestório do inseto, resultando em paralisia do sistema e ocasionando a morte dos insetos por inanição, paralisia geral dos músculos e septicemia (ANGELO et al., 2010).

Apesar dos benefícios, existe a preocupação com os possíveis efeitos nocivos a insetos não alvos, o que também gera a possibilidade dessas toxinas serem transmitidas pelo pólen e afetarem o desenvolvimento de polinizadores. Esses insetos são essenciais para o funcionamento dos ecossistemas, sendo as abelhas os principais polinizadores bióticos existentes na natureza (FREITAS e NUNES-SILVA, 2012).

Além disso, a polinização ainda representa um dos fatores de produção fundamentais na condução de muitas culturas agrícolas em todo mundo, interferindo tanto na quantidade quanto na qualidade da produção (CHIARI et al., 2008). Portanto, nos últimos anos tem surgido o interesse em estudar a relação existente entre as abelhas e as plantas exploradas comercialmente, crescendo a necessidade de pesquisas na área.

A abelha *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae), é uma polinizadora de culturas agrícolas com grande sucesso no que se refere à produtividade, principalmente pela sua baixa especificidade quanto às espécies de plantas que visita (FREE, 1993; FREITAS e NUNES-SILVA, 2012). Estudos apontam que 20 mil espécies de abelhas estão espalhadas em todo o mundo, as quais atuam constantemente também para a manutenção da diversidade genética vegetal, contribuindo como polinizadoras de um grande número de espécies vegetais. Assim, ao pousarem nas flores as abelhas são cobertas pelo pólen da planta, transportando-o para outra planta no momento que realizar nova coleta, promovendo a troca de gametas entre plantas, ou seja, a polinização cruzada, importante para aumentar a produtividade e manter a variabilidade genética dos vegetais, relevante para a sobrevivência e evolução das espécies (BIZZOCHI, 2014).

O aumento na produtividade das culturas é um dos principais benefícios que uma polinização bem sucedida pode promover às culturas de importância econômica (FREE, 1993). A ação dos polinizadores é conhecida e considerada há muito tempo na produção agrícola e conservação ambiental; no entanto, considerando que o valor anual das lavouras polinizadas por insetos nos Estados Unidos corresponde a cerca de US\$ 14,6 bilhões, as abelhas são muito valiosas (TRIPLEHORN e JOHNSON, 2011). Desta forma, um certo acontecimento vem preocupando diversos setores da sociedade, como pesquisadores, ambientalistas, apicultores, produtores rurais, órgãos governamentais e organização não governamentais (ONG's). Este fenômeno, chamado de Colony Collapse Disorder (CCD), ou Desordem do Colapso de Colônias (DCC), em português, trata-se do desaparecimento das abelhas e a sua ausência nas colmeias, com ou sem a presença de crias, tendo como característica principal a incapacidade de as abelhas campeiras retornarem às suas colônias (OLDROYD, 2007).

Diversas pesquisas estão sendo realizadas, buscando as causas do CCD mas ainda não sabem os reais efeitos que estão causando esse desaparecimento das

abelhas. Inúmeras hipóteses são levantadas e associadas ao fenômeno, como o elevado uso de agrotóxicos nas lavouras, a falta de alimentos (pólen e néctar), o ataque de predadores ou parasitas, a presença de doenças e o consumo de alimentos provenientes de plantas tóxicas ou de organismos geneticamente modificados (OGM), como o milho Bt (OLDROYD, 2007; RAMIREZ-ROMERO et al., 2008; HENDRIKSMA et al., 2011; LIMA et al., 2011; LIMA et al., 2013; NIU et al., 2013; TREVISAN et al., 2013; BIZZOCCHI, 2014).

Atualmente, no país, são plantados mais de 13 milhões de hectares de milho transgênico (CONAB, 2015), o que corresponde à ±83% da área destinada à esta cultura (ISAAA, 2015). Portanto, o estudo dos efeitos que esses OGM's, especificamente os quais possuem a tecnologia Bt, podem gerar às colônias de abelhas, assim como a possibilidade de desencadear danos ambientais, é de extrema importância para a sociedade e o futuro da produção vegetal. Visto, ainda, que os experimentos realizados pelas empresas produtoras das tecnologias para aprovar suas solicitações de uso comercial, junto aos órgãos reguladores, normalmente apresentam tempo insuficiente para provar efetivamente as implicações das toxinas sobre o ambiente e os organismos não-alvo, além de serem de baixa qualidade científica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, P. P.; PARROTT, W.; ROCA, M. M. **Guia para a Avaliação do Risco Ambiental de Organismos Geneticamente Modificados**. São Paulo: ILSI Brasil (International Life Sciences Institute do Brasil), 2012. 146p.

ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTROGÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.

BIZZOCCHI, L. **Avaliação dos impactos do pólen de milho geneticamente modificado (Bt) sobre colônias de *Apis mellifera* L.** 2014. 66f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Florianópolis, 2014.

CARNEIRO, A. A.; GUIMARÃES, C. T.; VALICENTE, F. H.; WAQUIL, J. M.; VASCONCELOS, M. J. V.; CARNEIRO, N. P.; MENDES, S. M. **Milho Bt: teoria e prática da produção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga**. Sete Lagoas-MG: Embrapa milho e Sorgo, 2009. 26p.

CHIARI, W. C.; TOLEDO, V. A. A.; HOFFMAN-CAMPO, C. B.; RÚVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; TOLEDO, T. C. S. O. A.; LOPES, T. S. Polinização por *Apis mellifera* em soja transgênica (*Glycine max* (L.) Merrill Roundup Ready cv. BRS 245 RR e convencional cv. BRS 133. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 2, p. 267-271, 2008.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, quinto levantamento safra 2014/2015**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 05 out. 2015.

FREE, J. B. **Insect pollination of crops**. London: Academic Press, 1993. 684p.

FREITAS, B. M.; NUNES-SILVA, P. Polinização Agrícola e sua Importância no Brasil. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CANHOS, D. A. L.; ALVES, D. A.; SARAIVA, A. M. **Polinizadores no Brasil**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 103-118. 2012.

HENDRIKSMA, H. P.; HÄRTEL, S.; STEFFAN-DEWENTER, I. Testing Pollen of Single and Stacked Insect-Resistant Bt-Maize on In vitro Reared Honey Bee Larvae. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. 1-7, 2011.

ISAAA. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. **Biotech Information Resources: ISAAA Publications**. 2015. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

LIMA, M. A. P.; PIRES, C. S. S.; GUEDES, R. N. C.; CAMPOS, L. A. O. Lack of lethal and sublethal effects of Cry1Ac Bt-toxin on larvae of the stingless bee *Trigona spinipes*. **Apidologie**, v. 44, n. 1, p. 21–28, 2013.

LIMA, M. A. P.; PIRES, C. S. S.; GUEDES, R. N. C.; NAKASU, E. Y. T.; LARA, M. S.; FONTES, E. M. G.; SUJII, E. R.; DIAS, S. C.; CAMPOS, L. A. O. Does Cry1Ac Bt-toxin impair development of worker larvae of Africanized honey bee. **Journal of Applied Entomology**, v. 135, n. 6, p. 415–422, 2011.

MENDES, S. M.; BOREGAS, K. G. B.; LOPES, M. E.; WAQUIL, M. S.; WAQUIL, J. M. Respostas da lagarta-do-cartucho a milho geneticamente modificado expressando a toxina Cry 1A(b). **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 46, n. 3, p. 239-244, 2011.

NIU, L.; MA, Y.; MANNAKKARA, A.; ZHAO, Y.; MA, W.; LEI, C.; CHEN, L. Impact of Single and Stacked Insect-Resistant Bt-Cotton on the Honey Bee and Silkworm. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. 1-9, 2013.

OLDROYD, B. P. What's Killing American Honey Bees? **PLoS Biology**, v. 5, n. 6, p. 1195-1199, 2007.

RAMIREZ-ROMERO, R.; DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; CHAFFIOL, A.; PHAM-DELÈGUE, M. Does Cry 1Ab protein affect learning performances of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, n. 2, p. 327-333, 2008.

TREVISAN, H.; AGUIAR, A.; SABUGOSA-MADEIRA, B.; CARVALHO, A. G.; ABREU, I. Analysis the effect pollen from insect-resistant transgenic corn on the development of *Galleria mellonella* (Fabricius, 1754) (Lepidoptera, Pyralidae) and possible ecological consequences. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 4, p. 796-804, 2013.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **Estudo dos insetos**. 7. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 809p.

ARTIGO I

**O PÓLEN DE MILHO BT E NÃO BT TEM ALGUM EFEITO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO LARVAL DE *Apis mellifera* L.?**

O PÓLEN DE MILHO BT E NÃO BT TEM ALGUM EFEITO SOBRE O DESENVOLVIMENTO LARVAL DE *Apis mellifera* L.?

RESUMO

O pólen é uma das fontes de proteínas para alimentação de *Apis mellifera* L., poucos estudos relacionam a influência do pólen de plantas geneticamente modificadas sobre abelhas. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do pólen de milho Bt, e o não Bt, sobre o desenvolvimento das larvas deste polinizador. O trabalho foi realizado utilizando duas cultivares de milho (BALU 188 RR e BALU 280 PRO que expressa as toxinas Cry1A.105 e Cry2Ab2) no ano agrícola de 2015. O pólen das plantas foi coletado durante o florescimento pleno, enquanto as larvas das abelhas foram coletadas a partir dos favos de uma colmeia exposta próxima da lavoura de milho. A manutenção das larvas em laboratório foi realizada em cúpulas de cera de abelhas, sendo o experimento realizado com 10 cúpulas (repetições) por tratamento. Foram oferecidas sete dietas (tratamentos): mel puro; dieta com 20, 40 e 80 mg de pólen de milho da cultivar BALU 188 dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água; e dieta com 20, 40 e 80 mg de pólen de milho da cultivar BALU 280 PRO dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água. A massa adquirida e a mortalidade/sobrevivência das larvas foram avaliadas diariamente durante o experimento. Os dados, após submetidos à análise estatística que permitiram concluir que a massa adquirida pelas larvas foi influenciada negativamente pela procedência do pólen (Bt e não Bt) e, para o caso do pólen Bt, também pela dosagem de 40 e 80 mg utilizada na dieta. As larvas alimentadas com as dietas compostas por pólen Bt, exceto a de menor concentração, apresentaram menor massa adquirida que as demais. As doses de 40 e 80 mg de pólen Bt resultaram em menor aquisição de massa. A mortalidade das larvas de abelha pode ser influenciada pela quantidade de pólen na dieta, sendo que quanto maior a dose utilizada maior a porcentagem obtida, independente da cultivar (Bt e não Bt).

Palavras-chave: Abelhas, pólen transgênico, polinização, *Zea mays*.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos pragas, entre elas as cultivares de milho que expressam em seus tecidos eventos com até três proteínas obtidas da bactéria *Bacillus thuringiensis*, tem gerado inúmeras discussões éticas e científicas (BIZZOCCHI, 2014). Dentre essas, os possíveis impactos ambientais, tanto os diretos quanto os indiretos, como a consequente alteração das interações ecológicas (TREVISAN et al., 2013).

Atualmente, no Brasil, são plantados 15,5 milhões de hectares de milho (CONAB, 2015), sendo que aproximadamente 72 e 90% dessa área é semeada com milho transgênico durante a primeira e segunda safra, respectivamente (ISAAA, 2015). A relação do pólen desses vegetais, também conhecidos como organismos geneticamente modificados (OGM), com o desenvolvimento de colônias abelhas (*Apis mellifera* L.), é um dos casos mais debatidos (SABUGOSA-MADEIRA et al., 2007; RAMIREZ-ROMERO et al., 2008; SABUGOSA-MADEIRA e ABREU, 2009; HENDRIKSMA et al., 2011b).

As abelhas possuem grande importância para a manutenção da diversidade genética vegetal, atuando como polinizadoras de, aproximadamente, 73% das espécies cultivadas (BIZZOCCHI, 2014). Além disso, são responsáveis por cerca de 30% da produção de todos os alimentos consumidos pelos seres humanos (POTTS et al., 2006) e 22% de toda a polinização que ocorre nas florestas tropicais, como a amazônica (SAMEJIMA et al., 2004).

O desenvolvimento das colônias de abelhas depende tanto da qualidade quanto da quantidade dos recursos alimentares, visto que o pólen é essencial para a nutrição e o desenvolvimento do potencial produtivo e reprodutivo da colmeia, pois representa a principal fonte de proteínas, lipídios, vitaminas e minerais para indivíduos imaturos (NEGRÃO et al., 2014).

Algumas culturas transgênicas apresentam toxinas específicas para os insetos alvos, porém, muitas vezes, essas proteínas podem causar efeitos nocivos a insetos não alvos, o que gera a possibilidade dessas toxinas serem transmitidas via pólen e afetarem o desenvolvimento de larvas de abelhas. Mesmo que estes OGM's não ofereçam nenhum efeito letal às abelhas, podem ocasionar alguns estresses às colônias pelo fato de aumentar a susceptibilidade destes insetos à ação de outros

patógenos, como bactérias, ácaros e vírus (OLDROYD, 2007) e, assim, reduzirem o potencial produtivo e ecológico das colônias.

A nocividade dos transgênicos para as colmeias de abelhas é recentemente estudada, podendo afetar o comportamento desta polinizadora ou, dependendo da concentração, até mesmo a mortalidade de outros organismos (HANLEY et al., 2003; HUANG et al., 2004; RAMIREZ-ROMERO et al., 2008). Desta forma, já foi observado que as abelhas se comportavam diferentemente quando expostas a diferentes dietas, sendo que as mesmas levavam mais tempo para consumir o alimento que com pólen transgênico, além de apresentarem distúrbios nos processos de aprendizagem, o que pode ocasionar consequências nas atividades sociais e no processo de forrageamento (RAMIREZ-ROMERO et al., 2008).

Uma nutrição adequada no estágio larval, é primordial para o desenvolvimento da colônia. Sabe-se que as larvas onde se originaram as rainhas recebem apenas geleia real durante todo seu desenvolvimento, já aquelas que vão originar operárias recebem um outro tipo de geleia produzida nas glândulas hipofaríngeas de abelhas operárias adultas durante os primeiros 3-4 dias de idade e, posteriormente, uma mistura de mel e pólen (PLANTA, 1888; REMBOLD et al., 1974; WEAVER, 1974; ISHAY et al., 1976; ASECOT; LENSKY 1984; KUNERT e CRAILSHEIM, 1988; CRAILSHEIM, 1990; MALONE et al., 2002; BABENDREIER et al., 2004), o que consequentemente deixa o inseto exposto aos possíveis efeitos dos transgênicos desde sua fase imatura.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do pólen de milho Bt (proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2) e não Bt sobre o desenvolvimento de larvas de *A. mellifera*, assim como nas diferentes doses utilizadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Híbridos de milho utilizados

O trabalho foi realizado na fazenda experimental da UFGD a partir da semeadura de duas cultivares de milho: BALU 280 PRO (Bt/RR, expressando as toxinas Cry1A.105 e Cry2Ab2) e BALU 188 RR, ambas super precoces, no ano agrícola de 2015, em campo experimental da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cwa (mesotérmico úmido com verões quentes e invernos secos), com precipitação média anual de 1.500 mm e temperatura média de 22°C (FIETZ & FISCH, 2008).

Coleta do pólen

O pólen das plantas foi coletado durante o florescimento pleno das cultivares, cobrindo-se os pendões com sacos de papel. Após 48 horas, os sacos foram coletados e encaminhados ao Laboratório de Entomologia da UFGD para a separação e o armazenamento do pólen em geladeira ($\pm 4^{\circ}\text{C}$), segundo metodologia adaptada de Wang et al. (2007).

Colônia de abelhas e obtenção das larvas

As larvas foram coletadas a partir dos favos de uma colmeia de *A. mellifera* exposta no campo experimental da UFGD. Após retirados, os favos foram cobertos com tecidos para manutenção da temperatura e imediatamente levados ao laboratório de Entomologia Agrícola da UFGD. Esses favos foram mantidos em cima de um recipiente e com as células viradas para baixo para que ocorresse o deslocamento das larvas, permanecendo assim até a obtenção da quantidade de 70 larvas suficiente para a realização do estudo (Figura 1A). A escolha das larvas foi estabelecida pelo tamanho e peso, através de uma análise visual e uma balança analítica, para assim manter as mesmas condições de idade (3 dias) e alimentação.

Bioensaio

A manutenção das larvas em laboratório climatizado foi elaborada em condições de temperatura com $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e UR de $70 \pm 10\%$, sendo realizada seguindo os protocolos de Aupinel et al. (2005) e Hendriksma et al. (2011a).

As larvas foram mantidas em cúpulas de cera feitas à mão (Figura 1B), para simular as células de sobrevivência de larvas da colmeia. Essas cúpulas, com formato cônico ($\pm 0,52 \text{ cm}^3$), foram coladas em caixas de papelão e mantidas fechadas, para que assim permanecessem no escuro e mantivessem a temperatura, em condições similares às encontradas naturalmente nas colmeias. Em cada cúpula mantinha-se uma larva, sendo o experimento realizado com 10 cúpulas (repetições) para cada tratamento estudado.



FIGURA 1. Obtenção das larvas de *Apis mellifera* (A) e acomodação em cúpulas de cera (B).

Alimentação das larvas

Foram oferecidas sete dietas que compuseram os tratamentos (dietas): mel puro (Mel), dieta com 20 mg de pólen de milho da cultivar não Bt dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água (20nãoBt), dieta com 40 mg de pólen de milho da cultivar não Bt dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água (40nãoBt), dieta com 80 mg de pólen de milho da cultivar não Bt dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água (80nãoBt), dieta com 20 mg de pólen de milho da cultivar BALU 280 PRO dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água

(20Bt), dieta com 40 mg de pólen de milho da cultivar Bt dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água, e dieta com 80 mg de pólen de milho da cultivar Bt dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água (80Bt).

As dietas foram oferecidas uma vez por dia para cada larva ao longo do experimento, através da adição de 1,5 a 8 mg de dieta artificial durante todo o experimento, nas cúpulas, em função do consumo diário. Em média, cada larva recebeu aproximadamente 24 mg de dieta ao longo do estudo, uma vez que nenhuma dieta oferecida foi removida durante ou após o período de alimentação.

Características avaliadas das larvas

A massa adquirida e a mortalidade/sobrevivência das larvas foram observadas diariamente durante o experimento, para a avaliação dos possíveis danos dos tratamentos durante as 120 horas de exposição alimentar.

Após serem retiradas das suas cúpulas com o auxílio de uma pinça, as larvas foram pesadas em balança analítica, cujo prato foi coberto com papel filtro para a obtenção da massa adquirida diária dos indivíduos.

Os indivíduos considerados mortos, reconhecidos por eventuais manchas dérmicas necróticas (preto ou branco) ou uma perda visível de turgor e, ainda, confirmados por não responderem ao toque com pinça, foram removidos diariamente (Figura 2).

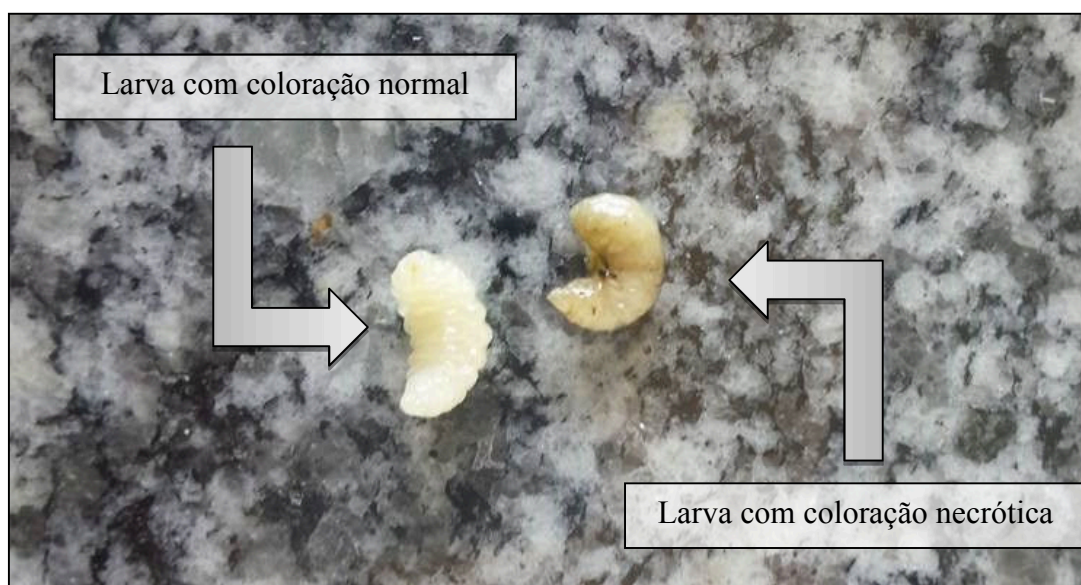


FIGURA 2. Diferentes colorações de larvas de *Apis mellifera* (normal e necrótica).

Análise estatística

A partir dos dados obtidos para a massa adquirida total realizou-se a análise de variância e, quando observado efeito significativo, aplicou-se o teste de Tukey a 1% de probabilidade e a análise de regressão para as doses de pólen utilizadas nas dietas. Foi calculado a massa adquirida diária e, a partir de um gráfico específico, foram apresentadas as variações temporais desses dados.

Os dados de mortalidade final e sobrevivência diária foram apresentados graficamente e a mortalidade foi corrigida conforme Abbott (1925), através da fórmula “ $Mc(\%) = [(\%Mo - \%Mt) / (100 - \%Mt)] \times 100$ ”, onde “Mc” é a mortalidade corrigida, “Mo” a mortalidade observada e “Mt” a mortalidade na testemunha.

As análises foram realizadas com o auxílio do software estatístico Assistat® (SILVA e AZEVEDO, 2002) e a apresentação dos dados efetuada através do programa gráfico estatístico SigmaPlot 13 (SYSTAT SOFTWARE, 2015).

RESULTADOS

As médias das massas adquiridas pelas larvas de abelha *A. mellifera* apresentaram diferença estatística altamente significativa ($p < 0,01$) entre algumas das dietas oferecidas (Figura 3). A dieta considerada testemunha, composta apenas por mel, assim como todas as dietas com pólen da cultivar não Bt (20, 40 e 80 mg de pólen), apresentaram médias estatisticamente superiores às dietas compostas por 40 e 80 mg de pólen da cultivar Bt.

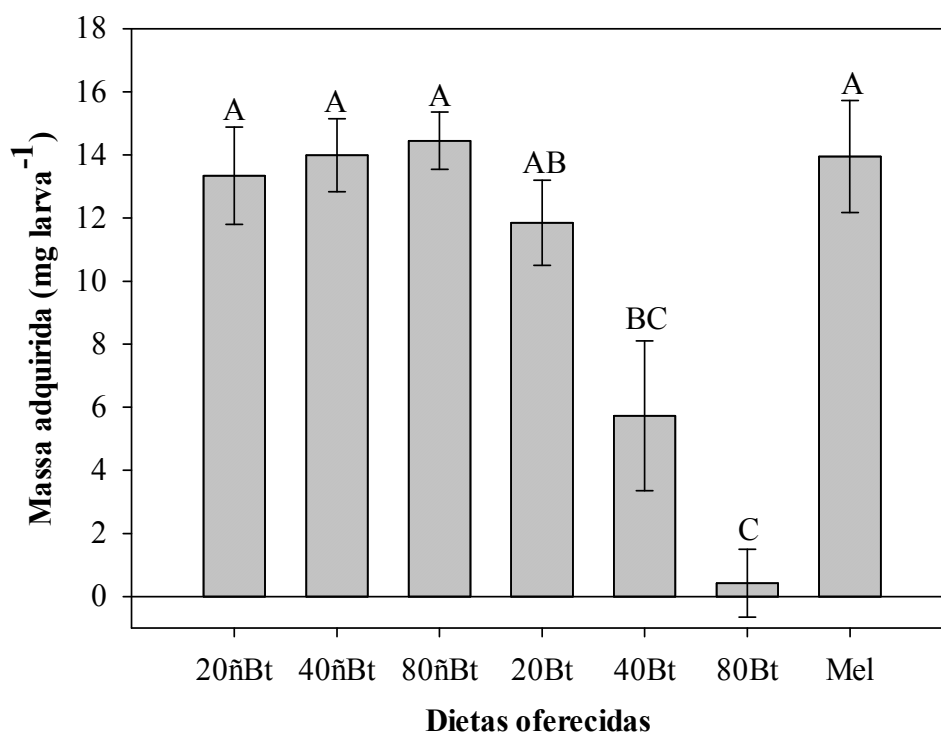


FIGURA 3. Massa adquirida por larva de abelha (*Apis mellifera*) após alimentação durante cinco dias com mel e diferentes dosagens de pólen de milho Bt e não Bt. Letras diferentes sobre as colunas e barras indicam médias estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,01$). As barras representam o erro-padrão da média.

Levando-se em consideração a massa adquirida por dia (Figura 4), observa-se uma variação de $-4,17$ a $5,46$ mg larva⁻¹ dia⁻¹ entre os tratamentos, o que representa uma oscilação de $9,63$ mg; enquanto que para o mel (controle) a variação ficou entre $3,31$ e $4,23$ mg larva⁻¹ dia⁻¹, oscilando apenas $0,92$ mg. Além disso, nota-se que até o segundo dia após o início do experimento os tratamentos com pólen Bt foram os que apresentaram as menores massas adquiridas, sendo que nessa época o

tratamento com 80 mg afetou negativamente a massa inicial das larvas. Já após três dias, todas as dietas resultaram em ganho de massa pelas larvas e, no dia seguinte, as maiores dosagens de pólen de milho não Bt (40 e 80 mg) afetaram negativamente as larvas, o que sugere mais uma vez que a quantidade de pólen na dieta pode estar afetando essa característica.

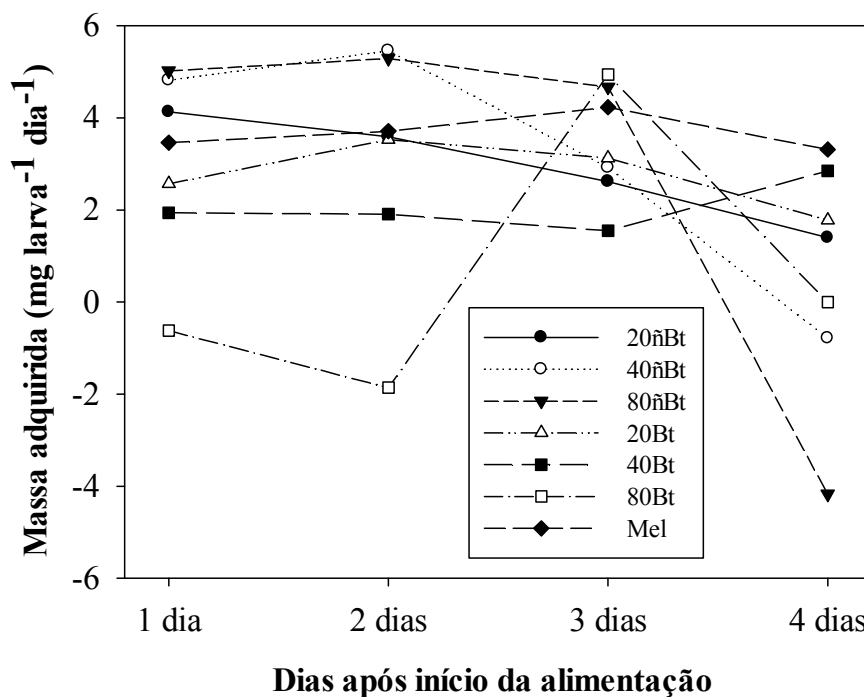


FIGURA 4. Massa diária adquirida por larvas de abelha (*Apis mellifera*) após alimentação durante cinco dias com mel e diferentes dosagens de pólen de milho Bt e não Bt.

Os resultados das análises de regressão, no que se refere à massa adquirida pelas larvas, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) para a cultivar não Bt (Figura 5A), mas resultaram em diferenças altamente significativas ($p < 0,01$) para a cultivar Bt (Figura 5B) entre as dosagens de pólen utilizadas na dieta. A cultivar não Bt resultou em massa média adquirida de $13,9325 \text{ mg larva}^{-1}$ e nenhum modelo de regressão ajustou-se significativamente aos resultados obtidos; já para a cultivar Bt, observa-se efeito linear negativo das dosagens de pólen sobre a massa adquirida e, segundo o modelo de regressão estimado, houve decréscimos na aquisição de massa pelas larvas na ordem de $0,1767 \text{ mg}$ por mg de pólen Bt adicionado na dieta.

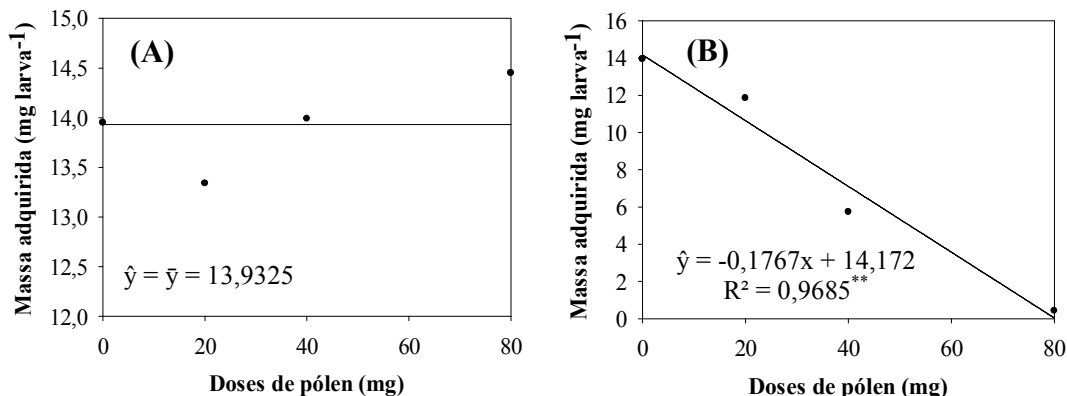


FIGURA 5. Massa adquirida por larvas de abelha (*Apis mellifera*) após alimentação com diferentes doses de pólen [0, 20, 40 e 80 mg de pólen de milho da cultivar BALU 188 (A) e BALU 280 PRO (B)] dissolvido em solução de mel a 10% de água durante 5 dias. ** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

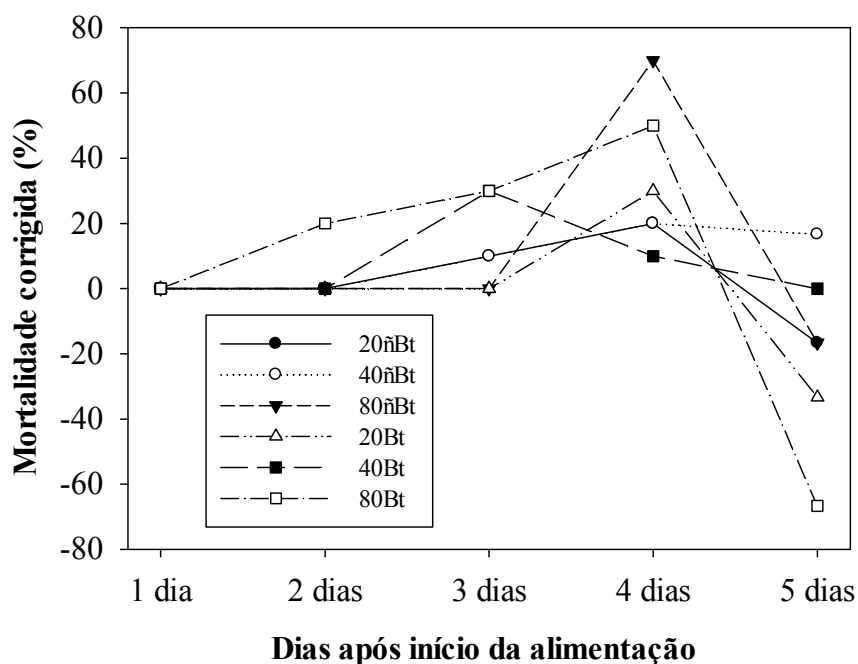


FIGURA 6. Mortalidade corrigida (Abbott) de larvas de abelha (*Apis mellifera*) em diferentes dias após alimentação com mel e diferentes dosagens de pólen de milho Bt e não Bt.

A partir da mortalidade corrigida das larvas (Figura 6) observa-se que, durante os três primeiros dias, o tratamento 80Bt apresentou a maior mortalidade e, no quarto dia, esteve abaixo apenas do tratamento 80nBt. Já ao se considerar o quinto dia de alimentação, nota-se diversos valores negativos, que indica que a morte de parte das larvas alimentadas com mel (testemunha) aconteceu apenas neste dia, pois

nesta data, em alguns tratamentos (80ñBt, 20ñBt, 20Bt e 80Bt), ocorreu menor mortalidade das larvas que na testemunha. Desta forma, a maior dosagem de pólen Bt (80 mg) obteve elevada mortalidade negativa, justamente porque todas as larvas do tratamento já haviam morrido no quarto dia (Figura 7). Vale ressaltar, ainda, que todas as larvas não mortas no quinto dia transformaram-se em pré-pupas, mas provavelmente, em condições laboratoriais, todas morreriam posteriormente e antes de entrarem na fase de pupa.

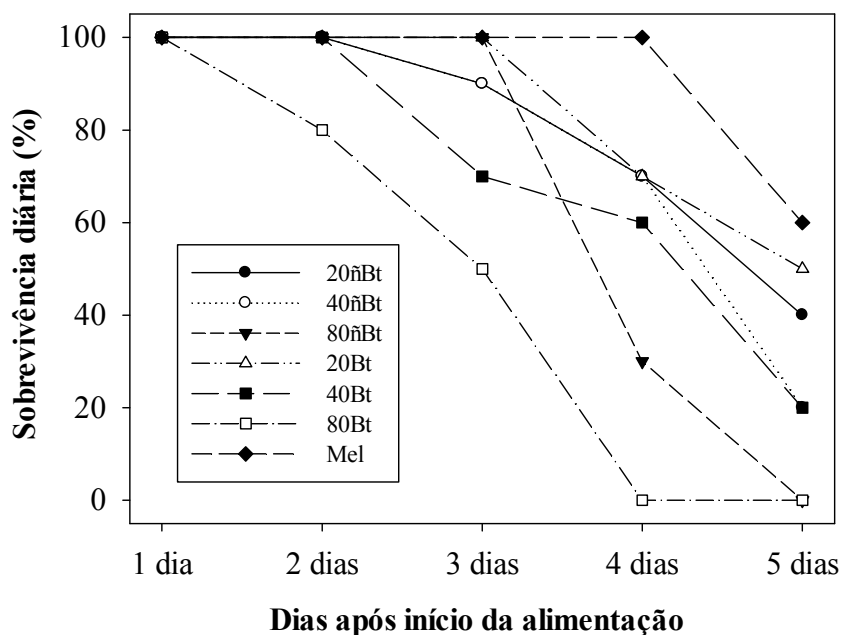


FIGURA 7. Sobrevivência diária (%) ao longo de cinco dias de larvas de abelha (*Apis mellifera*) durante o experimento de alimentação com mel e diferentes dosagens de pólen de milho Bt e não Bt.

A sobrevivência das larvas também foi bastante afetada pelo tratamento 80Bt, a qual foi igualada apenas no quinto dia pelo tratamento 80ñBt (Figura 7). Durante o último dia de avaliação, observa-se que as maiores dosagens de pólen na dieta, tanto Bt quanto não Bt, afetaram negativamente a sobrevivência, ou seja, quanto maior foi a dosagem de pólen utilizada, menor foi a sobrevivência obtida. Isso fica ainda mais evidente na mortalidade final, onde as maiores mortalidades foram resultantes das maiores dosagens, independentemente da cultivar utilizada (Figura 8).

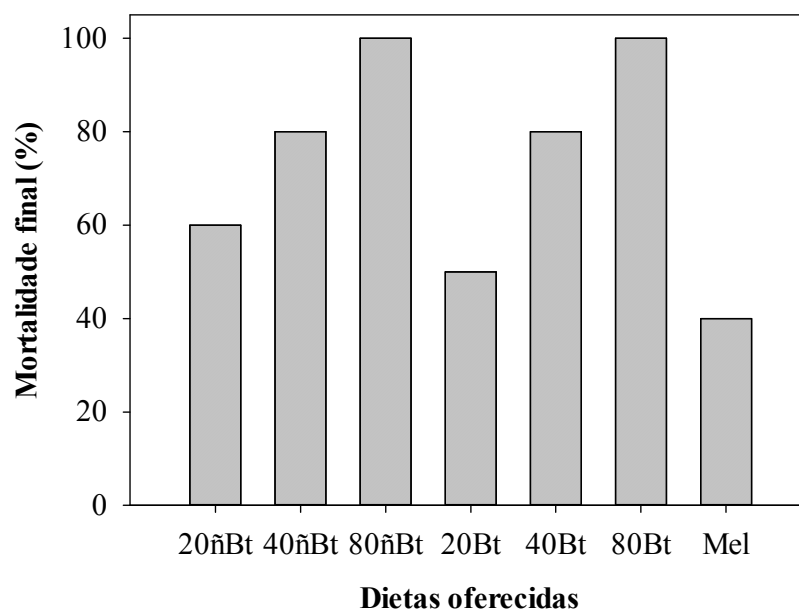


FIGURA 8. Mortalidade final (%) de larvas de abelha (*Apis mellifera*) após alimentação durante cinco dias com mel e diferentes dosagens de pólen de milho Bt e não Bt.

DISCUSSÃO

Com relação ao efeito do pólen de milho Bt sobre o ganho de massa de larvas de *A. mellifera*, nas condições em que esse experimento foi desenvolvido, observa-se que o pólen da cultivar Bt, nas dosagens de 40 e 80 mg, interferiu negativamente na massa adquirida pelas larvas durante os cinco dias em que as larvas se alimentaram, quando comparado com a testemunha e a cultivar não Bt. Segundo Babendreier et al. (2004), as larvas de abelhas consomem entre 1720 e 2310 grãos de pólen de milho até empuparem, o que varia entre $1,52 \pm 0,108$ e $2,04 \pm 0,104$ mg. Em média, ao se considerar o total de dieta consumida por cada larva durante todo o estudo, as larvas se alimentaram com 0; 0,39; 0,77 e 1,50 mg de pólen, nas dosagens de 0, 20, 40 e 80 mg de pólen em solução de dieta, respectivamente. Isso indica que as maiores dosagens utilizadas no experimento estão próximas e, ainda, um pouco abaixo do que as larvas ingerem de pólen em condições naturais de desenvolvimento, validando os resultados encontrados.

Já Hendriksma et al. (2011b), alimentando larvas de abelhas com pólen de diferentes cultivares de milho Bt e não Bt, além de tratamentos sem pólen e com

pólen de *Heliconia rostrata* (L.) (Cronquist, 1981) como controle, verificaram que a massa das pré-pupas alimentadas com pólen de milho Bt foram quase idênticas às alimentadas com pólen de milho convencional e sem pólen, não havendo diferença significativa entre os tratamentos, exceto para o composto com pólen de *H. rostrata*, que apresentou a menor massa larval para esta planta considerada tóxica.

No que se refere à mortalidade de larvas, nota-se que este parâmetro foi influenciado apenas pela quantidade de pólen utilizada na dieta, sendo que, ainda, nenhum efeito esteve relacionado com a tecnologia Bt. Segundo Veloso e Lourenço (2014), após estudarem diferentes porcentagens (0; 2,5; 5 e 10%) de pólen em dietas para alimentação de larvas de abelhas, concluíram que 10% de pólen é extremamente prejudicial para a sobrevivência e o desenvolvimento larval. De acordo com os próprios autores, 2,5 e 5% de pólen na dieta assemelha-se à um consumo de larvas criadas em uma colônia natural, no entanto, 10% de pólen é mais do que o dobro da quantidade que uma larva consome em condições naturais de desenvolvimento.

Assim, ao se converter a quantidade de pólen na dieta e calculando a porcentagem ingerida, foram fornecidas, em média, 0; 1,64; 3,23 e 6,25% de pólen nas dosagens de 0, 20, 40 e 80 mg de pólen em solução de dieta, respectivamente. Portanto, a dieta com 80 mg de pólen na solução, utilizada na presente pesquisa, está próxima às maiores porcentagens de pólen (5 e 10%) citadas no estudo de Veloso e Lourenço (2014), devendo ser evitada para a larvicultura de *A. mellifera*.

Com relação à origem do pólen, Hendriksma et al. (2011b) também relatam que todas as larvas de *A. mellifera* alimentadas em seu estudo com pólen de milho Bt sobreviveram após 120 horas de exposição alimentar até atingirem a fase de pré-pupa, sendo que a taxa de sobrevivência destas larvas não diferiu significativamente das larvas alimentadas com pólen de milho Bt. Além disso, de todas as larvas alimentadas com pólen do milho convencional, 97% sobreviveram até a fase de pré-pupa. Assim, não houve diferença significativa entre as cinco cultivares de milho utilizadas e, ainda, entre o tratamento sem pólen. Em contraste, um número significativamente menor de larvas sobreviveram quando foram alimentados com pólen de *H. rostrata*, em comparação com os outros tratamentos.

Quando se analisa os efeitos de pólen de plantas Bt na alimentação de abelhas sem ferrão, como *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793) (Hymenoptera: Apidae), também não se verifica efeitos prejudiciais. Indivíduos dessa espécie não apresentaram mortalidade significativa quando submetidas à alimentação com pólen

de algodão Bt, quando comparadas com algodão convencional. Isso indica que a proteína Cry1Ac não apresenta risco significativo para esta espécie de abelha brasileira (LIMA et al., 2013).

Em um estudo realizado por Trevisan et al. (2013), analisando o efeito do pólen do milho transgênico resistente a insetos sobre o desenvolvimento de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), lepidóptero que ocorre naturalmente em colônias de abelhas e que suas larvas alimentam-se de materiais presentes nas colmeias, como cera, pólen e mel, verificaram que o pólen do milho transgênico que expressa a proteína Cry1Ab, ocasiona mortalidade larval significativa em larvas dessa espécie, quando comparados com o pólen do milho convencional. Desta forma, mesmo que as plantas transgênicas, como o milho Bt, não ofereçam danos diretos às abelhas através da mortalidade de larvas, podem ocasionar possíveis impactos ambientais através de alterações nas interações ecológicas naturais. Lima et al. (2011) estudando os efeitos negativos que as bactérias *Bacillus thuringiensis* contendo a toxina Cry1Ac, que é expresso em plantas de algodão GM, através de dietas contaminadas, verificaram um aumento da mortalidade larval de *A. mellifera* apenas na dieta diluída, não havendo impactos negativos em relação aos adultos dessa abelha.

Assim, ao se avaliar os danos diretos que esses OGM's podem gerar às colônias de abelhas, e a possibilidade de desencadear algum dano ambiental irreversível, esta pesquisa resultou em informações importantes como, por exemplo, que a massa adquirida pelas larvas é negativamente influenciada pelo pólen Bt, sendo essa influência maior à medida que se aumenta o teor de pólen na alimentação; além disso, que a mortalidade dessas larvas também é influenciada pela quantidade de pólen na dieta.

As abelhas têm um papel importante no serviço de polinização, e o pólen das culturas transgênicas podem estar relacionadas com o sumiço das mesmas, e influenciando na redução das populações nas colmeias. O pólen das plantas que as abelhas coletam são ricos em aminoácidos, necessitando assim para a sua sobrevivência essa diversidade na dieta proteica que pode afetar a longevidade desses indivíduos.

CONCLUSÕES

A massa adquirida por larvas de abelha *Apis mellifera* é influenciada tanto pela procedência do pólen (Bt e não Bt) e, para o caso específico do Bt, também pela quantidade consumida.

O aumento de doses de pólen Bt afetam negativamente a aquisição de massa, segundo modelo de regressão ajustado.

A mortalidade de larvas de abelha pode ser influenciada pela quantidade de pólen na dieta, pois quanto maior a dosagem utilizada neste estudo, maior a porcentagem de mortalidade obtida, independente da cultivar (Bt e não Bt).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, n. 2, p. 265-266, 1925.

ASENCOT, M.; LENSKY, Y. Juvenile hormone induction of “queenliness” on female honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae reared on worker jelly and on stored royal jelly. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 78, n. 1, p. 109-117, 1984.

AUPINEL, P.; FORTINI, D.; DUFOUR, H.; TASEI, J. N.; MICHAUD, B.; ODOUX, J. F.; PHAM-DELÈGUE, M. H. Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. **Bulletin of Insectology**, v. 58, n. 2, p. 107-111, 2005.

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**, v. 35, n. 3, p. 293–300, 2004.

BIZZOCCHI, L. **Avaliação dos impactos do pólen de milho geneticamente modificado (Bt) sobre colônias de *Apis mellifera* L.** Dissertação - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2014.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, quinto levantamento safra 2014/2015.** Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 05 out. 2015.

CRAILSHEIM, K. The protein balance of the honey bee worker. **Apidologie**, v. 21, n. 5, p. 417–429, 1990.

FIETZ, C. R.; FISCH, G. F. **O clima na região de Dourados, MS.** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. 32p.

HANLEY, A.; HUANG, Z.; PETT, W. Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. **Journal of Apicultural Research**, v. 42, n. 4, p. 77-81, 2003.

HENDRIKSMA, H. P.; HÄRTEL, S.; STEFFAN-DEWENTER, I. Honey bee risk assessment: new approaches for in vitro larvae rearing and data analyses. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 2, n. 5, p. 509–517, 2011a.

HENDRIKSMA, H. P.; HÄRTEL, S.; STEFFAN-DEWENTER, I. Testing pollen of single and stacked insect-resistant Bt-maize on in vitro reared honey bee Larvae. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. 1-7, 2011b.

HUANG, Z.; HANLEY, A.; PETT, W.; LANGENBERGER, M.; DUAN, J. Field and semifield evaluation of impacts of transgenic canola pollen on survival and

development of worker bees. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 5, p. 1517-1523, 2004.

ISAAA. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. **Biotech Information Resources: ISAAA Publications**. 2015. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

ISHAY, J.; FISCHL, J.; ALPERN, G. Study of honeybee caste differentiation by glucose level differences during development. **Insectes Sociaux**, v. 23, n. 1, p. 23-28, 1976.

KUNERT, K.; CRAILSHEIM, K. Seasonal changes in carbohydrate, lipid and protein-content in emerging worker honeybees and their mortality. **Journal of Apicultural Research**, v. 27, n. 1, p. 13–21, 1988.

LIMA, M. A. P.; PIRES, C. S. S.; GUEDES, R. N. C.; CAMPOS, L. A. O. Lack of lethal and sublethal effects of Cry1Ac Bt-toxin on larvae of the stingless bee *Trigona spinipes*. **Apidologie**, v. 44, n. 1, p. 21–28, 2013.

LIMA, M. A. P.; PIRES, C. S. S.; GUEDES, R. N. C.; NAKASU, E. Y. T.; LARA, M. S.; FONTES, E. M. G.; SUJII, E. R.; DIAS, S. C.; CAMPOS, L. A. O. Does Cry1Ac Bt-toxin impair development of worker larvae of Africanized honey bee? **Journal of Applied Entomology**, v. 135, n. 6, p. 415–422, 2011.

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**, v. 33, n. 5, p. 447–458, 2002.

NEGRÃO, A. F.; BARRETO, L. M. R. C.; ORSI, R. O. influence of the collection season on production, size, and chemical composition of bee pollen produced by *Apis mellifera* L. **Journal of Apicultural Science**, v. 58, n. 2, p. 5-10, 2014.

OLDROYD, B. P. What's Killing American Honey Bees? **PLoS Biology**, v. 5, n. 6, p. 1195-1199, 2007.

PLANTA, A. V. Über den Futtersaft von Bienen. **Hoppe Seyl Z Physiol Chemie**, v. 12, n. 1, p. 327–354, 1888.

POTTS, S. G.; PETANIDOU, T.; ROBERTS, S.; OTOOLE, C.; HULBERT, A.; WILLMER, P. Plant-pollinator biodiversity and pollination services in a complex Mediterranean landscape. **Biological Conservation**, v. 129, n. 4, p. 519-529, 2006.

RAMIREZ-ROMERO, R.; DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; CHAFFIOL, A.; PHAM-DELÈGUE, M. Does Cry 1Ab protein affect learning performances of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, n. 2, p. 327-333, 2008.

REMBOLD, H.; CZOPPELT, C.; RAO, P. J. Effect of juvenile hormone treatment on caste differentiation in the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, v. 20, n. 7, p. 1193-1202, 1974.

SABUGOSA-MADEIRA, J. B.; ABREU, I.; RIBEIRO, H.; CUNHA, M. Bt transgenic maize pollen and the silent poisoning of the hive. **Journal of Apicultural Research**, v. 46, n. 1, p. 57-58, 2007.

SABUGOSA-MADEIRA, B.; ABREU, I. O pólen de milho geneticamente modificado: possíveis implicações no desequilíbrio ecológico das colmeias. **Revista Real Academia Galega de Ciências**, v. 28, n. 1, p. 71-85, 2009.

SAMEJIMA, H.; MARZUKI, M.; NAGAMITSU, T.; NAKASHIZUKA, T. The effects of human disturbance on a stingless bee community in a tropical rainforest. **Biological Conservation**, v. 120, n. 4, p. 577-587, 2004.

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SYSTAT SOFTWARE. **SigmaPlot 13**: The simplest way to analyze e create graphs. 2015. Disponível em: <<http://www.sigmaplot.com/products/sigmaplot>>. Acesso em: 10 dez 2015.

TREVISAN, H.; AGUIAR, A.; SABUGOSA-MADEIRA, B.; CARVALHO, A. G.; ABREU, I. Analysis the effect pollen from insect-resistant transgenic corn on the development of *Galleria mellonella* (Fabricius, 1754) (Lepidoptera, Pyralidae) and possible ecological consequences. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 4, p. 796-804, 2013.

VELOSO, J. A.; LOURENÇO, A. P. Pollen diet for in vitro rearing of africanized honey bee larvae, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 288-296, 2014.

WANG, Z.; WU, Y.; HE, K.; BAI, S. Effects of transgenic Bt maize pollen on longevity and fecundity of *Trichogramma ostriniae* in laboratory conditions. **Bulletin of Insectology**, v. 60, n. 1, p. 49-55, 2007.

WEAVER, N. Control of dimorphism in the female honeybee. 3. The balance of nutrients. **Journal of Apicultural Research**, v. 13, n. 1, p. 93-101, 1974.

ARTIGO II

**O PÓLEN DE MILHO BT E NÃO BT TEM ALGUM EFEITO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE ADULTOS DE *Apis mellifera* L.?**

O PÓLEN DE MILHO BT E NÃO BT TEM ALGUM EFEITO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE ADULTOS DE *Apis mellifera* L.?

RESUMO

A exposição de *Apis mellifera* às proteínas tóxicas do milho transgênico inseticidas Bt, contidas nos pólenes das cultivares de organismos geneticamente modificados, geram inúmeras dúvidas sobre seus reais efeitos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do pólen de milho Bt e não Bt sobre o desenvolvimento de adultos de *A. mellifera*. O trabalho foi realizado a partir da semeadura de duas cultivares de milho (BALU 188 RR e BALU 280 PRO que expressa as toxinas Cry1A.105 e Cry2Ab2) em 2015. O pólen das plantas foi coletado durante o florescimento pleno, enquanto as abelhas foram coletadas a partir de uma colmeia exposta próxima da lavoura de milho. A manutenção dos adultos em laboratório foi realizada em recipientes plásticos (500 mL) com formato cilíndrico e cobertos com tecido tule de *nylon*. Foram oferecidas quatorze dietas (tratamentos): mel puro; dieta com 20, 40 e 80 mg de pólen de milho da cultivar BALU 188 dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água; dieta com 20, 40 e 80 mg de pólen de milho da cultivar BALU 280 PRO dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água; pasta candi pura; dieta com 20, 40 e 80 mg de pólen de milho da cultivar BALU 188 dissolvido em 1 g de pasta candi; e dieta com 20, 40 e 80 mg de pólen de milho da cultivar BALU 280 PRO dissolvido em 1 g de pasta candi. A massa consumida e a mortalidade/sobrevivência dos adultos foram avaliadas diariamente durante 14 dias de experimento. Os dados obtidos, após submetidos à análise estatística, permitiram concluir que os adultos de abelhas *A. mellifera* se alimentam mais de dietas compostas por solução de mel, quando comparado com pasta candi. A mortalidade é mais elevada e, além disso, adiantada, quando acontece o consumo de elevadas doses de pólen de milho, visto que o estômago dos adultos, não são preparados para altas cargas proteicas, apenas para imaturos, sendo os efeitos mais evidentes e severos naqueles que apresentam a tecnologia Bt.

Palavras-chave: Abelhas, pólen transgênico, polinizadores, *Zea mays*.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) foi uma das primeiras grandes culturas transgênicas a ser cultivada de forma comercial, destacando-se o milho Bt, cultivar modificada de modo a produzir uma toxina inseticida encontrada na bactéria *Bacillus thuringiensis* (SABUGOSA-MADEIRA e ABREU, 2009). Atualmente, somente no Brasil são plantados cerca de 15,5 milhões de hectares de milho (CONAB, 2015), sendo que $\pm 11,3$ e 14 milhões, ou seja, 72,6 e 90% da área, são semeadas com milho transgênico durante a primeira e segunda safra, respectivamente (ISAAA, 2015).

A cultura do milho é hospedeira de um enorme complexo de lepidópteros pragas que desfolham as plantas ou, até mesmo, destroem suas partes reprodutivas, como a espiga, afetando consideravelmente a produtividade. Desta maneira, os organismos geneticamente modificados que apresentam as toxinas Cry, as quais possuem atividade inseticida, se tornam uma importante ferramenta no controle de espécies consideradas pragas-chave (SABUGOSA-MADEIRA et al., 2009). Apesar dos benefícios, existe a preocupação com os possíveis efeitos nocivos a insetos não alvos, o que também gera a possibilidade dessas toxinas serem transmitidas pelo pólen das plantas e afetarem o desenvolvimento da *Apis mellifera* (LIMA et al., 2011; NIU et al., 2013).

As abelhas não possuem capacidade de distinguir flores transgênicas e não transgênicas (MALONE et al., 2001). Desta forma, com a expansão das cultivares geneticamente modificadas, elas estão mais sujeiras a coletar pólen contendo proteínas novas e estranhas ao ambiente das colônias (SABUGOSA-MADEIRA et al., 2009), armazenando-os nas células dos favos para posteriormente utilizarem na alimentação de larvas e adultos, o que pode ocasionar inúmeros problemas, desde questões comportamentais até de sobrevivência (BIZZOCCHI, 2014).

As abelhas não demonstram grande interesse em plantas de milho quando há outras boas fontes de pólen para garantir a sua subsistência (SABUGOSA-MADEIRA et al., 2007). No entanto, o monocultivo da cultura muitas vezes influencia estes polinizadores a se alimentarem quase que exclusivamente sobre o pólen do milho, pois esta é a principal fonte de proteínas para as abelhas

(CRAILSHEIM, 1990), além de fornecer lipídeos, vitaminas, minerais, amido e alguns açúcares (WINSTON, 1987).

O teor de proteínas do pólen varia amplamente (2,5 a 61%) de acordo com diferentes espécies de plantas e regiões, resultando em diferentes valores nutritivos para as abelhas (ROULSTON et al., 2000). Além disso, a alimentação com pólen também é um dos fatores mais importantes que influenciam a longevidade destes insetos, reduzindo a sensibilidade aos pesticidas (HAYDAK et al., 1970) e aumentando a imunidade (ALAUX et al., 2010). Já o pólen promovido de plantas transgênicas pode constituir um risco para os polinizadores, tais como abelhas, principalmente aqueles com presença de proteínas Cry no pólen (RAMIREZ-ROMERO et al., 2008).

A nocividade dos transgênicos, especialmente do milho Bt, para a alimentação das abelhas é recentemente estudada, em relação a mortalidade de determinados insetos (TREVISAN et al., 2013; NIU et al., 2013). Além disso, alguns autores também já observaram efeitos indiretos, sendo eles sociais ou ecológicos, os quais afetam a dinâmica do funcionamento e as interações presentes na colmeia (OLDROYD, 2007; RAMIREZ-ROMERO et al., 2008; BIZZOCCHI, 2014).

Assim, a exposição destes polinizadores às proteínas inseticidas Bt, contidas nos pólenes das cultivares de organismos geneticamente modificados, geram inúmeras dúvidas sobre seus reais efeitos (NIU et al., 2013). Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do pólen de milho Bt e não Bt sobre o desenvolvimento de adultos de *A. mellifera*.

MATERIAL E MÉTODOS

Híbridos de milho utilizados

O trabalho foi realizado a partir da semeadura de duas cultivares de milho: BALU 280 PRO (Bt/RR, expressando as toxinas Cry1A.105 e Cry2Ab2) e BALU 188 RR, ambas super precoces, no ano agrícola de 2015, em campo experimental da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cwa (mesotérmico úmido com verões quentes e invernos secos), com precipitação média anual de 1.500 mm e temperatura média anual de 22°C (FIETZ & FISCH, 2008).

Coleta do pólen

O pólen das plantas foi coletado durante o florescimento pleno das cultivares, através do cobrimento dos pendões com sacos de papel. Após 48 horas, os sacos foram coletados e encaminhados ao Laboratório de Entomologia da Universidade Federal da Grande Dourados para a peneiração e o armazenamento do pólen em geladeira ($\pm 4^\circ\text{C}$), segundo metodologia adaptada de Wang et al. (2007).

Colônia de abelhas e obtenção dos adultos

Os adultos foram coletados a partir de uma colmeia de *A. mellifera* exposta no campo experimental da Universidade Federal da Grande Dourados, com o auxílio de um sugador adaptado para a retirada das abelhas (Figura 1A). Foram coletadas apenas as operárias que regressavam do campo no período de 09:00 da manhã (abelhas campeiras), pois assim foi possível padronizar as idades de 20 dias (PEREIRA et al., 2003), das abelhas utilizadas no ensaio. Após retirados, os insetos foram imediatamente encaminhados ao laboratório de Entomologia Agrícola da Universidade Federal da Grande Dourados.

Bioensaio

A manutenção dos adultos em laboratório foi desenvolvida em condições adequadas de ambiente, com temperatura climatizada a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR controlada a $70 \pm 10\%$ (ROSSI et al., 2013a; ROSSI et al., 2013b).

As abelhas foram mantidas em recipientes plásticos transparentes (500 mL) com formato cilíndrico e cobertos com tecido tule de *nylon*, favorecendo a circulação do ar no ambiente simulado (Figura 1B). Os tratamentos utilizados foram aplicados através de 10 recipientes contendo 10 adultos cada. Assim, para os 14 tratamentos estudados foram utilizados 140 recipientes, totalizando-se 1400 abelhas em todo o ensaio.



FIGURA 1. Obtenção dos adultos com auxílio de sugador (A) e acomodação em recipientes plásticos preparados com as dietas (B).

Alimentação dos adultos

Foram oferecidas 14 dietas, sendo elas compostas por mel ou pasta candi. A pasta candi utilizada no experimento foi preparada através da combinação entre açúcar refinado e mel (2:1), misturados até atingirem consistência desejada.

Os tratamentos (dietas) compostos por mel foram: mel puro (Mel), dieta com 20 mg de pólen de milho da cultivar BALU 188 RR dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água (20ñBt ou M20ñBt), dieta com 40 mg de pólen de milho da cultivar não Bt dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água (40ñBt ou M40ñBt), dieta com 80 mg de pólen de milho dessa cultivar não Bt dissolvido em

1 ml de solução de mel a 10% de água (80ñBt ou M80ñBt), dieta com 20 mg de pólen de milho da cultivar BALU 280 PRO dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água (20Bt ou M20Bt), dieta com 40 mg de pólen de milho da cultivar Bt dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água (40Bt ou M40Bt), dieta com 80 mg de pólen de milho da cultivar Bt dissolvido em solução 1 ml de de mel a 10% de água (80Bt ou M80Bt).

Os tratamentos (dietas) compostos por pasta candi foram: pasta candi pura (Candi), dieta com 20 mg de pólen de milho da cultivar BALU 188 dissolvido em 1 g de pasta candi (20ñBt ou C20ñBt), dieta com 40 mg de pólen de milho da cultivar não Bt dissolvido em 1 g de pasta candi (40ñBt ou C40ñBt), dieta com 80 mg de pólen de milho dessa cultivar não Bt dissolvido em 1 g de pasta candi (80ñBt ou C80ñBt), dieta com 20 mg de pólen de milho da cultivar BALU 280 PRO dissolvido em 1 g de pasta candi (20Bt ou C20Bt), dieta com 40 mg de pólen de milho da cultivar Bt dissolvido em 1 g de pasta candi (40Bt ou C40Bt), dieta com 80 mg de pólen de milho dessa cultivar Bt dissolvido em 1 g de pasta candi (80Bt ou C80Bt).

A alimentação foi realizada uma vez por dia ao longo do experimento, através da adição de dieta artificial nos recipientes, dependendo do consumo diário.

Massa consumida e mortalidade

A massa de dieta adicionada, com o auxílio de uma seringa graduada, e os indivíduos considerados mortos, foram registrados diariamente, possibilitando a elaboração das variáveis avaliadas “massa consumida” e “mortalidade”, pois os adultos foram observados para a detecção dos possíveis danos dos tratamentos durante os dias de exposição alimentar.

Análise estatística

A partir dos dados obtidos para a massa consumida realizou-se a análise de variância e, quando observado efeito significativo, aplicou-se o teste de Duncan a 5% de probabilidade, tanto separadamente para os tratamentos compostos apenas por mel ou pasta candi, como para todas as dietas. Já para a mortalidade acumulada, o mesmo procedimento estatístico foi realizado entre todos os tratamentos estudados.

Ainda através da massa consumida, foi realizada a análise de regressão para as doses de pólen utilizadas nas dietas e, além disso, os dados de mortalidade

também foram demonstrados corrigidos conforme Abbott (1925), através da fórmula “ $Mc(\%) = [(\%Mo - \%Mt) / (100 - \%Mt)] \times 100$ ”, onde “Mc” é a mortalidade corrigida, “Mo” a mortalidade observada e “Mt” a mortalidade na testemunha.

As análises foram realizadas com o auxílio do software estatístico Assistat (SILVA e AZEVEDO, 2002) e a apresentação dos dados efetuadas através do programa gráfico estatístico SigmaPlot 13 (SYSTAT SOFTWARE, 2015).

RESULTADOS

As médias das massas consumidas pelas abelhas *A. mellifera* das dietas compostas por mel (Figura 2) e pasta candi (Figura 3), apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com a quantidade (0, 20, 40 e 80 mg) e a qualidade (Bt e não Bt) do pólen oferecido.

No que se refere à massa das dietas com mel consumida pelos adultos diariamente, observa-se que a testemunha (133,7 mg abelha⁻¹ dia⁻¹) foi estatisticamente similar a todos os tratamentos, exceto 20ñBt (104,6 mg abelha⁻¹ dia⁻¹). O maior consumo ocorreu no tratamento 40Bt (191,9 mg abelha⁻¹ dia⁻¹), quando comparado com todos os tratamentos não Bt (20, 40 e 80ñBt).

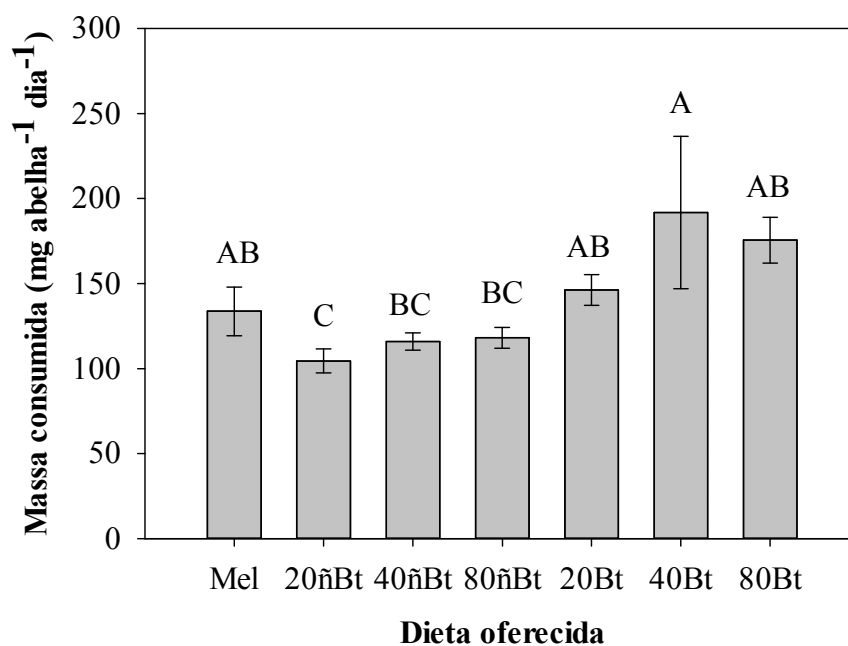


FIGURA 2. Massa consumida por adultos de abelha (*Apis mellifera*) após alimentação com diferentes dietas compostas por mel e dosagens de pólen de milho Bt e não Bt durante 14 dias. Letras diferentes sobre as colunas e barras indicam médias estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. As barras representam o erro-padrão da média.

Já para a massa consumida através das dietas composta por pasta candi, nota-se que os tratamentos que continham 20 mg de pólen (Bt e não Bt) apresentaram maior consumo (92,9 e 91,9 mg abelha⁻¹ dia⁻¹, respectivamente) que a

dieta com 80 mg de pólen não Bt (65,8 mg abelha⁻¹ dia⁻¹). Além disso, observa-se que o alimento controle foi consumido, semelhante a todos os tratamentos (Figura 3).

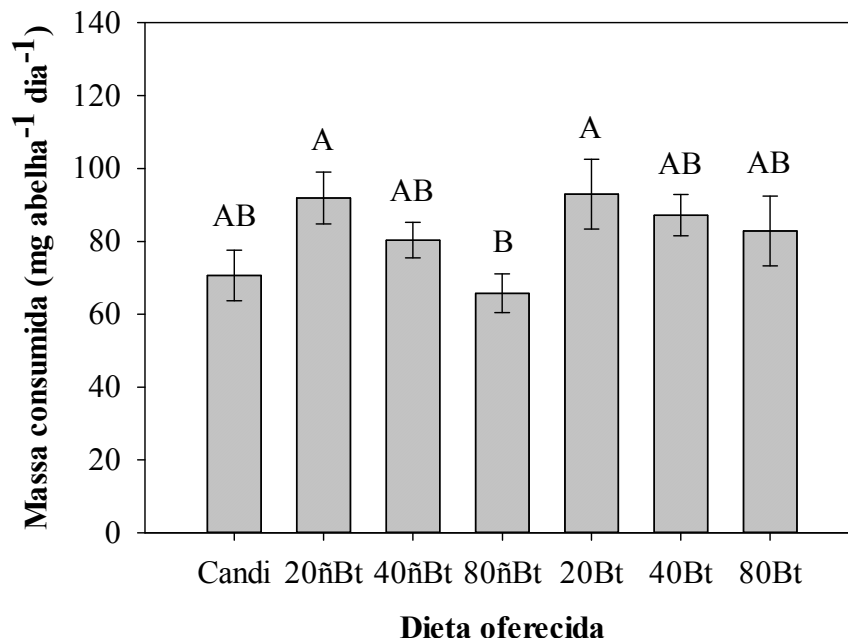


FIGURA 3. Massa consumida por adultos de abelha (*Apis mellifera*) após alimentação com diferentes dietas compostas por pasta candi e dosagens de pólen de milho Bt e não Bt durante 14 dias. Letras diferentes sobre as colunas e barras indicam médias estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. As barras representam o erro-padrão da média.

Levando-se em consideração todos os tratamentos estudados, nota-se que as dietas compostas por mel apresentaram os maiores consumos, quando comparadas aquelas compreendidas por pasta candi, independentemente da quantidade (0, 20, 40 e 80 mg) e da qualidade (Bt e não Bt) do pólen oferecido (Figura 4).

Os resultados das análises de regressões, no que se refere à massa consumida pelas abelhas, não foram significativos ($p > 0,05$) para as dietas compostas por mel, independentemente da transgenia do pólen (Figura 5), e para pasta candi com pólen Bt (Figura 6B), de acordo com as dosagens de pólen utilizadas nas dietas. As médias do consumo desses tratamentos, que não se ajustaram significativamente a nenhum modelo de regressão, ficaram em 118,09; 161,87 e 83,42 mg abelha⁻¹ dia⁻¹, para os tratamentos compostos por mel e pólen não Bt (Figura 5A), mel e pólen Bt (Figura 5B) e pasta candi e pólen Bt (Figura 6B), respectivamente.

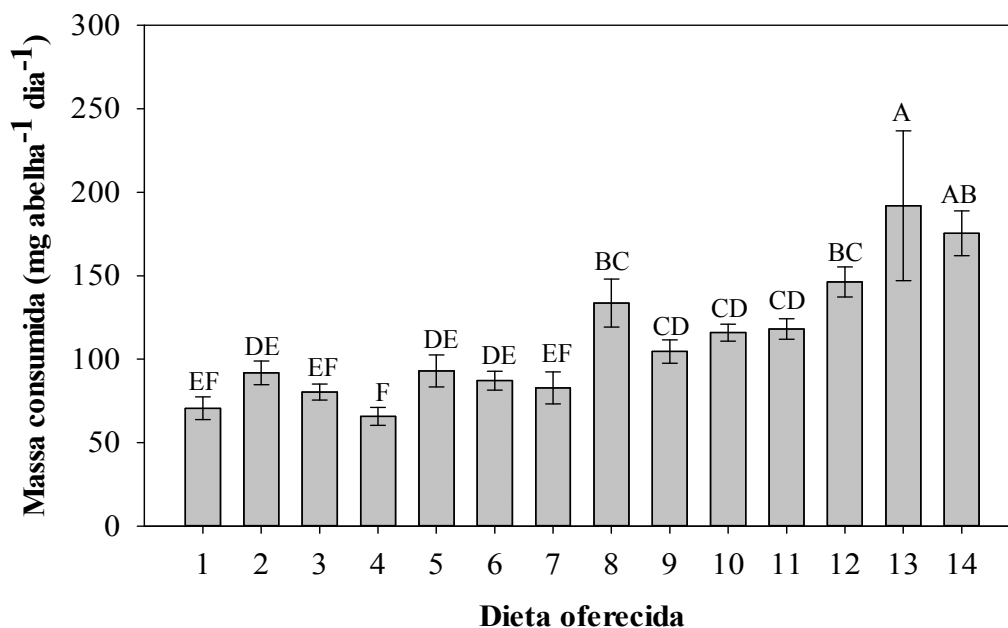


FIGURA 4. Massa consumida por adultos de *Apis mellifera* após alimentação com diferentes dietas e dosagens de pólen de milho Bt e não Bt. Letras diferentes sobre as colunas e barras indicam médias estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Duncan ao nível de 1% de probabilidade. As barras representam o erro-padrão da média. 1: pasta candi. 2, 3 e 4: dieta com 20, 40 e 80 mg, respectivamente, de pólen de milho da cultivar BALU 188 dissolvido em 1 g de pasta candi. 5, 6 e 7: dieta com 20, 40 e 80 mg, respectivamente, de pólen de milho da cultivar BALU 280 PRO dissolvido em 1 g de pasta candi. 8: mel. 9, 10 e 11: dieta com 20, 40 e 80 mg, respectivamente, de pólen de milho da cultivar BALU 188 dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água. 12, 13 e 14: dieta com 20, 40 e 80 mg, respectivamente, de pólen de milho da cultivar BALU 280 PRO dissolvido em 1 ml de solução de mel a 10% de água.

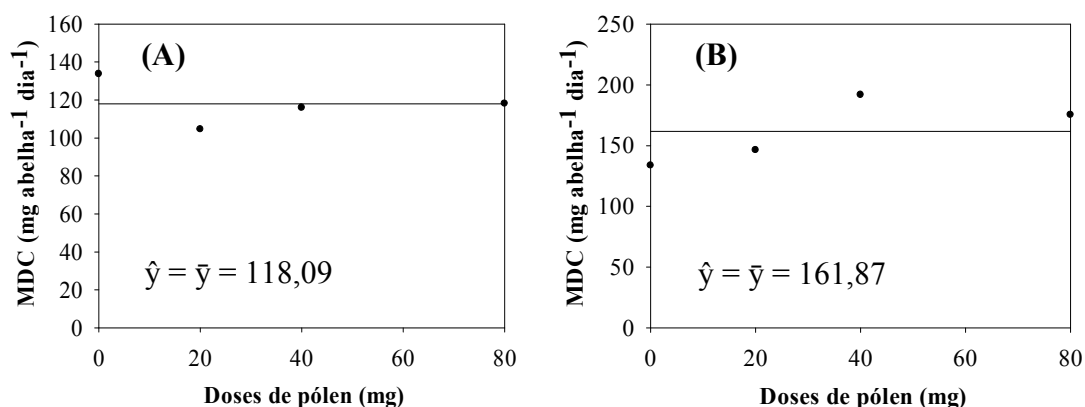


FIGURA 5. Massa de dieta consumida (MDC) por adultos de abelha (*Apis mellifera*) após alimentação com diferentes doses de pólen [0, 20, 40 e 80 mg de pólen de milho da cultivar BALU 188 (A) e BALU 280 PRO (B)] em solução de mel a 10% de água durante 14 dias.

Já para a pasta candi com pólen não Bt, os resultados foram altamente significativos ($p < 0,01$), pois observa-se efeito quadrático positivo das dosagens de pólen sobre a massa consumida e, segundo o modelo estimado, o maior consumo ($86,45 \text{ mg abelha}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) foi obtido na dosagem de $34,85 \text{ mg}$ de pólen na dieta (Figura 6A).

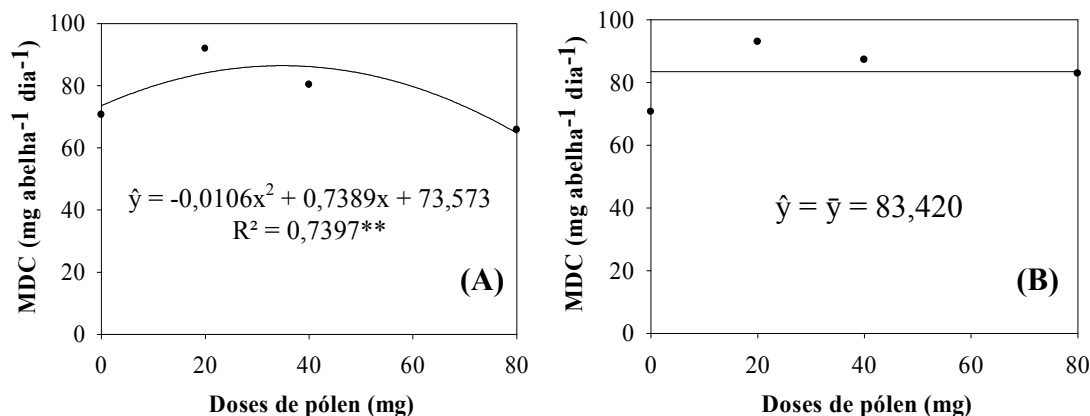


FIGURA 6. Massa de dieta consumida (MDC) por adultos de abelha (*Apis mellifera*) após alimentação com diferentes doses de pólen [0, 20, 40 e 80 mg de pólen de milho da cultivar BALU 188 (A) e BALU 280 PRO (B)] em pasta candi durante 14 dias. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Considerando a mortalidade acumulada dos adultos, observa-se que durante os seis primeiros dias, exceto o terceiro, de consumo das dietas, o tratamento M80Bt apresentou maior mortalidade que os tratamentos M20nãoBt e M40nãoBt (Tabela 1). Esse tratamento (M80Bt) também foi o primeiro tratamento a apresentar a mortalidade total (100% aos seis dias de consumo). Não houve diferença significativa entre os tratamentos no sétimo, oitavo, décimo terceiro e décimo quarto dias do estudo. Já ao nono dia, o tratamento M20nãoBt esteve semelhante apenas ao M40nãoBt e abaixo dos demais; no entanto, durante os dois dias subsequentes, apresentou-se com a menor mortalidade acumulada, quando comparado aos demais tratamentos. Já os resultados com pasta candi, nota-se que os tratamentos compostos com pólen Bt, durante os sete primeiros dias do estudo, exceto o primeiro, apresentaram no mínimo uma média superior aos tratamentos que continham pólen não Bt. Além disso, as combinações “pasta candi + pólen Bt” e “pasta candi + pólen não Bt”, representadas a partir de todas as concentrações de pólen, apresentaram mortalidade total no oitavo e décimo dia, respectivamente (Tabela 1).

TABELA 1. Mortalidade acumulada (%) de adultos de *Apis mellifera* após alimentação com diferentes dietas (mel e pasta candi) e dosagens de pólen de milho Bt e não Bt. Dourados, MS. 2016.

Tratamentos	Dias após o início da alimentação													
	1	2	3	4	5	6	7 ^{ns}	8 ^{ns}	9	10	11	12	13 ^{ns}	14 ^{ns}
	----- Mortalidade acumulada (%) -----													
Mel	11,9 ab	19,7 bc	33,1 ab	72,3 a	93,0 a	97,2 ab	100,0	100,0	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0	100,0
M20ñBt	4,1 b	11,0 bc	21,9 bc	49,3 c	70,3 d	87,8 c	94,0	95,0	95,0 c	96,0 b	97,0 b	97,0 b	99,0	100,0
M40ñBt	3,5 b	4,6 d	28,2 ab	51,0 c	68,9 d	88,0 c	96,6	96,6	96,6 bc	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0	100,0
M80ñBt	11,0 ab	12,0 bc	30,0 ab	59,9 ab	77,7 bc	91,9 ab	95,0	97,9	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0	100,0
M20Bt	9,3 ab	14,5 bc	42,0 a	72,8 a	88,8 ab	96,8 ab	99,0	99,0	99,0 ab	99,0 a	99,0 a	99,0 a	99,0	100,0
M40Bt	12,7 ab	20,7 b	42,7 a	68,5 ab	90,1 ab	99,0 ab	99,0	100,0	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0	100,0
M80Bt	17,6 a	31,9 a	37,3 ab	69,8 ab	89,2 ab	100,0 a	100,0	100,0	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0	100,0
Candi	2,9 b	7,2 cd	13,4 de	36,5 d	85,2 ab	91,3 ab	95,3	97,2	99,1 ab	99,1 a	100,0 a	100,0 a	100,0	100,0
C20ñBt	3,0 b	11,9 bc	20,9 bc	35,7 d	70,4 d	89,1 c	97,0	97,0	99,0 ab	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0	100,0
C40ñBt	2,0 b	4,8 d	12,9 e	35,3 d	69,8 d	90,1 bc	94,1	95,1	98,1 ab	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0	100,0
C80ñBt	4,8 b	10,6 bc	17,3 cd	32,9 d	72,2 d	88,5 c	96,3	97,3	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0	100,0
C20Bt	11,7 ab	19,7 bc	26,6 ab	53,5 c	76,1 cd	90,1 bc	97,0	100,0	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0	100,0
C40Bt	10,2 ab	19,3 bc	29,4 ab	57,8 bc	94,0 a	95,0 ab	100,0	100,0	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0	100,0
C80Bt	11,8 ab	19,5 bc	22,4 bc	52,8 c	76,2 cd	93,2 ab	99,0	100,0	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0	100,0

Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. ^{ns}: não significativo.

A partir dos dados da mortalidade corrigida, diariamente comparada com o controle, mel (Figura 7) e pasta candi (Figura 8), nota-se que todos os tratamentos apresentaram uma semelhante tendência dos dados, apresentando variações temporais próximas entre os dias estudados. Já para as variações entre os tratamentos, observando-se individualmente cada dia estudado, as oscilações foram menores e mais irregulares, dependendo do dia avaliado (Figura 7 e 8).

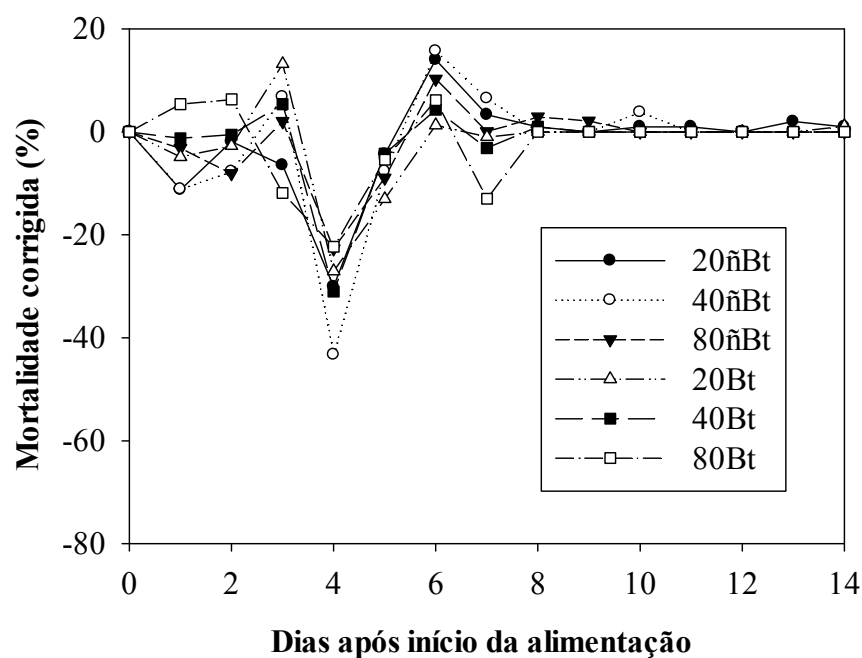


FIGURA 7. Mortalidade corrigida (%) de adultos de abelha (*Apis mellifera*) após alimentação com diferentes dietas compostas por mel e dosagens de pólen de milho Bt e não Bt durante 14 dias.

No caso dos tratamentos compostos por mel (Figura 7), observa-se uma queda no quarto dia, sendo que todos os tratamentos apresentaram valores negativos, isso porque 39,2% dos adultos alimentados por mel (testemunha) morreram entre o terceiro e o quarto dia. O mesmo ocorreu com os tratamentos contendo pasta candi (Figura 8); no entanto, durante o quinto dia, pois entre o quarto e o quinto dia 48,7% dos indivíduos alimentados com a testemunha (pasta candi) sem pólen também morreram (Tabela 1), o que justifica os valores obtidos de mortalidade corrigida (Figura 8).

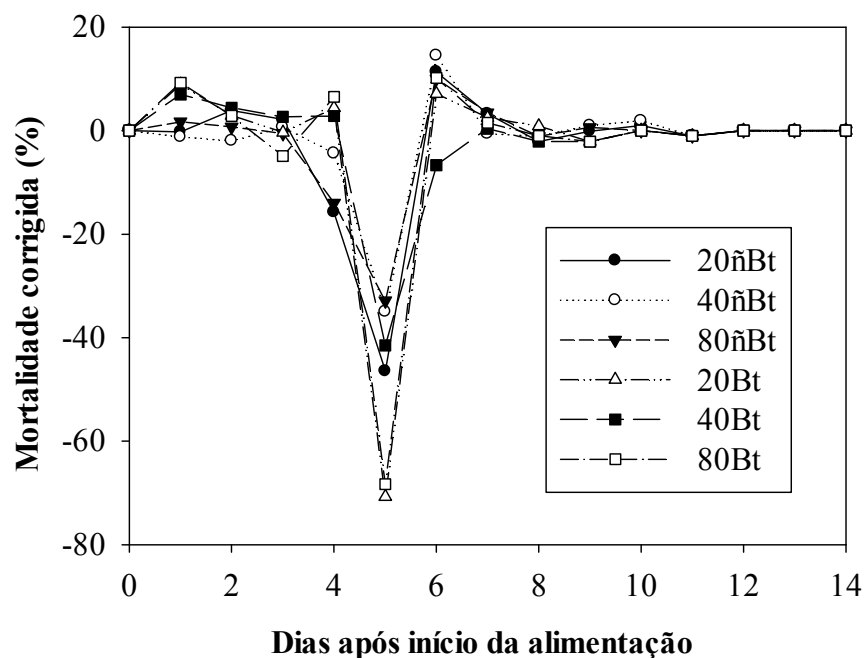


FIGURA 8. Mortalidade corrigida (%) de adultos de abelha (*Apis mellifera*) após alimentação com diferentes dietas compostas por pasta candi e dosagens de pólen de milho Bt e não Bt durante 14 dias.

Assim, a partir dos resultados obtidos com todos os tratamentos, infere-se que após 3 a 5 dias de exposição alimentar, os adultos de abelhas são afetados pela escassez de pólen na dieta, apresentando elevada mortalidade.

DISCUSSÃO

Ao analisar os dados obtidos para a massa de dieta consumida, observa-se que não houve nenhuma influência relacionada com a origem (Bt e não Bt) ou a quantidade de pólen utilizada na alimentação (20, 40 e 80 mg). Entretanto, nota-se que as abelhas alimentadas com mel (com ou sem pólen) apresentaram maior consumo de dieta que as abelhas alimentadas com pasta candi (com ou sem pólen), o que demonstra que a quantidade consumida é determinada principalmente pela fonte energética disponível, sendo a qualidade proteica considerada um complemento para o seu desenvolvimento. As abelhas mais velhas podem sobreviver apenas com uma dieta energética, no entanto, o pólen é essencial para as crias mais jovens, podendo limitar o crescimento (CREMONEZ, 2001).

Segundo Ramirez-Romero et al. (2008), estudando os efeitos que as abelhas teriam após se alimentarem com a proteína isolada durante 12 dias, concluíram que os insetos alimentados com dieta contendo pólen Bt demoraram um tempo significativamente maior para consumir o alimento fornecido, semelhantemente ao que aconteceu com abelhas alimentadas com dieta contaminada com imidacloprid, em comparação com o grupo controle. Desta forma, este estudo demonstra alterações no comportamento de alimentação, indicando um efeito antialimentar, o que ainda não pode ser explicado pelos atuais mecanismos de ação das proteínas Cry conhecidos em insetos. Entretanto, embora não estudado, existe a possibilidade da proteína Cry ter causado lesões no intestino das abelhas e, posteriormente, interrompido a absorção de alimentos, como já relatado em insetos sensíveis, como *Ostrinia nubilalis* (Hübner 1796), *Manduca sexta* (Linnaeus, 1763), *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758), *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824, *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758), *Choristoneura fumiferana* e *Bombyx mori* L. (SCHNEPF et al., 1998).

No que se refere à mortalidade acumulada, com relação aos tratamentos compostos por mel e pólen Bt, principalmente entre as maiores dosagens (40 ou 80 mg), observa-se uma mortalidade maior e mais precoce quando comparado com as menores dosagens de pólen não Bt (20 mg, principalmente) em dieta composta por mel, exceto a testemunha (sem pólen). De maneira geral, mesmo que apenas numericamente em algumas situações, os adultos de abelhas alimentados com pasta candi também foram afetados negativamente pelo pólen do milho Bt, quando comparado com o não Bt.

Segundo Bizzocchi (2014), o consumo de dietas contendo pólen de culturas transgênicas (Bt) pode estar contribuindo com o desaparecimento das abelhas, o chamado distúrbio do colapso das colônias (em inglês, Colony Collapse Disorder, CCD), no entanto, são escassos os trabalhos que relacionam este acontecimento com a mortalidade destes polinizadores a partir da ingestão das proteínas Cry. Malone et al. (1999) relataram que a toxina produzida pela proteína Bt diminuiu o tempo de sobrevivência de abelhas que foram alimentadas com dieta contendo proteína Cry1Ac, ou seja, a mortalidade dos insetos foi adiantada. No entanto, Lima et al. (2011) não verificaram relação entre a origem do pólen e o tempo de desenvolvimento, peso e tamanho de indivíduos adultos. Ainda, Lipinski et al. (2008) e Ramirez-Romero et al. (2008) também verificaram em seus estudos que

a proteína não causou efeitos letais e impactos significativos sobre operárias de *A. mellifera*; segundo Lipinski et al. (2008), houve um ligeiro aumento da mortalidade das larvas na dieta diluída e, segundo Ramirez-Romero et al. (2008), a exposição ao alimento contaminado com a maior dosagem de Cry1Ab causou alterações comportamentais nos insetos estudados.

Vale ressaltar, ainda, que mesmo que as plantas Bt não ocasionem impactos diretos às abelhas, podem gerar inúmeros danos indiretos, conforme já relatado por alguns autores. Os resultados do trabalho de Bizzocchi (2014) demonstram que o pólen Bt que expressa a proteína Cry1F possui impactos subletais na abelha (*A. mellifera*), reduzindo o comportamento higiênico das colônias e aumentando a infestação do ácaro *Varroa destructor* (Anderson & Trueman, 2000) em abelhas adultas. Além disso, Oldroyd (2007) verificou que apesar de o pólen Bt não apresentar danos à mortalidade de abelhas, a sua presença pode causar algum grau de estresse que, de alguma maneira, deixa as abelhas mais suscetíveis à ação de diversos patógenos, como bactérias, ácaros ou vírus.

Existe uma grande escassez de experimentos a serem realizados para analisar os efeitos da proteína Cry sobre esses insetos benéficos, sendo necessário novos estudos que avaliem os possíveis danos diretos e indiretos, tanto à nível de laboratório como à campo, garantindo assim a nossa segurança ambiental.

Nossos resultados demonstram que as plantas transgênicas podem afetar a mortalidade das abelhas, visto que contribui para a mortalidade antecipada dos indivíduos que se alimentam de pólen das plantas Bt.

CONCLUSÕES

Adultos de abelhas *Apis mellifera* se alimentam mais de dietas compostas por solução de mel, quando comparado com pasta candi.

A mortalidade é precoce e, além disso, adiantada, quando acontece o consumo de elevadas doses de pólen de milho, sendo os efeitos mais evidentes naqueles que apresentam a tecnologia Bt.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, n. 2, p. 265-266, 1925.
- ALAUX, C.; DUCLOZ, F.; CRAUSER, D.; LE CONTE, Y. Diet effects on honeybee immunocompetence. **Biology Letters**, v. 6, n. 4, p. 562–565, 2010.
- BIZZOCCHI, L. **Avaliação dos impactos do pólen de milho geneticamente modificado (Bt) sobre colônias de *Apis mellifera* L.** 2014. 66f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. Florianópolis, 2014.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, quinto levantamento safra 2014/2015.** Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 05 out. 2015.
- CRAILSHEIM, K. The protein balance of the honey bee worker. **Apidologie**, v. 21, n. 5, p. 417–429, 1990.
- CREMONEZ, T. M. **Influencia da nutrição sobre aspectos da fisiologia e nutrição de abelhas *Apis mellifera*.** 2001. 87f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia Ciência e Letras (Universidade de São Paulo). Programa de Pós-Graduação em Entomologia. Ribeirão Preto, 2001.
- FIETZ, C. R.; FISCH, G. F. **O clima na região de Dourados, MS.** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. 32p.
- HANLEY, A.; HUANG, Z.; PETT, W. Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. **Journal of Apicultural Research**, v. 42, n. 4, p. 77-81, 2003.
- HAYDAK, M. H. Honey bee nutrition. **Annual Review of Entomology**, v. 15, n. 1, p. 143-156, 1970.
- ISAAA. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. **Biotech Information Resources: ISAAA Publications.** 2015. Disponível em: <<http://www.isaaa.org/>>. Acesso em: 15 nov. 2015.
- LIPINSKI, Z.; FARJAN, M.; ŻOLTOWSKA, K.; POLACZEK, B. Effects of Dietary Transgenic *Bacillus thuringiensis* Maize Pollen on Hive Worker Honeybees. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 17, n. 6, p. 957-961, 2008.
- LIMA, M. A. P.; PIRES, C. S. S.; GUEDES, R. N. C.; NAKASU, E. Y. T.; LARA, M. S.; FONTES, E. M. G.; SUJII, E. R.; DIAS, S. C.; CAMPOS, L. A. O. Does Cry1Ac Bt-toxin impair development of worker larvae of Africanized honey bee. **Journal of Applied Entomology**, v. 135, n. 6, p. 415–422, 2011.

MALONE, L., PHAM-DÈLÈGUE, M. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). **Apidologie**, v. 32, n. 4, p. 287-304, 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**, v. 30, n. 6, p. 465–473, 1999.

NIU, L.; MA, Y.; MANNAKKARA, A.; ZHAO, Y.; MA, W.; LEI, C.; CHEN, L. Impact of Single and Stacked Insect-Resistant Bt-Cotton on the Honey Bee and Silkworm. **Plos One**, v. 8, n. 9, p. 1-9, 2013.

OLDROYD, B. P. What's Killing American Honey Bees? **PLoS Biology**, v. 5, n. 6, p. 1195-1199, 2007.

PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; CAMARGO, R. C. R.; VILELA, S. L. O. **Produção de mel**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2003. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/>>. Acesso em: 23 jan 2016.

RAMIREZ-ROMERO, R.; DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; CHAFFIOL, A.; PHAM-DELÈGUE, M. Does Cry 1Ab protein affect learning performances of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, n. 2, p. 327-333, 2008.

ROSSI, C. A.; ROAT, T. C.; TAVARES, D. A.; CINTRA-SOCOLOWSKI, P.; MALASPINA, O. Brain morphophysiology of africanized bee *Apis mellifera* exposed to sublethal doses of imidacloprid. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 65, n. 2, p. 234-243, 2013a.

ROSSI, C. A.; ROAT, T. C.; TAVARES, D. A.; CINTRA-SOCOLOWSKI, P.; MALASPINA, O. Effects of sublethal doses of imidacloprid in malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 5, p. 552–558, 2013b.

ROULSTON, T. H.; CANE, J. H.; BUCHMANN, S. L. What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen pistil interactions, or phylogeny? **Ecological Monographs**, v. 70, n. 4, p. 617-643, 2000.

SABUGOSA-MADEIRA, J. B.; ABREU, I.; RIBEIRO, H.; CUNHA, M. Bt transgenic maize pollen and the silent poisoning of the hive. **Journal of Apicultural Research**, v. 46, n. 1, p. 57-58, 2007.

SABUGOSA-MADEIRA, B.; ABREU, I. O pólen de milho geneticamente modificado: possíveis implicações no desequilíbrio ecológico das colmeias. **Revista Real Academia Galega de Ciências**, v. 28, n. 1, p. 71-85, 2009.

SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D.R., DEAN, D.H. *b.ç.* **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775–806, 1998.

SILVA, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.

SYSTAT SOFTWARE. **SigmaPlot 13**: The simplest way to analyze e create graphs. 2015. Disponível em: <<http://www.sigmaplot.com/products/sigmaplot>>. Acesso em: 10 dez 2015.

TREVISAN, H.; AGUIAR, A.; SABUGOSA-MADEIRA, B.; CARVALHO, A. G.; ABREU, I. Analysis the effect pollen from insect-resistant transgenic corn on the development of *Galleria mellonella* (Fabricius, 1754) (Lepidoptera, Pyralidae) and possible ecological consequences. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 4, p. 796-804, 2013.

WANG, Z.; WU, Y.; HE, K.; BAI, S. Effects of transgenic Bt maize pollen on longevity and fecundity of *Trichogramma ostriniae* in laboratory conditions. **Bulletin of Insectology**, v. 60, n. 1, p. 49-55, 2007.

WINSTON, M. L. **The Biology of the Honey Bee**. Massachusetts: Harvard University Press, 1987. 281p.