

Leon Bizzocchi

**Avaliação Dos Impactos Do Pólen De Milho Geneticamente Modificado (Bt) Sobre Colônias De
*Apis Mellifera L.***

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais. Orientador: Afonso Inácio Orth. Co-orientador: Rubens Onofre Nodari.

Florianópolis
2014

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

Bizzocchi, Leon
Avaliação Dos Impactos Do Pólen De Milho Geneticamente
Modificado (Bt) Sobre Colônias De Apis Mellifera L. / Leon
Bizzocchi ; orientador, Afonso Inácio Orth ;
coorientador, Rubens Onofre Nodari. - Florianópolis, SC,
2014.
66 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Insetos
polinizadores. 3. Sanidade Apícola. 4. Biossegurança de
OGMs. I. Orth, Afonso Inácio . II. Nodari, Rubens Onofre.
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

À Isabela Vieira Bizzocchi e Pâmela Martins Vieira
Ofereço

A meu pai Alberto Bizzochi Filho e
meu avo Alberto Bizzocchi *in memoriam*,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina pela minha formação acadêmica, e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, por ter me proporcionado um grande crescimento profissional e pessoal.

Agradeço ao Center of Biosafety – GENOK pelo apoio financeiro ao projeto em colaboração.

Agradeço aos companheiros do programa, em especial aos amigos Andre Sezerino e Diana Diaz, pelo conhecimento repassado, e pela ajuda na construção deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Afonso Inácio Orths pelo apoio e pela oportunidade de realizar meu mestrado.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari, pelo apoio, pelo conhecimento repassado, pela confiança, pela ajuda nos momentos difíceis, e principalmente pela amizade.

Agradeço a todos meus amigos que de alguma forma contribuíram no decorrer desta etapa.

A toda minha família, a minha vo Cecília, minha mãe, minha tia Silvia, e especialmente a minha tia Miriam, por ter me ensinado a ser uma pessoa digna e responsável, por estar sempre torcendo por mim e por ter me ajudado muito na realização das análises estatísticas.

Agradeço a família Martins, especialmente a minha vo Nila.

À minha filha Isabela por ser a pessoa mais importante da minha vida e por me fortalecer todos os dias.

E por fim um agradecimento especial a Pâmela Martins Vieira, pela companhia, pela compreensão e por estar ao meu lado sempre.

RESUMO

Estudos que abordam os efeitos de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) sobre a abelha *Apis mellifera* em sua maioria avaliam os efeitos letais por meio de análises laboratoriais com larvas ou abelhas adultas individualmente, as quais são alimentadas com proteína Cry purificada ou pólen Bt. Poucos estudos avaliam os efeitos subletais dos OGMs sobre as abelhas, especialmente os relacionados com a sanidade apícola. O objetivo deste trabalho foi avaliar os eventuais efeitos da alimentação com pólen de milho Herculex® (Evento TC1507) sobre o desenvolvimento das colônias e sobre a sanidade apícola de *A. mellifera*. Para tanto foram analisados: o comportamento higiênico das abelhas (CH); a infestação de ácaro *Varroa destructor* e do fungo *Nosema ceranae*; o desenvolvimento das colônias e a detecção da presença da proteína Cry1F no pólen e nas larvas. O experimento foi realizado no mês de março de 2014 em um apiário localizado no município de Florianópolis –SC-BR. Ao todo foram utilizadas 20 colméias tipo Langstroth. Utilizou-se pólen do milho Herculex, que expressa a proteína Cry1F, e de sua respectiva linha isogênica, plantados na Fazenda da Ressacada - UFSC. O experimento continha quatro tratamentos: alimento contendo pólen Bt, alimento contendo pólen da linha isogênica, alimento não contendo pólen, e testemunha. Para a avaliação das variáveis foram utilizadas as técnicas de perfuração de células de crias operculadas para o comportamento higiênico, contagem de ácaros em abelhas operárias adultas, contagem de esporos de *Nosema ceranae* em abelhas adultas utilizando câmara de Neubauer (hemocitômetro), avaliação da quantidade de quadros de mel, pólen, crias e quadros com cera alveolada para avaliação do desenvolvimento da colônia. Por fim, foi realizada a detecção e quantificação da proteína Cry1F presente no pólen e nas larvas utilizando a técnica Western Blotting. Em relação ao comportamento higiênico, as colônias alimentadas com pólen Bt registraram a menor porcentagem de retirada de larvas mortas (83%) em relação àquelas alimentadas com os demais alimentos ($P < 0,05$). Colônias alimentadas com pólen do milho Bt demonstraram maior infestação de *V. destructor*. Não foram verificadas diferenças significativas em relação ao desenvolvimento das colônias e à infestação e *N. ceranae*. Foi verificada a presença da proteína Cry1F em todas as amostras de larvas das colônias que receberam alimento contendo pólen Bt. A metodologia empregada no presente trabalho, incluindo a metodologia para amostragem, desenho experimental, fornecimento de alimento e procedimentos para análise dos fatores, mostrou-se eficiente para avaliar os possíveis efeitos subletais sobre as abelhas e os possíveis impactos dos OGMs sobre a sanidade apícola.

Palavras-chaves:, Abelha, comportamento higiênico, *Varroa destructor*, Nosemose, , transgênico, efeitos subletais, Cry1F.

ABSTRACT

Studies about the effects of genetically modified organisms (GMOs) the honeybee *Apis mellifera* mostly evaluate lethal effects by means of laboratory testing with larvae or adult bees individually, which are fed with purified protein Cry or Bt pollen. Very few studies assess the sublethal effects of GMOs on bees, especially those related to apiculture health. In this context, the aim of this study was to evaluate the possible effects of feeding with Bt corn pollen (event TC1507, commercially known as Herculex) on the development of the colonies and about the sanity of bee *A. mellifera*. For both were analyzed: the hygienic behavior of the bees (CH); the infestation of *Varroa destructor* mite and *Nosema ceranae*; the development of the colonies and the presence of Cry1F protein in the pollen and larvae. The experiment was accomplished in March 2014 in an Apiary located in the municipality of Florianópolis. In all, was use 20 beehives of type Langstroth. We used corn pollen Herculex, which expresses the Cry1F protein, and its respective key isogenic line, planted at Fazenda da Ressacada-UFSC. The experiment contained four treatments, being they: food containing Bt pollen, food containing isogenic line pollen, food containing no pollen, and witness treatment. Drilling techniques cell operculated pups for analysis of hygienic behavior, counting mites on adult worker bees, counting *Nosema ceranae* spores in adult bees using a Neubauer cam (hemocytometer), evaluation of the amount frames of honey, pollen, operculated create and larvae cells and frames with beeswax to evaluate development of the colony, and finally, the detection and quantification of Cry1F protein present in pollen and larvae using Western Blotting. Significant differences ($P < 0.05$) were found in relation to hygienic behavior and *V. destructor* mite infestation. Regarding the hygienic behavior, colonies fed with Bt pollen had the lowest percentage of removal of dead larvae (83%) compared to those fed other diets. As for *V. destructor*, Bt pollen fed colonies obtained greater infestation, and those subjected to the other treatments no difference. No significant differences were observed in relation to the development of the colonies and the infestation and *n. ceranae*. It was verified the presence of Cry1F protein in all samples of larvae of the colonies that received food containing Bt pollen. The methodology employed in this work, including the methodology for sampling, experimental design, supply of food and procedures for analysis of factors, has proved efficient to assess the possible sublethal effects on bees and possible impacts of GMOs on the apiculture health.

Keywords: HoneyBees, hygienic behaviour, *Varroa destructor*, *Nosema ceranae*, genetically modified organisms, sublethal effects, Cry1F.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Colônias de <i>A. mellifera</i> logo após sua transferência para colméias tipo Langstroth (a); colméias prontas para realização dos experimentos (b).....	29
Figura 2 - Plantio de milho Bt para realização da coleta de pólen (a); Inflorescências masculinas de milho ensacadas para a realização da coleta do pólen (b); Pólen do milho Herculex® (Evento TC1507) (c), e pólen de milho da linha isogênica (d).	30
Figura 3 - Colméia com coletor de pólen instalado sobre o alvado (a), colméia sem o coletor de pólen (b). A seta demonstra o coletor de pólen instalado.	31
Figura 4 - Gel desnaturantes de poliacrilamida de 0,75 mm de espessura para realização de SDS-PAGE (a). corrida de amostras em gel de poliacrilamida em sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® (b); Transferência semi-seca de proteínas em sistema eletroforese vertical Mini-PROTEAN (c); fotodocumentador ChemiDoc™ MP System (d); utilização do programa ImageLab 4.1 da BIO-RAD (e).....	36
Figura 5 - Amostra de larvas de <i>A. mellifera</i> (a), pupas de <i>A. mellifera</i> maceradas em tampão de extração (b), amostra macerada mantida em gelo (c).	37
Figura 6 - Perfuração de células de crias operculadas para a realização da avaliação do comportamento higiênico de <i>A. mellifera</i> (a), Área do favo contendo 100 células de cria operculada perfuradas (b) A seta indica célula operculada perfurada.	38
Figura 7 - Coleta de abelhas operarias aderidas aos quadros para a realização da avaliação de infestação por <i>Varroa</i> (a), abelhas em recipiente branco após a separação dos ácaros. A seta demonstra a presença dos ácaros (b).....	39
Figura 8 - Amostras de abelhas <i>A. mellifera</i> em solução de formol a 4% para análise de incidência de Nosemose.	40
Figura 9 - Amostra de 60 abelhas <i>A. mellifera</i> (a), abdomens separados do tórax das abelhas (b), aplicação do macerado dos abdomens em câmara de Neubauer (c), visualização dos esporos de <i>Nosema ssp</i> a partir de microscopia (d).	41
Figura 10 - Visualização de população de abelhas <i>A. mellifera</i> sobre os quadros (a), quadro contendo favo de crias operculadas(b). abelhas aderidas a quadro de mel (c); quadro contendo favo de mel (d).	42
Figura 11 - Área de células perfuradas e totalmente limpas pelas abelhas que não receberam alimento com pólen de milho Bt (a), área de células perfuradas e com menor porcentagem de retirada de larvas mortas pelas abelhas alimentadas com pólen de milho Bt (b).....	44
Figura 12 - Alimentador de colméia que recebeu alimento com levedura de cerveja e PTS apresentando resto de alimento, a seta demonstra os resíduos sólidos (a), Alimentador de colméia que recebeu alimento contendo pólen de milho Bt sem resíduos de alimento (b).....	48
Figura 13 - Detecção de proteína Cry1F em larvas de <i>A. mellifera</i> em gel SDS-PAGE. A seta indica as amostras de larvas apresentando a proteína Cry1F.	49
Figura 14 - Pólen do milho da linha isogênica não apresentando proteína Cry1F (a) Detecção de proteína Cry1F no pólen do milho Herculex® (b).....	50
Figura 15 - Extratos de pólen de milho Bt e sua respectiva linha isogênica em gel SDS-PAGE em filme com 1min e 30s de exposição.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem média de comportamento higiênico (%) em colônias de <i>A. mellifera</i>	45
Tabela 2 – Numero médio (n) de acaro <i>Varroa destructor</i> por abelha adulta da espécie <i>A. mellifera</i>	46
Tabela 3 – Numero médio de esporos de <i>Nosema ssp</i> por abelha adulta da espécie <i>A. mellifera</i>	46
Tabela 4 – Numero médio de favos contendo crias (larvas e pupas) em colônias de <i>A. mellifera</i> . .	47
Tabela 5 – Numero médio de favos contendo pólen armazenado em colônias de <i>A. mellifera</i>	47
Tabela 6 – Numero médio de favos contendo mel (operculado) em colônias de <i>A. mellifera</i>	48
Tabela 7 – Numero médio de quadros contendo cera alveolada em colônias de <i>A. mellifera</i>	48

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ABPV - vírus da paralisia aguda de abelhas
ANOVA – análise da variância
Bt – *Bacillus thuringiensis*
CAPS – ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfônico
CCD - Colony Collapse Disorder
CH - Comportamento higiênico
CHAPS - 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1- propanesulfonate
cm - centímetro
CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
CV – coeficiente de variação
DCC - Desordem do Colapso de Colônias
DTT - 1,4- dithiothreitol
DWV – Deformed Wing Virus (Virus que deforma as asas)
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
g - grama
GM – geneticamente modificado
IVV – Índice de infestação de Varroa
h – hora
HCl – ácido clorídrico
KBV - vírus de abelhas Kashmir
KCl – cloreto de potássio
M – molar
m/v – massa por volume
MgCl – cloreto de magnésio
min – minuto
mL - mililitros
mm - milímetro
NaCl – cloreto de sódio
Não-Bt – que não expressa a toxina de *Bacillus thuringiensis*
OGM – organismo geneticamente modificado
PBS – tampão fosfato-salino
PBT – tampão fosfato-salino com Tween 20
PCR – reação em cadeia da polimerase
pH – potencial hidrogeniônico
PMSF – fluoreto de fenil metil sulfonil
PTS- Proteína Texturizada de Soja
s - segundo
SDS – dodecil sulfato de sódio
Tris - tris(hidroximetil)aminometano
ug – micrograma
v/v – volume por volume

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS.....	13
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. Distúrbio do Colapso das Colônias.....	19
2.2. Milho geneticamente modificado Bt.....	20
2.3. Ação inseticida de organismos geneticamente modificados em insetos não-alvo.....	21
2.4. Comportamento higiênico.....	23
2.5. Varroa destructor.....	24
2.6. Nosemose.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. Objetivo Geral.....	27
3.2. Objetivos Específicos.....	27
3.3. Hipótese Geral.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. Implantação do Experimento.....	29
4.1.1. Desenho experimental.....	31
4.2. Preparo do alimento protéico.....	32
4.3. Fornecimento do alimento protéico para as abelhas.....	32
4.4. Detecção e quantificação da proteína Cry1F no pólen.....	33
4.4.1. Extração da proteína Cry1F do pólen.....	33
4.4.2. Método Western Blotting 1D.....	33
4.4.3. SDS-PAGE.....	33
4.4.4. Transferência semi-seca de proteínas em membrana de nitrocelulose.....	34
4.4.5. Imuno-detecção da proteína com anticorpos específicos.....	35
4.5. Análise da presença da proteína Cry1F em larvas de A. mellifera.....	36
4.6. Avaliações nas colméias.....	37
4.6.2. Análise de comportamento higiênico.....	37
4.6.3. Avaliação de presença de ácaros Varroa.....	39
4.6.4. Avaliação de incidência de Nosemose.....	40
4.6.5. Avaliação do desenvolvimento das colônias.....	42
4.7. Análise estatística.....	43
5. RESULTADOS.....	44
5.1. Comportamento higiênico.....	44

5.2. Índice de infestação de Varroa destructor (IIV)	45
5.3. Nosemose	46
5.4. Desenvolvimento das colônias	47
5.5. Detecção de proteína Cry1F nas larvas de A. mellifera	49
5.6. Detecção e quantificação de proteína Cry1F no pólen	49
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÕES	58
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	59
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Estima-se que existam 20 mil espécies de abelhas espalhadas em todo o mundo. Estas possuem grande importância para a manutenção da diversidade genética vegetal, atuando como polinizadoras de um grande número de espécies vegetais. Ao pousarem nas flores para coleta de recursos tróficos as abelhas são cobertas pelo pólen da planta, transportando-o para outra planta no momento que realizar nova coleta, promovendo assim a troca de gametas entre plantas, ou seja, a polinização cruzada, importante para manter a variabilidade genética das plantas, relevante para a sobrevivência e evolução das espécies.

Segundo Samejima *et al.* (2004), as abelhas são responsáveis por 22% da polinização nas florestas tropicais, além da produção de 30% do alimento consumido pelos seres humanos (POTTS *et al.*, 2006). De acordo com a FAO (2002), aproximadamente 73% das espécies vegetais cultivadas no mundo são polinizadas por alguma espécie de abelha. Especificamente, muitas espécies frutíferas cultivadas pelo homem são dependentes da polinização realizada por insetos e a polinização insuficiente resulta no insucesso reprodutivo, causando um grande impacto econômico (PELLETIER *et al.*, 2001; PIAS & GUITIÁN, 2006).

A espécie *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) participa da produção mundial de alimentos em vários níveis. Além de contribuir para a agricultura, aumentando a produção entre 5 e 500%, dependendo da espécie, variedade e condições de cultivo (DE JONG, 2000), as abelhas também são responsáveis pela produção de mel, pólen, geleia real, cera, própolis e outros produtos.

Em Santa Catarina a atividade apícola possui grande importância social, econômica e ecológica, atuando diretamente na produção de espécies frutíferas, como a maçã, a pêra e o mirtilo, e também na produção de produtos apícolas.

No primeiro semestre deste ano, o estado exportou 2,87 mil toneladas de mel, se tornando o segundo estado exportador do Brasil, ficando atrás somente do estado de São Paulo. Em setembro de 2013, durante a realização do 43º CONGRESSO INTERNACIONAL DE APICULTURA, realizado na Ucrânia, o mel catarinense ganhou o prêmio de melhor mel do mundo. Segundo o presidente da Federação das Associações de Apicultores de Santa Catarina (FAASC), Nésio Fernandes, o estado conta com 30 mil

famílias dedicadas a apicultura, distribuídos principalmente nas regiões do Alto Vale do Itajaí e Grande Florianópolis.

Atualmente, um fenômeno está preocupando apicultores, pesquisadores, ambientalistas, produtores rurais, governos e ONGs. Trata-se de uma séria mortandade de colônias de *A. mellifera*, conhecida como Colony Collapse Disorder (CCD), ou em português, Desordem do Colapso de Colônias (DCC), sendo a característica principal a incapacidade das abelhas campeiras de retornarem às suas colônias. O DCC foi relatado inicialmente nos EUA em 2004 e, posteriormente, no Canadá, em países da Europa, e também em outros países ao redor do mundo (STOKSLAND, 2007).

Pesquisas vêm sendo realizadas em todo o mundo, mas ainda não existem evidências do verdadeiro motivo para a ocorrência desse fenômeno. Muitos fatores estão sendo associados à DCC, como a falta de alimento, o uso indiscriminado de agrotóxicos, ataque de predadores ou parasitas, como o ácaro *Varroa*, doenças como a Nosemose, aquecimento global, e também pelo consumo de pólen e néctar de organismos geneticamente modificados (OGM), como o milho, a canola e o algodão.

Dentre as doenças destaca-se a noseemose, causada pelo fungo *Nosema ceranae* (uma nova espécie que já foi encontrada no Brasil). Diferente do *N. apis* que normalmente ataca as abelhas em climas e épocas frias, o *N. ceranae* tem causado problemas em pleno verão. No Brasil, a Nosemose era bastante rara, mas atualmente está presente em muitos apiários em todo país.

A infestação de ácaro *Varroa destructor* também é apontada como um possível causador do DCC. Este ácaro é hoje um dos maiores problemas para a apicultura mundial (BOTTA *et al.*, 2004), uma vez que além do potencial parasitismo, *V. destructor* tem sido descrito por pesquisadores como o principal vetor de diversas doenças, tais como o vírus da paralisia aguda, o vírus Kashmir e o vírus da asa deformada (BAKONYI *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2004; TENTCHEVA *et al.*, 2006).

Outro fator que pode estar associado à DCC é o grande aumento das culturas transgênicas. Diversos trabalhos têm demonstrado a ocorrência de efeitos diretos e indiretos causados por plantas transgênicas sobre as colônias de abelhas. Efeitos diretos podem ocorrer quando uma abelha ingere diretamente a proteína que codifica um transgene, e os efeitos indiretos são causados quando a atratividade da flor, ou o valor nutritivo do néctar e pólen forem alterados pelo processo de introdução do transgene na planta.

As plantas geneticamente modificadas com transgene Bt, como é o caso do milho, foram criadas para expressar uma toxina inseticida com o objetivo de combater a algumas espécies-alvo como a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*, ordem Lepidoptera, família Noctuidae) e alguns outros lepidópteros, visando uma redução da aplicação de inseticidas nas lavouras. Segundo Sabugosa-Madeira e Abreu (2009), apesar de a toxina inseticida ser limitada a algumas espécies-alvo, já foram observados efeitos deletérios em insetos benéficos pertencentes às ordens Neuroptera, Hymenoptera e Coleoptera.

Diante dos potenciais riscos que os organismos geneticamente modificados podem causar sobre colônias de *A. mellifera*, em especial o milho Bt, da sua correlação com a Desordem do Colapso de Colônias (DCC), e pela escassez de pesquisas em relação aos efeitos sub-letais em *A. mellifera*, principalmente sobre a relação de OGMs e a sanidade apícola, o objetivo desta dissertação foi avaliar os riscos de OGMs contendo a toxina Cry sobre insetos não-alvo, a partir de análises dos impactos da alimentação com pólen de milho Bt sobre colônias de *A. mellifera*, avaliando sua relação com a sanidade apícola e o desenvolvimento das colônias.

Este estudo faz parte do projeto “Co-operative Brazil-Norway Initiative for Competence Building in Biodiversity and Biosafety”, executado por docentes e estudantes da UFSC, com apoio da Agência de Desenvolvimento da Noruega (Norwegian Agency for Development Cooperation – NORAD) e do GenØk (Centre of Biosafety) vinculado a Universidade Tromsø, Noruega.

Além deste, outros estudos vem sendo conduzido no âmbito do ECOLGEN, que é o Núcleo Latino Americano de Ecologia do Genoma e Biodiversidade (The Latin American Institute for Genome Ecology and Biodiversity), vinculado a UFSC e dedicado ao estudos dos biorriscos dos OGMs.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Distúrbio do Colapso das Colônias

A Desordem do Colapso das Colônias (DCC) é caracterizada pela ausência de abelhas vivas ou mortas na colônia ou em locais próximos a ela, mas com a presença de larvas, pupas e alimento, podendo ser encontradas, dentro da colméia, uma pequena quantidade de operárias jovens e a rainha. Nas colônias em que está iniciando a DCC, observa-se uma quantidade de cria maior do que a capacidade das operárias as cuidarem, o crescimento na proporção de operárias novas na população de abelhas adultas da colônia, a presença da rainha e uma relutância da colônia em consumir o alimento energético ou protéico fornecido (EMBRAPA, 2012).

Relatada pela primeira vez nos EUA em 2004 e, posteriormente, em países da Europa, ainda não se sabe quais as causas do DCC (OLDROYD, 2007), Órgãos oficiais como ARS (Agriculture Research Service) e USDA (United States Department of Agriculture) estão realizando intensas investigações para descobrir as causas. O impacto tem sido tão preocupante que em abril de 2007, o ARS realizou um Workshop reunindo cerca de 80 pesquisadores da área, representantes da indústria e agentes de extensão, com a finalidade de discutir um plano de ação denominado “Colony Collapse Disorder Action Plan” para pesquisar as causas do fenômeno (PINTO & MIGUEL, 2008).

Vários fatores têm sido citados por pesquisadores como: novas doenças, parasitoses, genética, nutrição, aumento da temperatura, pesticidas agrícolas e alterações no agroecossistema e o uso de plantas geneticamente modificadas. No entanto, ainda não existe um consenso definitivo sobre as causas (DE JONG & MESSAGE, 2008; SPIVAK, 2008).

Sabugosa-Madeira e Abreu (2009) verificaram que um dos fatores especulados para este declínio são as proteínas Cry presentes em plantas geneticamente modificadas como o milho e o algodão, que são toxinas produzidas por genes isolados de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), já que estas toxinas nocivas para insetos, e as abelhas são expostas através de diversas rotas a estas toxinas.

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, órgão responsável por informar oficialmente a ocorrência de problemas sanitários animais e vegetais no Brasil, não existem relatos oficiais da ocorrência da Desordem do Colapso das Colônias neste país. No entanto, problemas de doenças, morte de abelhas e mesmo abandono de

colônias foram relatados pelos apicultores de vários Estados do Brasil, mas não se sabe se as causas e os sintomas são iguais ou diferentes dos causados pela DCC e descritos inicialmente nos Estados Unidos (EMBRAPA, 2012). Existem relatos de casos com perda de 400 colméias, mas na maioria dos casos não foram coletadas amostras para posterior análise e comprovação da causa das perdas (MALASPINA *et al.*, 2008).

No Estado de Santa Catarina foram identificadas perdas significativas de colônias de *A. mellifera* nos anos de 2010 e 2011 chegando a perdas superiores a 80% em vários apiários, o que tem preocupado os apicultores e as autoridades estaduais ligadas ao setor agrícola (A. I. Orth – informação pessoal)

2.2. Milho geneticamente modificado Bt

O milho geneticamente modificado (Bt) é aquele que apresenta em seu material genético o gene que codifica a proteína Cry, clonado da bactéria *Bacillus thuringiensis*. Este gene capacita a planta a produzir efeitos tóxicos a insetos da ordem Lepidoptera (BATS, 2003). Na natureza, a ação inseticida desta bactéria se deve à presença de um cristal parasporal produzido no momento da esporulação. Este é composto pelas chamadas “proteínas cristalinas” (“proteínas Cry”) ou “proteínas cristalinas inseticidas” (ICPs da sigla em inglês *insecticidal crystal proteins*). Estas proteínas estão na forma de pró-toxina que, sob digestão parcial por proteases no trato intestinal dos insetos, é convertida na forma ativa (referida como “toxina Cry” ou “toxina Bt”), interagindo com moléculas receptoras presentes nas células do epitélio do intestino médio, causando o desequilíbrio osmótico, e conseqüentemente a morte do inseto (FERRÉ, 2002).

No caso do milho Herculex®, o transgene cry1F codifica para uma forma truncada da proteína inseticida Cry1F, derivada da cepa PS81I (NRRL B-18484) de *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*. A proteína Cry1F inicia sua ação inseticida quando ocorre a solubilização dos cristais no intestino dos insetos devido ao pH alcalino, ocorrendo assim a liberação de pró-toxinas. Estas, ativadas por proteases existentes no intestino médio dos insetos pela clivagem das porções N-terminal e C-terminal da proteína, interagem com moléculas receptoras, presentes nas células do epitélio do intestino médio, e promovem formação de poros e, conseqüentemente, o desequilíbrio osmótico, lise celular e morte do inseto (BRAVO *et al.*, 2007).

Segundo a empresa Dow Agrosciences, desenvolvedora de um dos tipos de milho Bt, a proteína Cry1F age pela ligação seletiva a sítios específicos localizados na

membrana do intestino médio de espécies suscetíveis. Após a ligação, são formados poros que interrompem o fluxo de íons no intestino médio, causando a paralisia do intestino e conseqüentemente a morte da larva de “insetos-alvo”, não atuando no organismo de “insetos não-alvo”. Considera-se que a especificidade das toxinas Cry se deve à existência de receptores toxina-específicos localizados nas células do epitélio da borda em escova e ao alto pH do intestino de espécies alvo (HOFTE & WHITELEY, 1989).

Apesar do número considerável de trabalhos científicos publicados sobre os efeitos adversos em invertebrados não-alvo baseados na prototoxina, presume-se que formulações comerciais de Bt baseadas em δ -endotoxinas (proteínas Cry) são altamente específicas e possuem efeitos significantes em espécies alvo devido à sua bioatividade limitada sob condições de campo (IGNOFFO & GARCIA, 1978; HILBECK & SCHMIDT, 2006).

2.3. Ação inseticida de organismos geneticamente modificados em insetos não-alvo

Segundo a desenvolvedora do milho Bt, a proteína Cry é testada em modelos animais, como ratos e camundongos, para a verificação do potencial tóxico. Um destes testes, denominado de toxicidade aguda, consiste na ingestão forçada de uma solução de proteína pura pelo animal e na observação de eventuais efeitos desta. Entretanto, estes testes são feitos com a proteína Cry produzida em bactérias. Até o momento não foram encontrados na literatura resultados de artigos publicados sobre os efeitos das proteínas Cry puras produzidas em plantas sobre organismos não alvos.

Visando determinar se os organismos GM possuem riscos ambientais ou mesmo danos para a saúde animal ou humana, o conceito da “equivalência substancial” é utilizado mundialmente. Utilizando o pressuposto deste conceito, avaliações de segurança são realizadas para verificar diferenças composicionais entre os alimentos produzidos com organismos GM e suas linhas isogênicas. O objetivo é avaliar compostos específicos, focando na composição centesimal, em análises de compostos tóxicos naturalmente presentes, em fatores antinutricionais, entre outros (KUIPER *et al.*, 2003; CELLINI *et al.*, 2004; METZDORFF *et al.*, 2006; RICROCH *et al.*, 2011).

Estudos realizados por Sanders (1998) demonstram que variedades de milho GM e não-GM apresentam concentrações semelhantes de aminoácidos, ácidos graxos, cálcio e

fósforo. Contudo, Ye *et al.* (2000) verificaram uma elevada produção de derivados inesperados de carotenóides em arroz GM em relação ao arroz não-GM.

Segundo os proponentes da tecnologia, nas análises de segurança ambiental, organismos não-alvo como insetos de outra ordem, classe ou espécie, inimigos naturais e insetos benéficos como abelhas, por exemplo, são expostos às proteínas inseridas nas partes vegetativas ou nos grãos de pólen que as expressem e são avaliados os seus efeitos (PIONNER, 2012).

Entretanto os experimentos realizados pelas empresas produtoras de OGMs são de baixa qualidade científica para aprovar suas solicitações de uso comercial. Isso pode ser verificado no processo de liberação do milho MON 810 (CTNBio, Processo N^o: 01200.002995/1999-54), em que a duração dos ensaios com organismos não-alvo foram de sete dias (ensaio com *Chrysopa carnea*) e de até 28 dias (ensaio com minhocas), tempo esse insuficiente para provar efetivamente os efeitos das toxinas sobre o ambiente e os organismos não-alvo. Neste dossiê acima referido, o teste em abelhas durou nove dias, cuja variação nos resultados entre as três repetições alcançou mais de 100%. Mesmo assim, este tipo de teste é aceito pelas agências regulatórias.

Em relação aos efeitos adversos da proteína Cry sobre insetos não-alvo, Hilbecket *al.* (1998) realizaram um dos primeiros estudos reconhecidos cientificamente, verificando que larvas de *Chrysopa carnea*, um importante agente de controle biológico presente nos ecossistemas, morriam ao consumir alimentos que continham a proteína Bt presente no milho geneticamente modificado MON810.

Ramirez-Romero *et al.*, (2008) verificaram em seus estudos que a proteína Cry1Ab não causou efeitos letais sobre as abelhas, mas que a exposição subcrônica oral a alimento contaminado com 5000ppb de Cry1Ab causou alterações comportamentais, como o comportamento alimentar ou processos de aprendizagem das abelhas.

Lipinski *et al.* (2008) verificaram que dietas contendo baixa concentração de proteína Bt oriunda de milho OGM MON863 x MON810 não apresentaram impactos significativos sobre operárias *A. mellifera*, apesar de um ligeiro aumento da mortalidade das larvas, Lima *et al.* (2010) também não verificaram impactos negativos em relação ao tempo de desenvolvimento, peso e tamanho de indivíduos adultos de *A. mellifera*, alimentados com dieta artificial contendo a proteína Cry1Ac. Anteriormente, Malone *et al.* (1999) verificaram que a toxina produzida pela proteína reduziu o tempo de sobrevivência de abelhas alimentadas com dieta contendo a proteína Cry1Ab.

Efeitos deletérios foram observados em coccinelídeos da espécie *Adalia bipunctata* L., predador natural presente em diversos ecossistemas, afetados pelo consumo direto ou indireto de toxinas Cry1Ab e Cry3Bb pelas suas presas (SCHMIDT *et al.*, 2009).

Hanley *et al.* (2003) verificaram que o pólen de OGMs é altamente tóxico para insetos que coabitam nas colméias, tais como traças de cera *Achroia grisella* e *Galeria mellonella*. Segundo Sabugosa-Madeira e Abreu (2009), em colônias que apresentaram Desordem de Colapso da Colônia não existiam a presença de traças da cera vivas e do besouro da espécie *Aethina tumida* Murray nos favos abandonados. Essa ausência de insetos que coabitam as colônias pode ter sido causada pelo efeito da toxicidade da proteína Cry presente nos favos, oriundo do pólen coletado de OGMs (LATSCH, 2007).

Diversos estudos científicos demonstram que abelhas de *A. mellifera* alimentadas com pólen de culturas transgênicas apresentaram mortalidade que variou de 8% a 16% em larvas e adultos, respectivamente. Esses resultados foram superiores aos resultados de experimentos realizados com abelhas não alimentadas com pólen de culturas transgênicas (HANLEY *et al.*, 2003). Ramirez-Romero *et al.* (2005, 2008) demonstraram efeitos letais ou deletérios em abelhas que ingeriram esporos de *B. thuringiensis* ou a proteína Cry.

No entanto, não foram encontrados na literatura científica resultados de estudos sobre o impacto da alimentação com pólen Bt sobre a sanidade das abelhas, correlacionando o impacto da proteína Cry1F expresso em variedades comerciais de milho em relação ao comportamento higiênico e à resistência das abelhas a doenças e pragas, tão pouco sobre a exposição de larvas e abelhas jovens e adultas às toxinas Cry1F expressas em variedades comerciais de milho em cultivo no Brasil.

2.4. Comportamento higiênico

Comportamento higiênico (CH) é o mecanismo de defesa natural das abelhas, sendo a capacidade de as operárias detectarem e removerem dentro das colônias larvas mortas, danificadas ou doentes, e a remoção de resíduos ou impurezas do interior da colméia (GRAMACHO & GONÇALVES, 2000). Segundo Moretto (1993), a capacidade de as abelhas controlarem a infestação de ácaros *Varroa destructor* também está diretamente relacionada ao CH, apesar de ele não classificar como comportamento higiênico e sim capacidade de limpeza das abelhas.

O CH é o principal mecanismo de resistência das abelhas contra pragas e doenças, sendo este um dos principais objetivos perseguidos por trabalhos de melhoramento genético das abelhas. A expressão desse comportamento é determinada pelo genótipo das colônias, sendo que abelhas africanizadas possuem maior capacidade de desempenhá-lo do que abelhas de linhagens européias (MESSAGE, 1979; GRAMACHO, 1995, 1999; GRAMACHO & GONÇALVES, 1996). Outros fatores externos, como o fluxo e a qualidade do alimento e também a idade das abelhas, podem influenciar a frequência do CH (THOMPSON, 1964; MOMOT & ROTHENBUHLER, 1971; MESSAGE & GONÇALVES, 1980).

Para realizar a limpeza da colméia, as abelhas inicialmente detectam as células que possuem crias doentes, realizam a desoperculação da célula e em seguida removem a cria para fora da colméia antes que o patógeno alcance o estágio infeccioso, evitando que a doença seja transmitida para toda a colônia. (PARK *et al.*, 1937; WOODROW & HOLST, 1942; ROTHENBUHLER, 1964). Em relação à remoção de ácaros de seu corpo, as abelhas realizam movimentos vibratórios laterais do abdômen e posteriormente matam o ácaro utilizando suas mandíbulas.

Diversos trabalhos de avaliação do CH, melhoramento genético das colônias, e avaliação dos danos que a utilização de agrotóxicos e organismos GM possa causar para as abelhas vêm sendo realizado, buscando alcançar uma melhor resistência das colônias, reduzindo assim a utilização de antibióticos e acaricidas para o combate de parasitas e doenças nas colméias.

2.5. *Varroa destructor*

A Varroose é causada pelo ácaro *V. destructor*, um ectoparasita da Família Varroidae, que se alimenta da hemolinfa das larvas, pupas e abelha adulta (BOTTA *et al.*, 2004). Além dos efeitos diretos causados às abelhas, como malformações, diminuição do tempo de vida médio e até mesmo a morte das abelhas, o ácaro é vetor de doenças provocadas pelo vírus da paralisia aguda de abelhas (ABPV), o vírus de abelhas Kashmir (KBV) e o vírus que deforma a asa (DWV) (CHEN *et al.*, 2004).

Atualmente o *V. destructor* é um dos problemas que mais afetam o setor apícola, sendo relacionado ao DCC por diversos autores (LE CONTE *et al.*, 2010). No Brasil ainda não foram relatados casos comprovados de DCC, mas a ocorrência de altas infestações de *Varroa* vem crescendo a cada ano.

As fêmeas do *Varroa* apresentam corpo oval achatado, de coloração castanho-avermelhado, apresentando armadura bucal que lhes permite penetrar o revestimento quitinoso do corpo das abelhas para sugar a hemolinfa. (MURILHAS & CASACA, 2004). As fêmeas podem ser encontradas tanto fora dos alvéolos (fase forética), como dentro (fase reprodutiva), onde parasitam as larvas e realizam a postura de seus ovos (ROSENKRANZ *et al.*, 2010). Os machos são menores e apresentam coloração corporal mais clara que as fêmeas, e ainda possuem pernas mais compridas. Estes são encontrados normalmente no interior dos alvéolos, onde realizam a fecundação das fêmeas. Após a fecundação os machos morrem dentro dos alvéolos (SHAPIRO, 2011).

O ciclo de vida do ácaro pode ser dividido em duas partes, uma parasitando as abelhas adultas, e outro no interior dos alvéolos, aonde as fêmeas irão se alimentar da hemolinfa das larvas e também realizarão a postura dos ovos. Toda a fase reprodutiva acontece dentro dos alvéolos, onde normalmente um macho e duas ou três fêmeas irão nascer. Destas, uma a três fêmeas serão fecundadas, dependendo se o alvéolo for de zangões ou de operárias. Após a fecundação, no momento da desoperculação dos alvéolos, as fêmeas fecundadas sairão do opérculo. Os machos e as fêmeas não fecundadas irão morrer (MURILHAS & CASACA, 2004).

Este ciclo é influenciado pela genética das abelhas, apresentando ou não um alto índice de CH nas colônias; pelo clima, sendo favoráveis as estações mais quentes do ano, e também pela baixa oferta de pólen (MORETTO *et al.*, 1996; 1997).

O primeiro sinal da infestação é a presença de abelhas adultas parasitadas pelos ácaros. Outro sinal que demonstra que a colméia possui problemas devido ao acaro *Varroa* é a presença de um grande número de abelhas com asas deformadas, causado pelo Deformed Wing Virus (DWV), normalmente transmitido pelo ácaro. Com o aumento do número de ácaros na colônia, outros sintomas podem ser verificados, como abelhas rastejando na entrada da colméia, redução da população e conseqüentemente um menor desenvolvimento da colônia. Quando a colônia possuir um número elevado de ácaros ocorrerá a incidência de diversas doenças causadas pelo vírus transmitidos por eles, podendo haver a morte de toda a colônia. Após esses sinais a colméia começará a reduzir sua população e conseqüentemente seu desenvolvimento (CALDERONE, 2002).

2.6. Nosemose

A Nosemose é causada pelo microsporídio *Nosema ceranae*, um parasita intracelular altamente especializado que ataca o intestino médio das abelhas adultas, causando a dilatação do abdômen, convulsões, e diarreia nas abelhas (SINA *et al.*, 2005). A presença do microsporídio pode danificar o sistema digestivo das abelhas, debilitando e diminuindo a longevidade das abelhas, prejudicando assim sua capacidade de realizar suas funções, tais como forrageamento, limpeza da colméia, nutrição das crias, e produção de mel (CHEN *et al.*, 2008; HIGES *et al.*, 2008; WHITAKER *et al.*, 2010).

A transmissão da doença ocorre quando as abelhas adultas ingerem os esporos do microsporídio presente em alimentos contaminados, no momento do forrageamento, ou quando realizam a remoção de abelhas mortas ou doentes (HIGES *et al.*, 2010). Dentro do trato digestivo do hospedeiro, o esporo germina em aproximadamente 30 min., iniciando assim a replicação do parasita dentro da célula, e após cinco dias da infecção é iniciada a produção de novos esporos (LARSSON, 1986). Estes esporos são lançados no intestino, passando para o reto, liberados junto com as fezes, podendo causar a contaminação de toda a colônia (SOMERVILLE & HORNITZKY, 2007).

A contaminação de toda a colônia pode ocorrer porque os esporos de *N. ceranae* podem permanecer viáveis nos favos por um período prolongado. Forsgren (2010) verificou a presença de esporos viáveis mesmo após realizar o congelamento dos favos contendo os esporos. Os principais sintomas que podem ser verificados em colônias com alta taxa de infecção de Nosemose são a presença de abelhas rastejando sobre o alvado e no chão em frente à colméia, abelhas com asas desarticuladas e abdômen. Outra evidência de que a colônia se encontra doente é a presença de diarreia nas paredes da colméia (DGV, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar os impactos da alimentação protéica artificial contendo pólen de milho geneticamente modificado (Bt) sobre colônias de *A. mellifera*.

3.2. Objetivos Específicos

i. Verificar a presença da proteína Cry1F em larvas de *A. mellifera* alimentadas com dietas contendo pólen de milho GM (evento TC1507);

Hipótese: Ao coletarem o pólen de milho geneticamente modificado (Bt), as abelhas nutrizas não conseguem o distinguir do pólen de milho convencional, fornecendo-o às crias. Estas absorvem a proteína Cry1F, e a acumulam em seu organismo.

ii. Avaliar o impacto do pólen de milho geneticamente (Bt) modificado sobre o desenvolvimento populacional de colônias de *A. mellifera*;

Hipótese: O pólen de milho geneticamente modificado (Bt) atua negativamente sobre as colônias de *A. mellifera*, impactando diretamente no desenvolvimento da colônia, devido à ação direta ou indireta da proteína Cry1F e sua ação inseticida sobre insetos não-alvo.

iii. Determinar a influência da alimentação com pólen de milho GM (evento TC1507) em relação à sanidade apícola de colônias de *A. mellifera*.

Hipótese: Devido aos efeitos sub-letais da proteína Cry1F, as abelhas alimentadas com pólen de milho geneticamente modificado (Bt) apresentam maior susceptibilidade a doenças e ataques de pragas, como a Nosemose e ao ácaro *Varroa*.

3.3. Hipótese Geral

H0: A abelha *A. mellifera* não é susceptível aos efeitos tóxicos da proteína Cry1F, sendo que o pólen de milho geneticamente modificado, fornecido como alimento protéico, não causa impactos adversos em colônias de *A. mellifera*, não influenciando no desenvolvimento e na sanidade apícola das colônias.

H1: A abelha *A. mellifera* é susceptível aos efeitos tóxicos da proteína Cry1F, sendo que o pólen de milho geneticamente modificado, fornecido como alimento protéico causa impactos adversos em colônias de *A. mellifera*, reduzindo o desenvolvimento das colônias e tornando-as suscetíveis a pragas e doenças.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Implantação do Experimento

Para a realização do presente trabalho foi instalado um apiário contendo 20 colônias de *A. mellifera* na Cidade das Abelhas, localizada no bairro Saco Grande no município de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. As colônias foram adquiridas em núcleos de quatro quadros, sendo três quadros de cria e um de mel. Posteriormente as mesmas foram transferidas para colméias do tipo Langstroth (Figura 1a), sendo inseridos seis quadros com cera alveolada para completar os 10 quadros. Todas as colônias possuíam rainhas nascidas no ano de 2013. Após um período de adaptação das colônias as mesmas foram transferidas para os locais definitivos no apiário para a realização dos experimentos (Figura 1b).



Figura 1 - Colônias de *A. mellifera* logo após sua transferência para colméias tipo Langstroth (a); colméias prontas para realização dos experimentos (b).

Para a obtenção do pólen foram realizados dois plantios de milho na Fazenda Experimental da Ressacada, localizada no município de Florianópolis, nos quais foram utilizadas sementes dos híbridos comerciais de milho com tecnologia Herculex* I (TC 1507) da empresa Dow AgroSciences, que expressa a proteína Cry1F, e de sua respectiva linha isogênica (Figura 2a). Os plantios foram realizados nos dias 18/03/2013 e 18/10/2013, respectivamente. Cada plantio foi composto por seis linhas de 40 m cada, com espaçamento de 0,8 m entre linhas.

Imediatamente após o pendramento do milho foi iniciada a cobertura dos pendões com sacos de papel cristal para embalar frutos de tamanho 18x25 cm (Figura 2b). Os sacos foram fechados na base do pendão com auxílio de arame. A coleta foi realizada 24 h após o ensacamento, sendo realizado o corte da base do pendão.

Após a coleta dos sacos, os pendões foram acondicionados em sacos plásticos de 100l e, posteriormente, levados para o Laboratório de Entomologia Agrícola, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foi realizada a retirada do pólen. Para tanto os sacos de papel foram abertos sobre uma bandeja branca, onde foi realizada a separação do pólen dos pendões. Após a separação o pólen foi peneirado para a retirada de impurezas, sendo utilizada uma peneira com tela de 2x2mm.

Para verificar a presença da proteína Cry1F no pólen e verificar se a amostra da respectiva linha isogênica estava contaminada ou não por proteína Cry foram utilizadas tiras do kit QuickStix da Envirologix para detecção de proteína Cry1F. Para tanto, 10g de pólen de cada amostra foram macerados em cadinho com auxílio de um pistilo em 100mL de água destilada. As amostras foram agitadas e deixadas em repouso por 1min. Em seguida foi colocada uma tira por amostra de pólen, realizando a interpretação após 5min.

Posteriormente, as amostras de pólen foram colocadas em potes de plásticos identificados com data e tipos de pólen e mantidas em freezer a -24 °C até o momento do preparo dos alimentos protéicos (Figuras 2c e 2d).

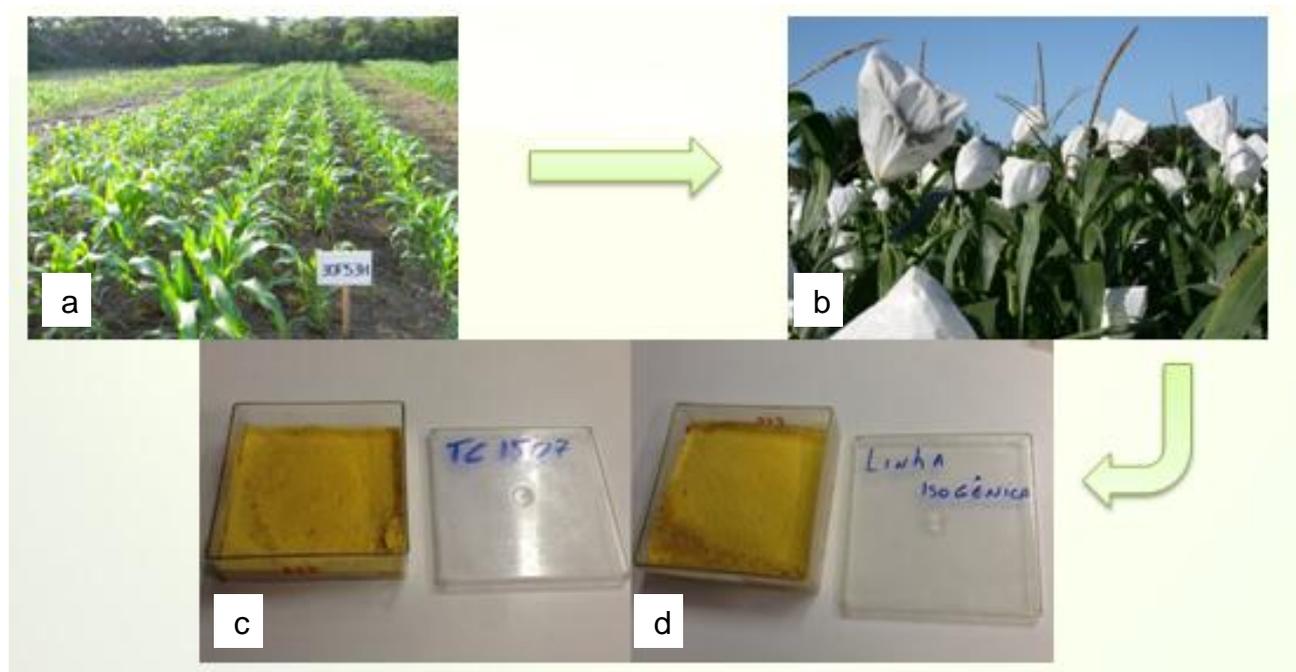


Figura 2 - Plantio de milho Bt para realização da coleta de pólen (a); Inflorescências masculinas de milho ensacadas para a realização da coleta do pólen (b); Pólen do milho Herculex® (Evento TC1507) (c), e pólen de milho da linha isogênica (d).

4.1.1. Desenho experimental

O experimento foi composto por quatro tratamentos: T1 - colônias alimentadas com alimento protéico contendo pólen de milho Bt (evento Cry1F) em sua composição; T2 - colônias alimentadas com alimento protéico com pólen de milho da linha isogênica não GM; T3 - colônias alimentadas com alimento protéico sem adição de pólen, e T4 - colônias não alimentadas com alimento protéico, tendo acesso somente à flora apícola disponível na região, sendo este o tratamento testemunha.

Para garantir que as abelhas consumissem apenas o alimento fornecido, foram instalados coletores de pólen na entrada das colméias dos tratamentos 1, 2 e 3, impedindo assim a entrada de pólen externo (Figura 3).



Figura 3 - Colméia com coletor de pólen instalado sobre o alvado (a), colméia sem o coletor de pólen (b). A seta demonstra o coletor de pólen instalado.

O alimento foi fornecido nas datas 19 e 26 de fevereiro e 5 de março de 2014, respectivamente. Foram realizadas duas coletas de dados, uma antes e outra após o fornecimento de alimento. As coletas de dados antes da aplicação dos tratamentos foram realizadas nos dias 4, 5 e 6 de fevereiro, e as coletas após o fornecimento dos alimentos protéicos foram realizadas nos dias 7, 8 e 9 de março. O delineamento experimental

utilizado foi o Completamente Casualizado, sendo que cada tratamento (formulação do alimento protéico) foi composto de 5 repetições e a unidade experimental foi uma colméia.

4.2. Preparo do alimento protéico

Foram preparados três tipos de alimentos protéicos, um contendo pólen do milho Bt da variedade Herculex, que expressa a proteína Cry1F, um contendo pólen do milho da respectiva linha isogênica do milho Herculex, que não expressa a proteína Cry1F, e o terceiro sem adição de pólen, utilizados nos tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente. Para o preparo do alimento contendo pólen foi utilizado xarope de açúcar na proporção 80:20 (80% de xarope de açúcar e 20% de pólen). O alimento sem adição de pólen foi feito na proporção de 2:2:6 (20% de levedura de cerveja; 20% de proteína texturizada de soja (PTS) e 60% de xarope de açúcar) (PINTO *et al.*, 2010).

4.3. Fornecimento do alimento protéico para as abelhas

Devido à inexistência de protocolos padronizados sobre fornecimento de alimentação protéica contendo pólen diretamente nos alimentadores instalados nas colméias para as abelhas operárias realizarem a coleta, foi realizada a adaptação de protocolos de trabalhos que utilizaram alimentação *in vitro* de larvas de *A. mellifera*. Estudos dos efeitos da proteína Cry sobre *A. mellifera* utilizam larvas criadas em laboratório alimentadas individualmente com alimentos protéicos contendo proteína Cry purificada ou pólen de milho Bt em sua composição. Alguns protocolos fornecem de 1,5 a 2 mg de pólen para cada larva (HARLEY *et al.*, 2003; HENDRIKSMA *et al.*, 2011). Como o alimento não foi fornecido diretamente às larvas e o alimento coletado pelas abelhas operárias foi destinado a alimentação das crias e também ao armazenamento de pólen nos favos, o presente estudo foi realizado com a dosagem de 2 mg de pólen por célula de cria. Foram utilizadas colméias contendo em média 4 quadros de crias, sendo 2 de crias abertas e 2 de crias operculadas, e que cada favo possui 7200 células. Para determinar a quantidade de pólen a ser fornecido por colméia foi utilizado o seguinte cálculo: Quantidade de pólen = 7200 (células)*2 (favos de cria aberta)*2 (mg de pólen), resultando em 28,8g de pólen por colméia. Este alimento foi fornecido nos tempos 0, 7 e 14 dias, e a

cada introdução de alimento foi verificada a aceitação do alimento a partir da avaliação da presença ou não de restos do alimento nos alimentadores.

4.4. Detecção e quantificação da proteína Cry1F no pólen

4.4.1. Extração da proteína Cry1F do pólen

Para a quantificação da proteína Cry1F, as amostras de pólen foram maceradas com nitrogênio líquido e extraídas com agitação constante em uma proporção 1:20 (peso: volume) em um tampão de extração contendo 50 mM CAPS, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA e 2 mM DTT e tablete de inibidor de protease (Roche), sob pH 10,8. Após a maceração, as amostras foram colocadas em tubos Eppendorf e deixadas agitando em gelo por 30 min. Posteriormente, foram centrifugadas a 15000g por 10 min a 4°C. As alíquotas foram armazenadas em freezer -20°C até a análise. Este protocolo foi adaptado de Mekawi (2009).

4.4.2. Método Western Blotting 1D

Para detectar e quantificar a proteína CRY1F no pólen de milho Herculex® (evento TC1507) foi utilizada a técnica de *Western Blotting*. A amostra de pólen da linha isogênica (não GM) foi utilizada como controle negativo e a proteína Cry1F bacteriana purificada Abraxis em três concentrações (15, 10, 5 e 2,5 ng) como controle positivo. O protocolo de Western Blot utilizado foi adaptado de Mekawi (2009).

4.4.3. SDS-PAGE

Foram preparados géis desnaturantes de poliacrilamida, de 0,75 mm de espessura, contendo Tris-HCl (0,4 M pH 8,8), Acrilamida (12% m/v), Bisacrilamida (0,3% m/v), SDS (0,1% m/v), persulfato de amônio (0,05% m/v) e Temed (0,05% v/v) (Figura 4a).

Utilizaram-se quatro amostras de pólen, sendo três amostras GM coletadas em diferentes datas e uma de pólen da linha isogênica. As amostras foram diluídas na

proporção de 1:200, sendo utilizados 5 µg em 1 (µm) ml de PBS. Das soluções obtidas utilizaram-se alíquotas de 5 µl, as quais foram desnaturadas a 95°C por 5 min em termociclador. Posteriormente, essas amostras foram diluídas em um volume final de 15µl na relação de 4:1 de amostra e tampão de desnaturação contendo 10% glicerol, 2% SDS, 0,05% azul de bromofenol, 250mM DTT e 62,5mM Tris-HCl (pH 6,8); sendo o DTT adicionado no momento da desnaturação. As amostras diluídas em tampão de desnaturação e os controles foram carregados no gel e em um dos pocinhos foi adicionado o marcador de peso molecular Precision Plus Unstained Protein Standard (Bio-Rad). Antes da corrida, foi adicionado tampão contendo Tris-base (0,3% m/v), Glicina (1,4% m/v) e SDS (0,1% m/v) na cuba. A corrida foi feita utilizando-se um sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad) conforme as recomendações do fabricante (60V constante por aproximadamente 60 min) (Figura 4b).

Os géis foram feitos em duplicatas, sendo um gel utilizado para transferência e outro corado com Coomassie Brilliant Blue G250, segundo a metodologia proposta por Neuhoff *et al.* (1988). Os géis foram corados com uma solução de Coomassie Brilliant Blue G250 coloidal seguindo os passos de fixação overnight (etanol 40% v/v e ácido acético 10% v/v), coloração por 24 h (sulfato de amônio 8% m/v, ácido fosfórico 2% v/v e Coomassie Brilliant Blue G250 0,1% m/v), neutralização por 3 min (Tris-base 12M pH 6,5), descoloração por 3 min (metanol 25% v/v) e solução de estabilização por 3 min (sulfato de amônio 20% v/v).

4.4.4. Transferência semi-seca de proteínas em membrana de nitrocelulose

Para a transferência das proteínas separadas em SDS-PAGE foi realizado o corte da membrana do mesmo tamanho do gel e preparado o sanduíche de transferência no transferidor Minitransfer Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Primeiramente, a membrana e o gel recém retirados da cuba foram colocados em tampão de transferência para equilíbrio contendo 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% v/v metanol. O sanduíche foi preparado com uma camada de *fiber pad* saturado com tampão, papel filtro, membrana, gel, papel filtro e outro *fiber pad*. Foi realizada a corrida com 350 mA por aproximadamente 75 min (Figura 4c).

4.4.5. Imuno-deteção da proteína com anticorpos específicos

Após a corrida, foi retirada a membrana e lavada 5 vezes por 3 min em tampão TBS-T (150 mM NaCl, 50 mM Tris base, 0,1% Tween 20) com agitação constante a temperatura ambiente. A membrana foi colocada na solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó desnatado (5% m/v) e tampão PBS-T (8 mM NaH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,1% de Tween 20) por 2 h sob agitação a temperatura ambiente. Foi realizada a lavagem da membrana bloqueada 5 vezes por 3 min na solução TBS-T com agitação constante a temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi incubada com 10 ml do anticorpo primário anti- Cry1F policlonal (Abraxis) (1:1000 de anticorpo diluído na solução de TBS-T com 2,5% de leite em pó desnatado) por 1,5 a 2 h sob agitação a temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi lavada com solução TBS-T 5 vezes por 3 min a temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi colocada em contato com 15 ml de anticorpo secundário policlonal anti-IgG de coelho (1:30000 de anticorpo secundário para solução de TBS-T) por 1 h sob agitação a temperatura ambiente. Após este procedimento, foi feita a revelação das membranas pelo processo de fluorescência utilizando-se o kit Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE) conforme indicações do fabricante. A membrana foi lavada novamente com solução TBS-T por 3 vezes e 2 vezes com TBS. Para a revelação, foram utilizados os reagentes de coloração do kit e as imagens foram captadas com ajuda do fotodocumentador ChemiDoc™ MP System (Figura 4d). Para interpretar os resultados gerados pela revelação das membranas foi utilizado o programa ImageLab 4.1 da BIO-RAD (Figura 4e).

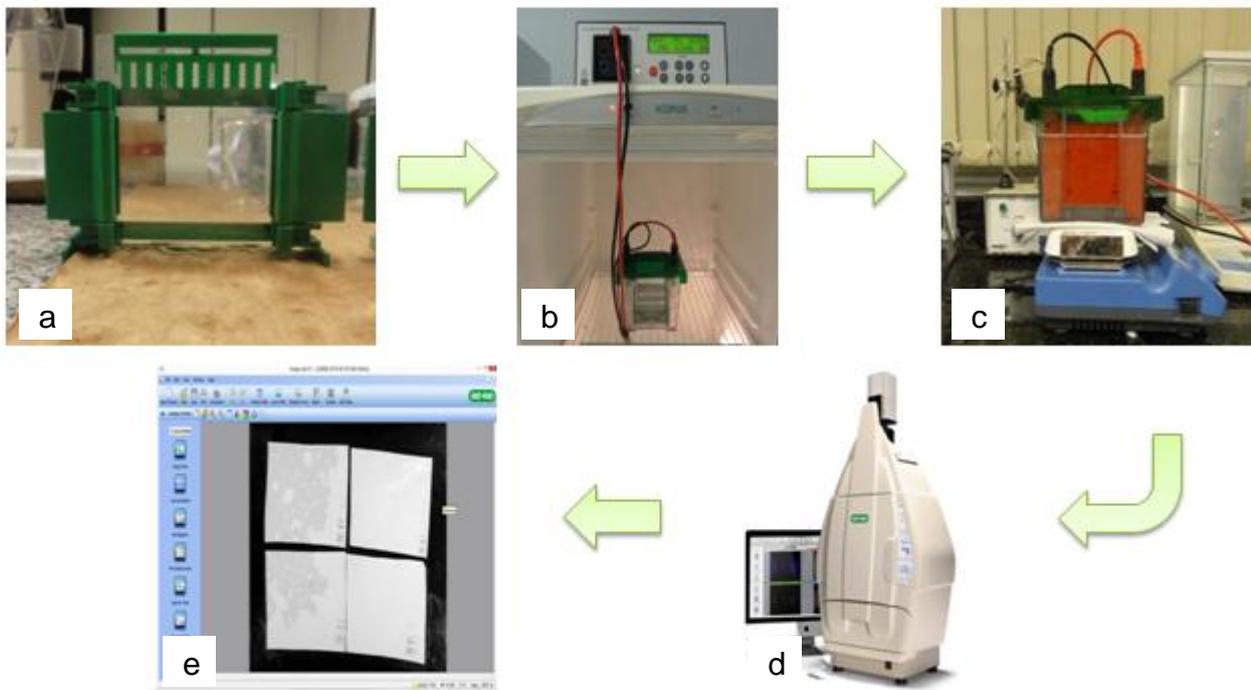


Figura 4 - Gel desnaturantes de poliacrilamida de 0,75 mm de espessura para realização de SDS-PAGE (a), corrida de amostras em gel de poliacrilamida em sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN® (b); Transferência semi-seca de proteínas em sistema eletroforese vertical Mini-PROTEAN® (c); fotodocumentador ChemiDoc™ MP System (d); utilização do programa ImageLab 4.1 da BIO-RAD (e).

4.5. Análise da presença da proteína Cry1F em larvas de *A. mellifera*

Para a realização detecção de proteína Cry1F foram coletadas 100 larvas de *A. mellifera* de 10 a 14 dias das colônias receberam alimento contendo pólen do milho Bt, logo após o encerramento do fornecimento da alimentação protéica artificial nos dias 8 e 9 de março de 2014 (Figura 9a). Após a coleta as larvas foram levadas para o laboratório e mantidas em freezer a -20°C , posteriormente maceradas com agitação constante em uma proporção 1:20 (peso: volume) em um tampão de extração contendo 50 mM CAPS, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA e 2 mM DTT e tablete de inibidor de protease (Roche), sob pH 10,8 (Figura 9b). Após a maceração, as amostras foram deixadas agitando em gelo por 30 min. Posteriormente, foram centrifugadas a 15000g por 10 min a 4°C . As alíquotas foram armazenadas em freezer -20°C até a análise (Figura 9c). Este protocolo foi adaptado de Mekawi (2009).



Figura 5 - Amostra de larvas de *A. mellifera* (a), pupas de *A. mellifera* maceradas em tampão de extração (b), amostra macerada mantida em gelo (c).

Para verificar a presença ou ausência da proteína Cry1F nas larvas foram utilizados os mesmos protocolos utilizados para detecção de proteína Cry1F no pólen.

4.6. Avaliações nas colméias

4.6.2. Análise de comportamento higiênico

A avaliação do comportamento higiênico das abelhas foi realizada usando o método descrito por Newton e Ostasiewski (1986) e modificado por Gramacho e Gonçalves (1994). Foi retirado um quadro de crias operculadas de operárias com idade de 10 a 14 dias (pupa de olho rosa) de cada colônia. Neste quadro foram selecionadas áreas vizinhas, contendo 100 células operculadas cada áreas (10 linhas por 10 fileiras), sendo uma área para perfuração (Área A) e a outra área para controle ou testemunha, sem perfuração (Área B). As células vazias encontradas nas áreas selecionadas foram contadas para realizar o ajuste na porcentagem. As áreas foram selecionadas para controle e perfuração e foram demarcadas usando-se uma folha de transparência. Foram perfuradas 100 células com crias operculadas de operárias com auxílio de um alfinete entomológico nº 2 (alfinete ou agulha de costura de tamanho pequeno) (Figura 6a). Após a perfuração (Figura 6b), o quadro foi devolvido para a colméia de onde foi retirado e, após 24 h, foi realizada a contagem de células vazias tanto na área A como na B (controle).

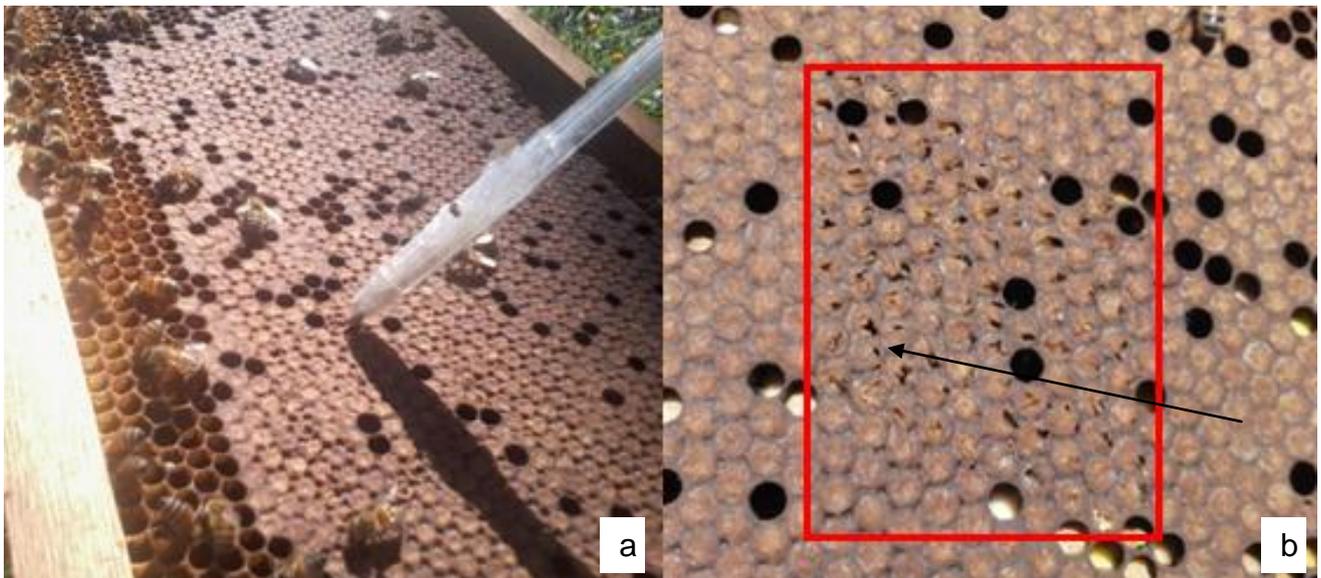


Figura 6 - Perfuração de células de crias operculadas para a realização da avaliação do comportamento higiênico de *A. mellifera* (a), Área do favo contendo 100 células de cria operculada perfuradas (b) A seta indica célula operculada perfurada.

Foi calculado o fator de correção “Z” (Moretto, 1993), que corresponde à taxa de limpeza natural do controle, sendo calculado e descontado do valor das crias removidas nas áreas tratadas. Assim, o valor estimado para o comportamento higiênico da colônia foi considerado somente quando o Z no controle foi igual ou inferior a 10%, isto é, se não existiam mais de 10 células vazias após 24 h.

A fórmula de estimativa do fator de correção Z utilizada foi

$$Z = (Y \times 100)/A$$

$$Y = C - B$$

Onde:

Z = Porcentagem de células onde a cria operculada foi removida naturalmente no controle;

A = Número de células operculadas no controle antes da avaliação;

Y = Número de células onde a cria foi removida naturalmente no controle,

Foram realizados dois testes por colônia, um antes da aplicação dos tratamentos e um 30 dias após o primeiro fornecimento de alimento.

C = Número de células vazias na área controle após 24 h;

B = Número de células vazias na área controle antes da avaliação.

4.6.3. Avaliação de presença de ácaros *Varroa*

O nível de infestação de *V. destructor* em abelhas adultas foi realizado a partir da coleta de aproximadamente 300 abelhas adultas aderentes a três quadros de cada colônia (Figura 7a), as quais foram transferidas para um recipiente contendo etanol 70%. Em seguida os recipientes foram tampados e etiquetados. O teste foi repetido duas vezes, sendo o primeiro antes da aplicação dos tratamentos e o segundo depois do último fornecimento de alimento às colônias.

Os recipientes contendo as abelhas foram agitados por três vezes para a liberação dos ácaros do corpo das abelhas e, posteriormente, o conteúdo foi despejado sobre uma peneira que retinha as abelhas e permitia a passagem dos ácaros para uma bandeja branca (Figura 7b).

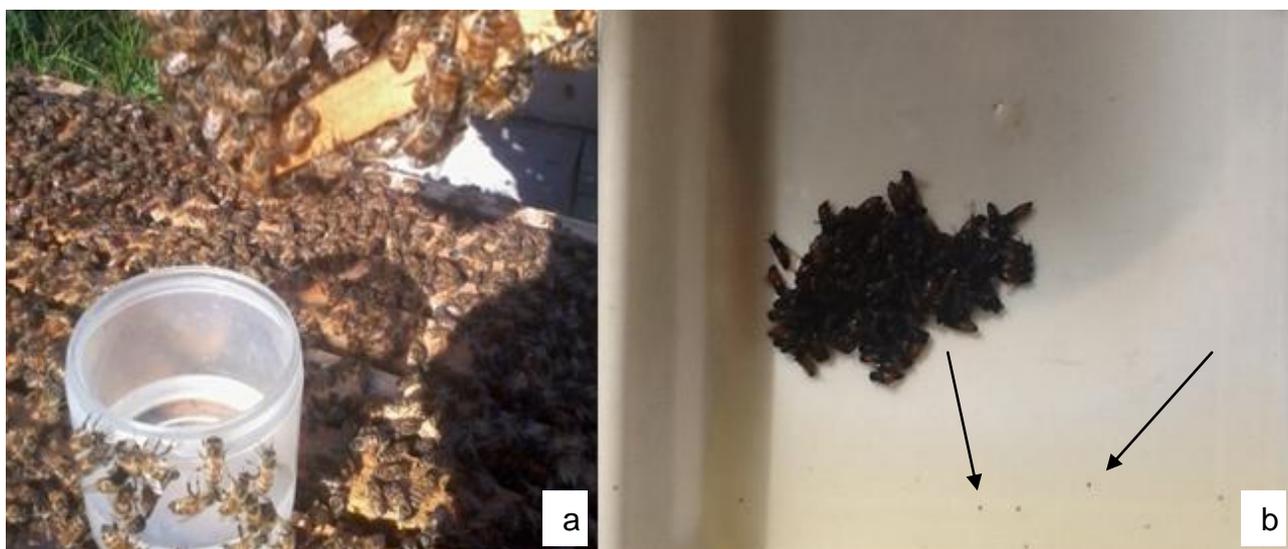


Figura 7 - Coleta de abelhas operarias aderidas aos quadros para a realização da avaliação de infestação por *Varroa* (a), abelhas em recipiente branco após a separação dos ácaros. A seta demonstra a presença dos ácaros (b).

Foi realizada a contagem e o registro de ácaros e de abelhas de cada amostra, sendo posteriormente determinado o nível de infestação por colônia (adaptado de De Jong *et al.*, 1982). O nível de infestação de ácaros sobre as abelhas adultas (NA) foi estimado utilizando a seguinte fórmula:

$$NA = (Ac/AB) \times 100$$

Onde:

Ac = Número de ácaros adultos

AB = Número de abelhas

4.6.4. Avaliação de incidência de Nosemose

A avaliação da incidência de *Nosema ssp.* foi realizada de acordo com o protocolo de monitoramento para avaliação de Nosemose proposto pelo Laboratório de Artrópodos da Facultad de Ciencias Exactas y Naturales da Universidad Nacional de Mar del Plata (2006). Este protocolo é baseado na técnica de Cantwell (1970) modificada por Fries (1984). De cada uma das colméias foi realizada a coleta de amostras de no mínimo 100 abelhas campeiras que estão retornando para a colméia e estas foram acondicionadas em uma solução de formol a 4% (Figura 8). As coletas foram realizadas em horário de vôo máximo (11:00 às 15:00), tempo ensolarado e temperatura superior a 20°C. Os frascos com as amostras coletadas foram fechados hermeticamente e identificados com data e local de coleta.

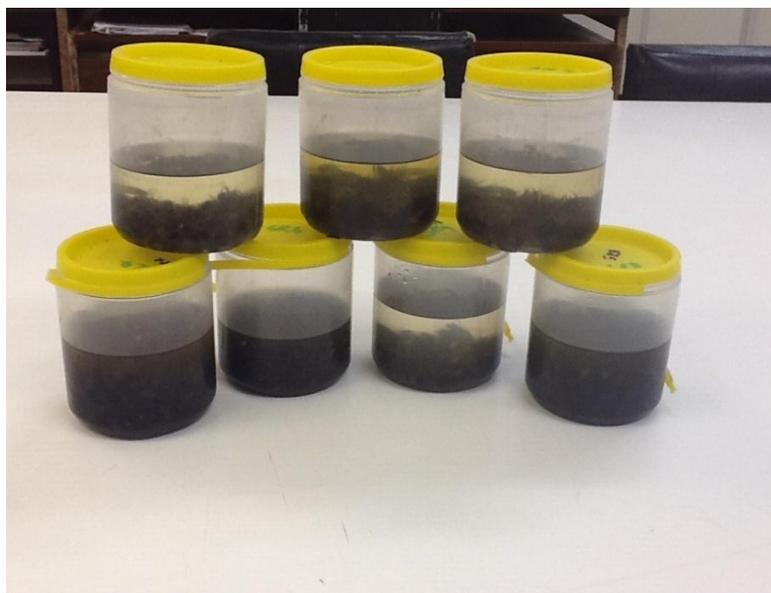


Figura 8 - Amostras de abelhas *A. mellifera* em solução de formol a 4% para análise de incidência de Nosemose.

Para a quantificação da abundância de esporos foram separados 60 abdomens das abelhas (Figura 9a b), os quais foram macerados em um cadinho de porcelana, sendo acrescentados aos poucos 60 ml de água destilada. Este macerado foi filtrado em uma peneira com tela de 2 x 2 mm para a retenção dos tecidos do abdômen. O procedimento de contagem dos esporos foi realizado com uma alíquota de 10 μ l da suspensão resultante do macerado, a qual foi depositada em uma câmara de Neubauer (hemocitômetro) com auxílio de uma micropipeta (Figura 9c). A visualização dos esporos foi realizada utilizando microscopia (Figura 9d).

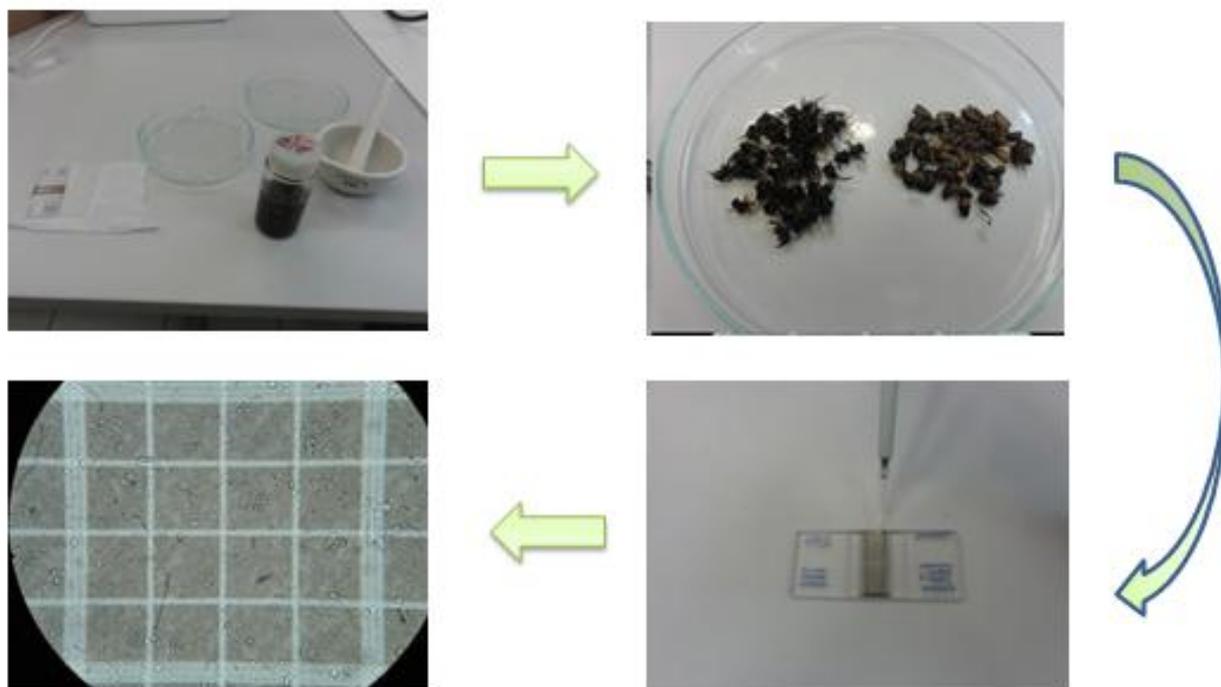


Figura 9 - Amostra de 60 abelhas *A. mellifera* (a), abdomens separados do tórax das abelhas (b), aplicação do macerado dos abdomens em câmara de Neubauer (c), visualização dos esporos de *Nosema ssp* a partir de microscopia (d).

Quando foi observado mais de 1 esporo por quadrado pequeno da câmara, foram contados cinco quadrados grandes (quatro cantos e central). A abundância foi obtida por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Abundância} = \text{Esporos ml}^{-1} = n^{\circ} \text{ esporos contados} \times 5 \times 10.000$$

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

$$\text{Abundância} = \text{Esporos ml}^{-1} = n^{\circ} \text{ esporos contados} \times 10.000.$$

A prevalência de cada amostra foi obtida a partir de uma subamostra de 20 abelhas de cada colméia. De cada abelha, individualmente, foi retirado o ventrículo e este foi macerado em 0,5 ml de água destilada. Deste macerado foi retirada uma alíquota de 50 μl , colocada em uma lâmina, coberta com uma lamínula e observada em microscópio óptico com aumento de 450x. Os valores foram registrados como presença ou ausência de esporos em cada uma das 20 amostras.

4.6.5. Avaliação do desenvolvimento das colônias

Foram realizadas em todas as parcelas análises das seguintes variáveis relacionadas com o desenvolvimento das colônias: número total de favos; número total de favos de mel; número total de favos de pólen; número total de favos vazios; número total de favos abertos com mel e número total de favos abertos com pólen (Figura 10). Estas avaliações foram realizadas antes e depois da instalação dos tratamentos com a alimentação artificial.



Figura 10 - Visualização de população de abelhas *A. mellifera* sobre os quadros (a), quadro contendo favo de crias operculadas(b). abelhas aderidas a quadro de mel (c); quadro contendo favo de mel (d).

4.7. Análise estatística

Para a realização do presente trabalho foram utilizadas como unidade amostral colônias de *A. mellifera*. Por se tratar de populações e não de um indivíduo e pelo fato de que dentro de uma população há variação genética entre os indivíduos, estas unidades não foram consideradas parcelas homogêneas. Para que essas variações não interferissem nos resultados, foram realizadas coletas de dados antes e depois da aplicação dos tratamentos. Portanto, para a realização das análises estatísticas foi utilizada a seguinte fórmula:

$$VF = VDT - VAT;$$

Onde:

VF = valores utilizados para a realização das análises estatísticas;

VDT = valores coletados depois da aplicação dos tratamentos;

VAT = valores coletados antes da aplicação dos tratamentos.

As variáveis analisadas foram índice de comportamento higiênico, índice de infestação de Nosemose, índice de ácaros *Varroa* por colméia e desenvolvimento da colônia (número total de favos de cria, de pólen, de mel e cera alveolada). Os dados obtidos foram analisados por meio da linguagem R, sendo submetidos à ANOVA e, quando necessário, ao teste de separação de médias Tukey (5%).

5. RESULTADOS

5.1. Comportamento higiênico

Os resultados demonstraram que, com exceção de uma colônia alimentada com pólen de milho Bt, que apresentou porcentagem de 63% de retirada de larvas mortas das células perfuradas, todas as demais colméias manifestaram um comportamento higiênico acima de 80%, independentemente do alimento fornecido (Figura 11 a e Figura 11b). Segundo Gramacho & Goncalves (1997), as colméias que possuem comportamento higiênico acima de 80% podem ser consideradas higiênicas.

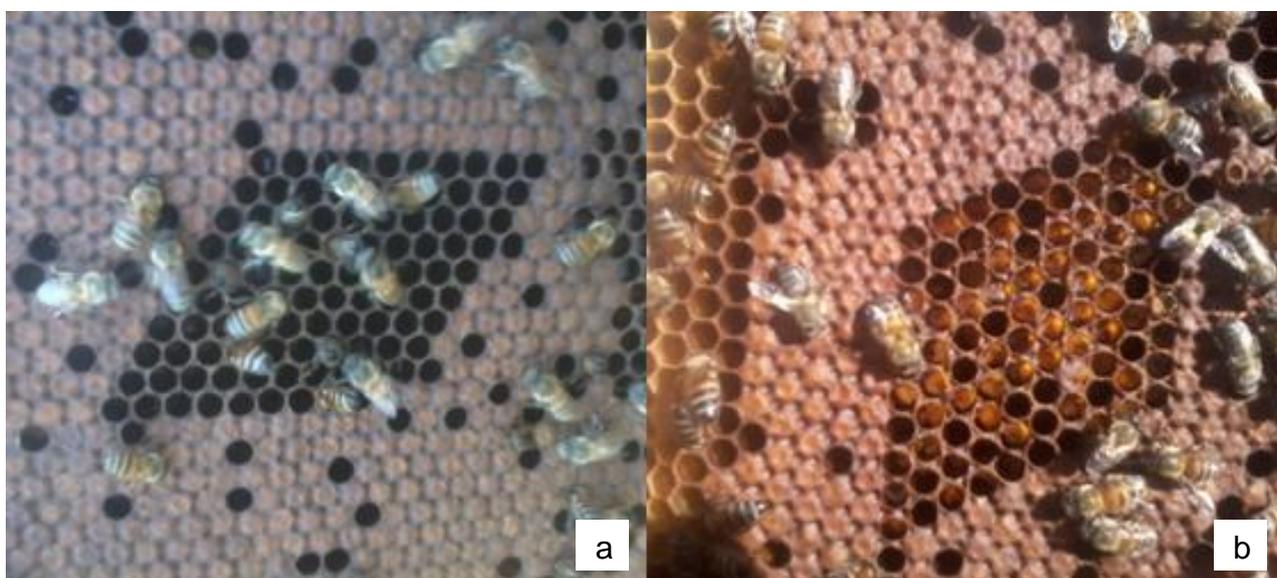


Figura 11 - Área de células perfuradas e totalmente limpas pelas abelhas que não receberam alimento com pólen de milho Bt (a), área de células perfuradas e com menor porcentagem de retirada de larvas mortas pelas abelhas alimentadas com pólen de milho Bt (b).

Apesar de todas as colônias serem classificadas como higiênicas, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 1), sendo que as colméias alimentadas com pólen de milho Bt manifestaram a menor taxa de CH após o final do fornecimento de alimento protéico artificial. Na tabela 1, a segunda avaliação do comportamento higiênico das colméias alimentadas com pólen de milho Bt apresentou porcentagem de CH de 83,4%, resultando numa queda acentuada em relação à avaliação realizada antes do fornecimento de alimento (93,6%).

Nos outros três tratamentos, não houve diferença significativa, antes ou depois do fornecimento do alimento protéico.

Tabela 1 – Porcentagem média de comportamento higiênico (%) em colônias de *A. mellifera*

CH (%)	Com pólen Transgênico	Com pólen da linha isogênica	Sem pólen	Testemunha
Antes	93,6	93,8	93,6	93,6
Depois	83,40 a	93,20 b	93,80 b	92,80 b
Diferença (depois-antes)	-10,20 a	-0,60 b	0,20 b	-0,80 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV (%) = 5,46

A partir dos resultados alcançados é possível levantar a hipótese de que efeitos sub-letais causados pela ação tóxica da proteína Cry1F sobre as abelhas foram responsáveis pelo menor comportamento higiênico, uma vez que os detentores da tecnologia solicitaram e a CTNBio considerou que a composição centesimal da variedade GM era equivalente a da linha isogênica (CTNBio, Processo: 01200.007232/2006-07, 2008). Porém, no parecer técnico de liberação do milho Herculex® citado acima não foram encontradas informações se foram realizados experimentos que comprovem que a Cry1F não provoca impactos sobre a sanidade de *A. mellifera*.

5.2. Índice de infestação de *Varroa destructor* (IIV)

Os resultados demonstram que as colônias alimentadas com pólen de milho Bt obtiveram os maiores índices de infestação por *Varroa* (Tabela 2). A média do IIV das colônias alimentadas com pólen Bt foi a maior após o fornecimento do alimento (5,09), seguida da média das colônias alimentadas com o pólen da linha isogênica (3,24), da testemunha (3,04), e por último, a menor média foi a das colônias que receberam alimento sem adição de pólen (2,46). O tratamento com pólen Bt também apresentou a diferença entre a primeira e a segunda avaliação.

Este aumento do IIV nas colônias alimentadas com o pólen de milho Bt pode ter sido influenciado pela redução do comportamento higiênico das abelhas operárias, que provoca a queda da capacidade de as abelhas detectarem a presença do ácaro em seus corpos e realizar a remoção do mesmo.

Tabela 2 – Numero médio (n) de acaro *V. destructor* por abelha adulta da espécie *A. mellifera*.

IIV	Com pólen Transgênico	Com pólen da linha isogênica	Sem pólen	Testemunha
Antes	2,34	4,32	2,77	2,67
Depois	5,09 a	3,24 b	2,46 b	3,04 b
Diferença (depois-antes)	2,75 a	-1,08 b	-0,31 b	0,36 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV (%) = 42,3

5.3. Nosemose

Os resultados demonstraram que o fornecimento de pólen de milho Bt não influenciou na abundância de esporos de *Nosema ssp.* nas abelhas adultas. As médias de abundância não diferiram estatisticamente entre si nos tratamentos aplicados (Tabela 3). Em todos os tratamentos ocorreu um aumento dos esporos de *Nosema ssp.* na leitura feita após a aplicação dos tratamentos, possivelmente pela evolução da doença no apiário.

Tabela 3 – Numero médio de esporos de *Nosema ssp* por abelha adulta da espécie *A. mellifera*.

Esporos de <i>Nosema spp</i>	Com pólen Transgênico	Com pólen da linha isogênica	Sem pólen	Testemunha
Antes	2.630.000	940.000	2.930.000	1.480.000
Depois	3.890.000 a	3.740.000 a	5.270.000 a	3.740.000 a
Diferença	1.260.000 a	2.800.000 a	2.340.000 a	2.260.000 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV (%) = 53,4

5.4. Desenvolvimento das colônias

Não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos em relação ao desenvolvimento das colônias. Todas as variáveis apresentaram médias similares, as colônias apresentaram apenas um desenvolvimento regular devido à baixa oferta de flora apícola no momento das avaliações (Tabelas 4, 5, 6).

Mesmo em relação à quantidade de quadros utilizados exclusivamente para armazenamento de pólen não foram verificadas diferenças significativas, o que demonstra que as abelhas aceitaram o fornecimento do pólen transgênico e não transgênico (Tabela 7).

Tabela 4 – Numero médio de favos contendo crias (larvas e pupas) em colônias de *A. mellifera*.

Numero de favos de cria	Com pólen Transgênico	Com pólen da linha isogênica	Sem pólen	Testemunha
Antes	5,4	5,2	5,2	4,8
Depois	6,3	6,2	5,8	6,7
Diferença	0,80 a	1,20 a	0,60 a	1,80 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV (%) =15,33

Tabela 5 – Numero médio de favos contendo pólen armazenado em colônias de *A. mellifera*.

Numero de favos com pólen	Com pólen Transgênico	Com pólen da linha isogênica	Sem pólen	Testemunha
Antes	0,2	0,4	0,4	0,75
Depois	0,00 a	0,20 a	0,40 a	0,40 a
Diferença	-0,20 a	-0,20 a	0,00 a	-0,20 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV (%) =38,8

Tabela 6 – Numero médio de favos contendo mel (operculado) em colônias de *A. mellifera*

Numero de favos com mel	Com pólen Transgênico	Com pólen da linha isogênica	Sem pólen	Testemunha
Antes	1,6	2	2	2,6
Depois	1,40 a	1,00 a	1,60 a	1,40 a
Diferença	-0,20 a	-1,00 a	-0,40 a	-1,20 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV (%) =51,1

Tabela 7 – Numero médio de quadros contendo cera alveolada em colônias de *A. mellifera*.

Numero de quadros com cera alveolada	Com pólen Transgênico	Com pólen da linha isogênica	Sem pólen	Testemunha
Antes	1,2	1,8	1	0,4
Depois	0,80 a	1,40 a	1,40 a	0,00 a
Diferença	-0,40 a	-0,40 a	0,40 a	-0,40 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. CV (%) =29,9

Em relação à coleta do alimento fornecido as abelhas, verificou-se que as abelhas coletaram todo o alimento contendo pólen, indiferentemente se o alimento continha pólen do milho Bt ou da linha isogênica (Figura 12a). Ao contrário do que ocorreu com o alimento contendo levedura de cerveja e PTS, sendo verificado que as abelhas coletaram o xarope e deixaram restos sólidos do alimento (Figura 12b).



Figura 12 - Alimentador de colméia que recebeu alimento com levedura de cerveja e PTS apresentando resto de alimento, a seta demonstra os resíduos sólidos (a), Alimentador de colméia que recebeu alimento contendo pólen de milho Bt sem resíduos de alimento (b).

5.5. Detecção de proteína Cry1F nas larvas de *A. mellifera*

Verificou-se a presença da proteína Cry1F nas amostras de larvas de todas as colônias que receberam alimento contendo pólen de milho Bt, demonstrando que as abelhas utilizaram o alimento fornecido para alimentarem as larvas (Figura 13).

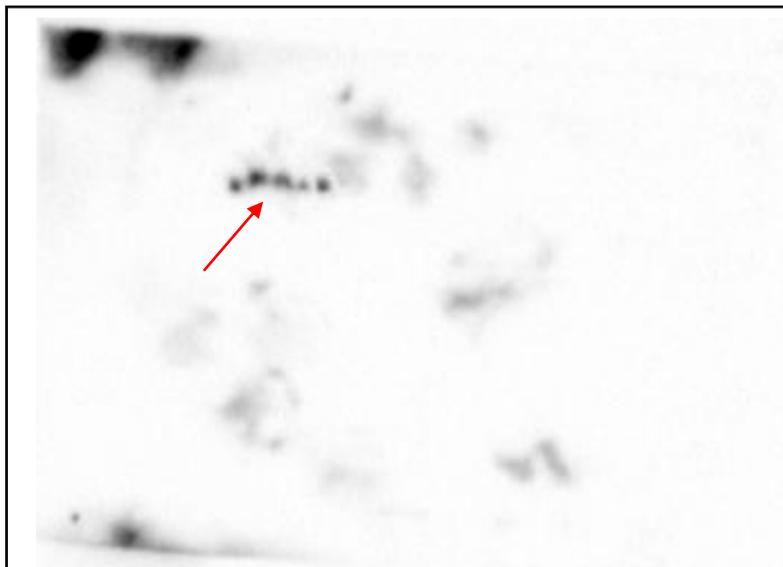


Figura 13 - Detecção de proteína Cry1F em larvas de *A. mellifera* em gel SDS-PAGE. A seta indica as amostras de larvas apresentando a proteína Cry1F.

5.6. Detecção e quantificação de proteína Cry1F no pólen

O uso das tiras QuickStix demonstrou a presença da proteína Cry1F nas amostras de pólen do milho Herculex e também possibilitou verificar que as amostras de pólen da linha isogênica não apresentavam contaminação com o pólen do milho Bt. A tira com apenas uma linha significa que não foi detectada a proteína Cry1F na amostra, sendo o resultado negativo (Figura 18a). Já a tira utilizada no pólen Bt possui duas linhas, demonstrando que a amostra possui a proteína Cry1F em sua composição (Figura 18b).

Para realizar a quantificação da proteína Cry1F foi utilizada a técnica Western Blotting. Através da metodologia aplicada foi possível detectar a presença da proteína Cry1F e também realizar sua quantificação. Também foi possível comprovar que as amostras de pólen da linha isogênica do milho Herculex não possuíam contaminação com a proteína Cry1F (Figura 14).



Figura 14 - Pólen do milho da linha isogênica não apresentando proteína Cry1F (a) Detecção de proteína Cry1F no pólen do milho Herculex® (b).

Os resultados demonstraram que a média das três amostras avaliadas foi de 2,4 ng. Também foi possível verificar que não havia nenhum traço da proteína Cry1F na amostra do pólen da linha isogênica (Figura 15). Transformando os valores em relação à diluição de pólen utilizada na reação, foi verificado que a concentração de proteína no pólen foi de 96 μg de Cry1F/g de pólen.

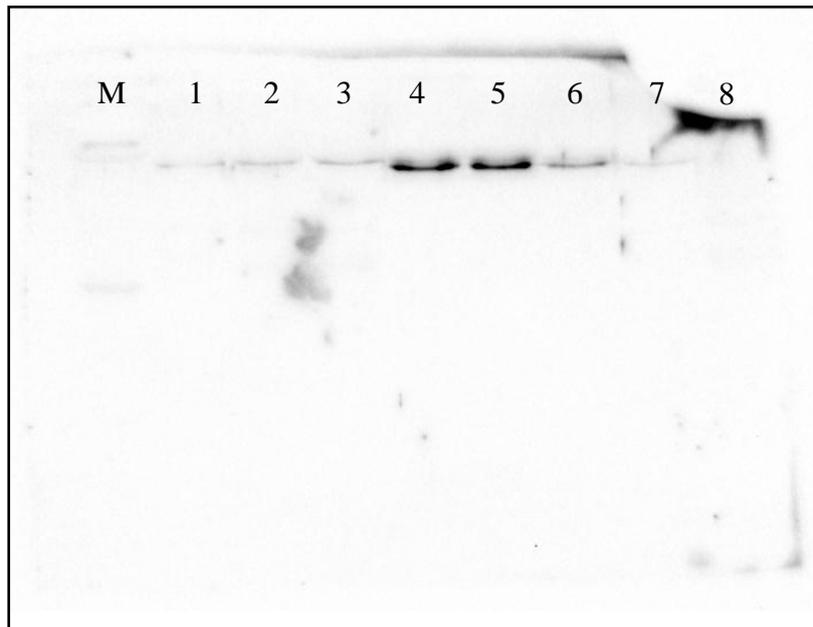


Figura 15 - Extratos de pólen de milho Bt e sua respectiva linha isogênica em gel SDS-PAGE em filme com 1min e 30s de exposição.

Legenda: Coluna M – marcador molecular, Colunas 1, 2 e 3 – extrato de pólen de milho Bt de diferentes datas de coleta, Colunas 4, 5, 6 e 7 – Controle positivo, proteína purificada Cry1F Abraxis em diferentes concentrações (15, 10, 5 e 2,5 ng), Coluna 8 – amostra de pólen da linha isogênica.

6. DISCUSSÃO

Este estudo sobre avaliação do impacto da alimentação com pólen de milho transgênico sobre a sanidade apícola pode ser considerado pioneiro, pois não foram encontrados trabalhos científicos relacionando os OGMs com o comportamento higiênico e infestação de ácaro *Varroa*. Estudos relacionados com o impacto do pólen de milho Bt normalmente são realizados em laboratório, avaliando os efeitos letais da proteína Cry sobre larvas e abelhas adultas individualmente.

Existe ainda uma grande escassez de trabalhos realizados a campo para analisar os efeitos subletais da proteína Cry sobre as abelhas. Siqueira *et al.*, (2004) avaliaram que os resultados encontrados em laboratório não podem ser extrapolados para condições de campo por se tratar de experimentos realizados com proteínas purificadas e em ambiente controlado, sendo necessário realizar trabalhos a campo para avaliar os níveis de exposição das abelhas a toxina, bem como verificar se estas permanecem ativas quando em contato com o inseto. Assim, o presente estudo foi feito diretamente em colméias a campo, visando dar robustez às inferências aqui apresentadas.

Foi verificado que existe diferença de efeitos entre o pólen Bt e aquele da sua respectiva linha isogênica, sendo que as colônias alimentadas com Bt obtiveram os piores índices de CH e infestação de *Varroa*. Além disso, o maior valor para a infecção de Nosemose foi verificado no tratamento contendo pólen de milho Bt, mesmo não sendo observadas diferenças significativas neste caso.

Estes resultados levantam questionamentos sobre a equivalência substancial solicitada pela proponente da tecnologia e aprovada pela CTNBio. Igualmente relevante neste sentido são os resultados obtidos no presente trabalho, que corroboram com os resultados alcançados por Bohn (2014), que rejeitou a hipótese de equivalência substancial em cultivares de soja, encontrando diferenças entre as variedades transgênicas, convencionais e cultivadas em sistemas orgânicos.

Os resultados também demonstraram que o pólen de milho Bt pode causar impactos sobre a sanidade apícola, devido à redução do índice de comportamento higiênico das abelhas. Após o fornecimento do alimento, as colônias não chegaram a reduzir o CH a níveis que as tornassem não higiênicas, mas a média das colônias alimentadas com pólen Bt, de 83,5%, chegou perto do limite para classificação das colônias como higiênicas considerado por Gramacho e Gonçalves (1997), que é de 80%.

Como citado por diversos autores, o CH é o principal mecanismo de defesa das abelhas contra ataques de pragas e doenças. Abelhas que apresentam alto índice de CH possuem maior resistência a Cria Pútrida Americana, Cria Pútrida Européia, Cria Giz, e também ao ácaro *Varroa destructor* (Moretto *et al* 1997). Oldrout (2007) verificou que apesar de o pólen Bt não apresentar efeitos letais sobre as abelhas, este pode causar algum grau de estresse que de alguma maneira aumenta a susceptibilidade das abelhas a ação de patógenos como bactérias, ácaros ou vírus. Esse estresse pode, segundo o autor, estar diretamente ligado à redução do comportamento higiênico, causado pelos efeitos subletais do pólen do milho Bt, podendo vir a provocar grandes impactos para a sanidade apícola.

Os resultados também demonstraram que a alimentação com pólen de milho Bt influenciou na infestação de ácaros *Varroa*. Foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que as colônias do tratamento com pólen Bt apresentaram os maiores índices de infestação. Seguindo a classificação descrita por Spivak & Reuter (2001), duas colônias do tratamento Bt foram classificadas como tolerantes, pois apresentaram índices de 7,9 e 5,8, respectivamente, as demais colônias podem ser classificadas como tolerantes ao ácaro, pois apresentaram índices abaixo de 5,0.

Os resultados observados não são suficientes para aferir se as abelhas se tornaram mais susceptíveis ao ácaro devido aos efeitos subletais do pólen e apresentaram redução da resistência ao mesmo, ou se reduziram a capacidade de detectarem e retirarem os ácaros de seus corpos devido à queda do comportamento higiênico. Segundo Message (1997) a resistência a esse ácaro é determinada por uma complexa interação de mecanismos, como o pequeno tamanho das células de cria, tempo reduzido de desenvolvimento da cria de operária, taxa de infertilidade do ácaro. Já De Jong (2003) verificou que o principal fator de resistência das abelhas ao acaro é comportamento higiênico. Estudos mostram que o comportamento higiênico é um dos mecanismos mais importantes para a sanidade apícola, sendo também o mais importante para as abelhas controlarem a infestação do ácaro no interior das colônias, tanto nas crias como nos indivíduos adultos.

A infestação de Nosemose não foi influenciada pelo fornecimento de pólen Bt, sendo que todas as colônias apresentavam índices similares. Mesmo antes da aplicação dos tratamentos as colônias apresentaram índice de infestação de esporos similar entre elas. O índice de infestação de Nosemose encontrado pode ser classificado como baixo para a realidade brasileira.

Estes resultados não corroboram com os resultados encontrados por pesquisadores da Universidade de Jena na Alemanha. Em seus estudos eles observaram que as abelhas infectadas por *Nosema ssp* e expostas a alimentos contendo pólen de milho da variedade Mon810 e da variedade Bt176 apresentavam maior índice de mortalidade que abelhas que não eram expostas a proteína Cry (KAATZ, 2005) . Ainda segundo os pesquisadores, o uso de antibióticos para combater a Nosemose não tinha efeito quando as abelhas eram expostas ao pólen do milho Bt. Segundo Sabugosa-Madeira (2009) esses resultados levaram o autor do trabalho a admitir a possibilidade da existência de uma interação da toxina Cry e o patógeno sobre o epitélio do intestino da abelha, tornando-a mais sensível à infecção.

O resultado das análises de detecção da proteína Cry1F nas larvas das colônias alimentadas com pólen Bt demonstrou que as abelhas utilizaram o pólen do milho Bt fornecido para alimentar as larvas. Isto corrobora com os resultados obtidos por Malone *et al* (2001), os quais verificaram que as abelhas não possuem capacidade de distinguir flores transgênicas de não transgênicas. Com o aumento das lavouras de variedades transgênicas e pela incapacidade de as abelhas distinguirem flores transgênicas, elas estão mais expostas a coletar pólen OGM contendo proteínas novas e estranhas ao ambiente das colônias (Sabugosa-Madeira *et al.*, 2009).

Após coletar o pólen as abelhas armazenam-no nas células dos favos para posteriormente utilizarem em sua alimentação e na das crias. Isso pode trazer outra implicação na ecologia das colônias, na redução da população de traças da cera das espécies *Achroia grisella* e *Galleria mellonella*.

Ainda existe uma discordância sobre a importância das traças da cera para as colônias de abelhas. Diversos autores descrevem as traças da cera como uma praga, causadora de danos aos favos, e prejudicial ao desenvolvimento das colônias. Porém, Sabugosa-Madeira *et al.* (2007) consideram que a traça da cera é um inseto benéfico para as colônias, atuando como recicladora de matéria orgânica dentro delas. Além de se alimentar de favos velhos, liberando espaço nas colméias, as traças também são responsáveis por consumirem a cera, larvas mortas e restos de alimento de colônias que morreram, evitando assim que eventuais focos de doenças sejam transmitidos quando abelhas visitam essas colméias para realizar a pilhagem (MELATHOPOULOS *et al.*, 2004)

Trevisan *et al.*, (2013) verificaram que o pólen do milho que expressa a proteína Cry1Ab causa a morte significativa de larvas de *Galleria mellonella*. Ainda em relação à

mortalidade de larvas de traça da cera, Harley *et al.*, (2003) verificaram que larvas de *G. mellonella* expostas ao pólen de milho que expressa a proteína Cry1F apresentaram mortalidade total.

Segundo pesquisadores, em colméias mortas com sintomas de DCC não é verificada a presença de traças da cera e também raramente são verificados casos de pilhagem por outras abelhas (OLDROYD, 2007). Latsch (2007) concluiu que nos favos abandonados pelas abelhas deve existir alguma substância tóxica para as traças da cera e também repelente para outros insetos como as abelhas.

Portanto, além dos efeitos subletais provocados pela exposição das abelhas ao pólen do milho que expressa a proteína Cry1F expostos no presente trabalho, existe a possibilidade de esta alimentação causar a mortalidade das traças presentes nas colméias. Este pode ser um grande indicio de que os OGMs podem ter importância para o DCC.

As colônias alimentadas com o pólen do milho Bt não apresentaram sinais de redução de desenvolvimento. Esse resultado pode ter ocorrido devido ao fato de o efeito subletal do pólen Bt não influenciar diretamente no desenvolvimento das abelhas, ou porque esse efeito só será verificado em longo prazo. Foram avaliados somente os efeitos em curto prazo, em um tempo que pode não ter sido suficiente para que a colônia apresentasse sinais de redução das atividades sociais das abelhas, como forrageamento, limpeza da colônia, alimentação das crias e postura da rainha. Normalmente as abelhas operárias que emergem iniciam suas atividades campeiras após vinte dias e este efeito desta nova população de abelhas que emergiu não foi observada pelas datas das avaliações após o tratamento.

Os resultados alcançados corroboram com trabalhos realizados por alguns autores, que também verificaram que o pólen de milho transgênico não influencia no desenvolvimento das colônias (Hanley *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004). Já Ramirez-Romero *et al.* (2008) observaram que tanto larvas como indivíduos adultos de *A. mellifera* alimentadas com pólen de milho Bt apresentaram uma mortalidade superior em relação àquelas alimentadas com pólen de milho não Bt, com aumento de 8% para 16%. A partir desses resultados o autor concluiu que o pólen transgênico pode causar impactos no desenvolvimento da colônia.

Trabalhos realizados em laboratório com larvas e abelhas adultas demonstram que o pólen Bt não possui efeitos letais sobre as abelhas, o que também foi verificado no presente trabalho. Em curto prazo as colônias não apresentaram redução do

desenvolvimento após a alimentação com pólen Bt, e não foram encontradas colônias mortas ou colméias abandonadas.

Apesar de verificar que, em curto prazo, o pólen de milho Bt atua negativamente sobre a sanidade das colônias, reduzindo o comportamento higiênico e elevando a infestação de ácaro *Varroa destructor*, não é possível, a partir dos resultados, inferir se em longo prazo esses impactos poderão causar uma redução mais acentuada no CH e um aumento da infestação de *Varroa* a um nível que torne as colônias intolerantes. Entretanto, o efeito adverso nas colônias de abelhas foi detectado, e seria importante o monitoramento em apiários próximos de cultivos com variedades transgênicas.

Foi verificado que as abelhas possuíam maior preferência pela alimentação contendo pólen, não importando se era com pólen Bt ou da linha isogênica, em relação ao alimento contendo proteína texturizada de soja (PTS), já que foi verificada, a cada novo fornecimento de pólen, a presença de resto de alimento contendo PTS nos alimentadores, o que não foi verificado nas colônias que receberam alimento contendo pólen.

Os resultados alcançados neste trabalho contribuem para elucidação dos riscos dos OGM sobre insetos não alvos, pois como verificado por Kaiser *et al.* (2001), poucos estudos têm investigado os efeitos subletais de proteína Bt em insetos não-alvo. Os efeitos subletais da proteína Cry não causam a morte das abelhas instantaneamente, mas em longo prazo podem prejudicar sua sanidade já que envolvem a redução do CH, mecanismo importante de defesa das abelhas contra pragas e doenças, que quando reduzido torna as abelhas mais vulneráveis ao ataque de pragas e doenças, as quais podem vir a morrer. O resultado deste trabalho não possibilitou correlacionar o impacto do pólen Bt e o DCC, pois não foram verificadas colônias mortas ou mesmo que abandonaram as colméias. Porém a redução do CH, o aumento da infestação de *Varroa*, podem favorecer a ocorrência deste fenômeno, sendo que diversos autores como Message, (2007) relacionam essas variáveis com o DCC.

Outro motivo apontado pelos pesquisadores como causa do DCC é o aumento do uso de agrotóxicos nas lavouras. Porém, Ramirez-Romero *et al.* (2005,2008) verificaram em seus estudos que o Imidaclopride, um neonicotinoide, não apresentou efeitos tão duradouros e nocivos para as abelhas quanto àqueles provocados pela exposição às endotoxinas Cry do *Bacillus thuringiensis*. Apesar de não existirem comprovações científicas do efeito letal das endotoxinas Bt para as abelhas, diversos autores verificaram efeitos deletérios em abelhas quando alimentadas com pólen de milho Bt ou mesmo com

a proteína Cry purificada (Vandenberg e Shimanuki, 1986; Vandenberg, 1990; Ramirez-Romero *et al*, 2005, 2008)

Embora os efeitos adversos sobre a sanidade apícola tenham sido quantificados, no presente trabalho não foi possível identificar quais substâncias presentes no milho Bt seriam responsáveis pelos efeitos adversos encontrados. A hipótese que surge é a composição tóxica expressa pela proteína Cry1F para insetos não-alvo, em razão da existência de literatura científica para tal. Alternativamente, fatores nutricionais ou mesmo outras proteínas produzidas pelo milho transgênico, e não pela sua contraparte (linha isogênica) tem sido verificado em diversos artigos (HEINEMANN *et al.*, 2013; AGAPITO-TENFEN *et al.*, 2013; BOHN *et al.*, 2014). Entretanto, tais novas proteínas ainda não foram suficientemente estudadas em termos de efeitos adversos a organismos não alvos das variedades de plantas transgênicas. Desta forma, este estudo ainda abre novos desafios para a pesquisa sobre a biossegurança dos OGMs.

Finalmente, este estudo contribui para o melhor entendimento dos tipos de riscos que devem ser avaliados antes da liberação de uma variedade de planta transgênica. Espera-se que as autoridades regulatórias levem em conta nas decisões que tomarão os resultados obtidos neste estudo. Esta contribuição é também um dos objetivos do ECOLGEN, Núcleo Latino Americano de Ecologia do Genoma e Biodiversidade (The Latin American Group/Institute for Genome Ecology and Biodiversity), vinculado a UFSC e dedicado ao estudos dos biorriscos dos OGMs.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho 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 *V. destructor* em abelhas adultas.

Não foram verificadas diferenças significativas em relação ao desenvolvimento das colônias (numero de favos de cria, de mel e de pólen) e à infestação de *N. ceranae*.

No presente trabalho não foi possível identificar qual a causa dos impactos do pólen de milho Bt sobre as abelhas, se é devido a diferenças nutricionais entre o milho Bt e a sua respectiva linha isogênica ou se é devido à presença de substâncias tóxicas oriundas da expressão da proteína Cry1F no pólen.

Os resultados não são suficientes para associar os impactos do pólen do milho Bt sobre as abelhas à ocorrência da Desordem do Colapso das Colônias. Porém, o aumento da vulnerabilidade ao ataque de pragas, como no caso do parasitismo de *Varroa destructor*, pode ser um indicativo desta relação, como observado por diversos autores que o descrevem como uma das causas do fenômeno.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Novos trabalhos devem ser realizados visando elucidar a causa do impacto do pólen do milho Bt sobre a sanidade apícola, os quais devem realizar novas avaliações dos fatores do presente trabalho, com maior intervalo após o fornecimento do alimento e com maior duração.

Também se faz necessária a realização de análises da composição nutricional e da presença de substâncias tóxicas para abelhas *A. mellifera* no pólen do milho TC 1507.

O protocolo de alimentação utilizado permitiu detectar os impactos da alimentação com pólen do milho Bt sobre as colônias de *A. mellifera*, sendo possível em novos trabalhos, avaliar os impactos de diferentes doses de pólen, tempos de exposição e também a utilização de pólen de outras cultivares transgênicas, visando assim elucidar melhor as causas dos impactos do pólen de milho geneticamente modificado (Bt) sobre a sanidade apícola.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAPITO-TENFEN, S. Z.; GUERRA, M.P.; WIKMARK, O.; NODARI, R. O. Comparative proteomic analysis of genetically modified maize grown under different agroecosystems conditions in Brazil. **Proteome Science**, 2013.

BAKONYI, G., POSTA, K., KISS, I., FÁBIÁN, M., NAGY, P, NOSEK, J.N. Density-dependent regulation of arbuscular mycorrhiza by collembolan, **Soil Biol. Biochem.** 34: 661-664. 2002

BOHN, T.; CUHRA, M.; TRAAVIK, T.; SANDEN, M.; FAGAN, J.; PRIMICERIO, R. Compositional differences in soybeans on market: Glyphosate accumulates in Roundup Ready GM Soybeans. **Food Chemistry**. v.153, p. 207-215, 2014.

BOTTA, E., H. CARMENATE & P.E. TORRE. Varroasis, peligrosa enfermedad de la abeja melífera. **Fitosanidad**, 8: 73-79. 2014

CANTWELL. G.E. Standard methods for counting nosema spores. **American Bee Journal**. 110 (6), 222-223, 1970.

CALDERONE, N.W. Integrated pest management Varroa destructor in the Northeastern United States using drone brood removal and formic acid. **Cornell University Master Beekeeper Program**. 2002

CELLINI, F.; CHESSON, A.; COLQUHOUN, I.; CONSTABLE, A.; DAVIES, H.V.; ENEGEL, K. H. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. **Food Chemistry Toxicology**. v 42:1089–1125, 2004.

CHEN, Y., SMITH, I. B., Jr, COLLINS, A. M., PETTIS, J. S. & FELDLAUFER, M. F. Detection of deformed wing virus infection in honey bees, *Apis mellifera* L., in the United States. **Am Bee J** 144, 557–559. 2004

CHEN, Y., EVANS, J.D., SMITH, I.B., PETTIS, J.S., Nosema ceranae is a long-present and wide-spread microsporidean infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States, **J. Invertebr. Pathol.** 97, 186-188, 2008.

DE JONG, D., DE JONG, P. H. & Goncalves, L. S.. Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. **J Apic Res** 21, 165–167. 1982

DE JONG, D. O valor da abelha na produção mundial de alimento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 13, Florianópolis, SC, **Anais...2000**. CD-ROM.

DE JONG, D.; MESSAGE, D. New and exotic disease threats for Brazilian bees. In: **Encontro sobre abelhas**, 8, Ribeirão Preto, SP, **Anais...2008**.

DGV - DIREÇÃO GERAL DE VETERINÁRIA. Doenças das abelhas – diagnóstico, tratamento e profilaxia. Lisboa: **Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas**. 2008.

DOYLE; DOYLE, J. L. *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1988.

DOW AGROSCIENCES. Perguntas sobre o HERCULEX. <http://www.dowagro.com/br/herculex/faq/>. (Acessado em 24/07/2012)

EMBRAPA MEIO-NORTE. Desordem do Colapso das Colônias (DCC) <http://www.cpamn.embrapa.br/apicultura/desordemColapso.php>. (Acessado em 10/08/2012)

FERRÉ, J. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. In. LELLEY, T.; BALÁZS, E.; TEPFER, M. (eds.). **Ecological Impact of GMO Dissemination in Agro-Ecosystems**. Austria: Facultas Verlag und Buchhandels AG. 2002, 218p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Reducing Poverty and hunger: The Critical Role of Financing For Food, Agriculture and Rural Development**. FAO. 2002.

FORSGREN, E, FRIES, L. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. **Vet. Parasitol.** 170, 212-217. 2010

FRIES I., EKBOHM G., VILLUMSTAD E. *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield. **J.Apic.Res.** 23: 102-105. 1984

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

GRAMACHO, K, P Estudo do comportamento higienico em *Apis mellifera* como subsidio a programas de selecao e melhoramento genetico em abelhas. **Tese (mestrado)** – Faculdade de Filosofia, Ciencias e Letras de Ribeirao Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995. 106p

GRAMACHO, K, P, Fatores que interferem no comportamento higienico das abelhas *Apis mellifera*, **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Filosofia, Ciencias e Letras de Ribeirao Preto. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

GRAMACHO, K, P, GONCALVES, L, S A comparative study of hygienic behaviour in several honey bee races. In **INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY**, 20. Proceedings. Firenzy, Italy, 1996 p. 445

GRAMACHO, K.P.; GONÇALVES, L.S. Fatores que interferem nas atividades de abelhas *Apis mellifera* relacionadas ao comportamento higiênico. IN: **ENCONTRO SOBRE ABELHAS**, 4, 2000, Ribeirão Preto. Anais... Ribeirão Preto, SP: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pp. 58-65, 2000.

HENDRIKSMA, H. P.; HARTEL, S.; STEFFAN-DEWENTER. Testing pollen of single and stacked insect-resistant Bt maize on in vitro reared honey bee larvae. **Plos One** v. 6 (12). 2011.

HEINEMAMM, J. A.; AGAPITO-TENFEN, S. Z.; CARMAN, J. A.; A comparative evaluation of the regulation of GM crops or products containing dsRNA and suggested improvements to risk assessments. **Environment International**, v. 55, p 43-55, 2013

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

HIGES M; MARTÍN-HERNÁNDEZ R; GARRIDO-BAILÓN E; BOTÍAS C; GARCÍA-PALENCIA P; MEANA A Regurgitated pellets of *Merops apiaster* as fomites of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores. **Environmental Microbiology** 5: 1374-1379, 2008

HIGES M, MARTIN-HERNANDEZ R, Meana a *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. **Apidologie** 2010, 41:375-392.

HILBECK, A.; SCHMIDT, J.E.U. Another view on Bt Bt proteins: how specific are they and what else might they do? **Biopestic Int.**, v. 2, n. 1, p. 1–50. 2006.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.**, v. 53, p. 242–255. 1989.

IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C. UV–photoinactivation of cells and spores of *Bacillus thuringiensis* and effects of peroxidase on inactivation. **Environ. Entomol.**, v. 7, p. 270–272. 1978.

KAATZ, H.-H. Effects of Bt maize pollen on the honeybee. **Jena University, Institute of Nutrition and Environment**. 2005.

KUIPER RP, SCHEPENS M, THIJSSSEN J, VAN ASSELDONK M, VAN DEN BE, BRIDGE J *et al*. Upregulation of the transcription factor TFEB in t(6;11)(p21;q13)-positive renal cell carcinomas due to promoter substitution. **Hum Mol Genet** 12: 1661–1669, 2003.

LATSH, G. Collapsing Colonies: Are GM Crops Killing Bees? **International – SPIEGEL ONLINE** – News. 2007. <http://www.spiegel.de/international/word/0,1518,473166,00.html> (Acesso em 15/08/2012).

L. ANNE MALONE, E. PHYLLIS, J. BURGESS, D., STEFANOVIC. Effects of a *Bacillus thuringiensis* toxin, two *Bacillus thuringiensis* biopesticide formulations, and a soybean trypsin inhibitor on honey bee (*Apis mellifera* L.) survival and food consumption **Apidologie**. 30, 465-473, 1999

LARSSON J.I.R. Fixation of microsporidian spores for electron microscopy, **J. Invertebr. Pathol.** 90, 47–50, 2005

LE CONTE, Y., ELLIS, M., RITTER, W. Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the economy losses? **Apidologie**, 41, 353-363. 2010.

LIMA, C. S. S. PIRES, R. N. C. GUEDES, E. Y. T. NAKASU, M. S. LARA, E. M. G. FONTES, E. R. SUJII, S. C. DDIAS & L. A. O. Campos. Does Cry1Ac Bt-toxin impair development of worker larvae of Africanized honey bee. **J. Appl. Entomol.** 135 (2011) 415–422. 2010

MALASPINA, O.; SOUZA, T. F. Reflexos das aplicações de agrotóxicos nos campos de cultivo para a agricultura brasileira. In: **Congresso brasileiro de apicultura, 17 e de meliponicultura, 3**, Belo Horizonte, MG, Anais...2008.

MALASPINA, O.; SOUZA, T. F.; ZACARIN, E. C.; CRUZ, A. S.; JESUS, D. Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. In: **Encontro sobre abelhas, 8**, Ribeirão Preto, SP, Anais...2008.

MALONE, L., PHAM-DÈLÈGUE, M. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). **Apidologie**, 32, 287-304, 2001.

MELATHOPOULOS, A.; NELSON, D.; CLARK, K. HIGH. Velocity electron-beam radiation of pollen and comb for the control of *Paenibacillus* larvae subspecies larvae and *Ascophaera apis*. **American Bee Journal**, San Antonio, v. 144, p. 714-720, 2004

MESSAGE, D. Management and disease problems of africanized bees in Brazil. Londres: **The Central Association Of Bee-Keepers**, 1997. 15p.

MESSAGE, D. Colmeias vazias. **Ciencia Hoje**. V. 241, p. 50-55, 2007.

MESSAGE, D. Efeito de condicoes ambientais no comportamento higienico em abelhas africanizadas *Apis mellifera*. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Filosofia, Ciencias e Letras de Ribeirao Preto, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1979. 136p.

MESSAGE, D, GONCALVES, L, S. Efeito das condicoes climaticas e da colonia no comportamento higienico em abelhas *Apis mellifera* (Africanizadas) In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 5; CONGRESSO LATINO-IBERO-AMERICADO DE APICULTURA, 3**, Vicoso, 1980. Anais... Vicoso, Editora Imprensa Universitaria da UFV. 1980 p 140-141

METZDORFF, S. B., KOK, E. J., KNUTHSEN, P., PEDERSEN, J. Evaluation of a Non-Targeted “Omic” Approach in the Safety Assessment of Genetically Modified Plants. **Plant Biology**, v.8, p.662–672, 2006.

MOMOT, J, P. ROTHENBUHLER, W, C. Behavior genetics of nest cleaning in honeybees VI Interactions of age and genotype of bees and nectar flow. **Journal of Apicultural Research**. V. 10 p 11-21, 1971

MORETTO, G.; GONÇALVES, L. S.; DE JONG, D.. Relationship between food availability and the reproductive ability of the mite *Varroa jacobsoni* in africanized bee colonies. **American Bee Journal** , 67-69, 1997

MORETTO, G.; GONÇALVES, L. S.; DE JONG, D.. Relación entre la disponibilidad de alimento y la habilidad reproductiva del ácaro. **Vida Apícola** , n° 78 , 45-47, 1996

MORETTO, G. Estudos de algumas variáveis relacionadas a um mecanismo de defesa de operarias de *Apis mellifera* a Varroatose e a taxa de reprodução do acaro *Varroa jacobsoni*. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993 115p.

MURILHAS, A., CASACA, J. Conviver com a *Varroa* em Portugal – um contributo para a adopção de boas práticas apícolas de convivência com a *Varroa*. **AVAPInt – apicultura, varrose, ambiente e protecção integrada**. Évora: Universidade de Évora, 2004.

NEWTON, D. C.; OSTASIEWSKI, Jr., N. J. A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Am. Bee J.**, v. 126, n. 4, p. 278-281, 1986.

OLDROYD, B. What’s Killing American Honey Bees? **PLOS Biology**, 5: e-168. 2007.

PARK, O, W.; PELLET, F; PADDOCK, F, B. Disease resistance and American foulbrood. **American Bee Journal**, v. 77, p 20-25, 1937

PELLETIER, L.; BROWN, A.; OTRYSKO, B. McNEIL, J.N. Entomophily of the Cloudberry (*Rubus chamaemorus*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.101, 2001.

PÍAS, B.; GUITIÁN, P. Breeding System and Pollen limitation in the masting tree *Sorbus aucuparia* L. (Rosaceae) in the NW Iberian Peninsula. **Acta Oecologica**, v.29, n.1, p. 97-103, 2006.

PIONNER. Biotecnologia
<http://www.pioneersementes.com.br/ProdutosBiotecnologiaMilhoBTDesenvolvimento.aspx>
(Acessado em 28/07/2012)

PINTO, M. R.; MIGUEL, W. Mortalidade de abelhas *Apis mellifera* em Santa Catarina: intoxicação por inseticidas carbamatos. **35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária – CONBRAVET**, Gramado – RS. 2008.

PINTO, M.R.R. Alimentação de *Apis mellifera* africanizadas : relação com a fisiologia, produção, sanidade e segurança alimentar. **Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pelotas**. Pelotas, 2010.

RAMIRES-ROMERO, R.; CHAUFU, J.; PHAM-DÉLÈGUE, M. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honey bee *Apis mellifera*, a comparative approach. **Apidologie**, v. 36, p. 601-611, 2005

RAMIREZ-ROMERO, R.; DESNEUX, N.; DECPURTYE, A.; CHAFFIOL, A.; PHAM-DÉLÈGUE, M. Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera, Apidae*)? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, p. 327-333, 2008.

RICROCH, A. E.; BERGE, J. B.; et al. Evaluation of Genetically Engineered Crops Using Transcriptomic, Proteomic, and Metabolomic Profiling Techniques. **Plant Physiology** 155(4): 1752-1761, 2011.

ROSENKRANZ, P., AUMEIER, P., ZIEGELMENN, B. Biology and control of *Varroa destructor* [abstract]. **Journal of Invertebrate Pathology**, 103, 96-119. 2010.

ROTHENBUHLER, W.C. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F1 and backcross generations to disease-killer brood. **American Zoology**, 4: 11-123, 1964

SABUGOSA-MADEIRA, J. B.; ABREU, I. O pólen de milho geneticamente modificado. Implicações no desequilíbrio ecológico das colméias. **Revista Real Academia Galega de Ciencias**. Santiago de Compostela, v. 28, p. 71-85, 2009.

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

SANDERS, P.R., LEE, T.C., GROTH, M.E., ASTWOOD, J.D., FUCHS, R.L. Safety assessment of insect-protected corn. In: Thomas, J.A. (Ed.), **Biotechnology and Safety Assessment 2nd ed. Taylor and Francis**, Philadelphia, pp. 241, 1998.

SAMEJIMA, H. MARZUKI, M.; NAGAMITSU, T. NAKASIZUKA, 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.

SCHMIDT, J.; BRAUN, C.; WHITEHOUSE, L.; HILDEBECK, A. Effects of activated Bt Bt transgene products (Cry1Ab, Cry3Bb) on immature stages of the ladybird *Adalia bicinctata* in laboratory ecotoxicity testing. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, 56, 221-228, 2009

SHAPIRO, L. (2011). *Varroa destructor* Anderson & Trueman, Acessado em Ago. 5, 2014, disponível em <http://eolspecies.lifedesks.org/pages/2307>, 2000.

SIQUEIRA, J. O.; TRANNIN, I. C. B.; RAMALHO, M. A. P.; FONTES, E. M. G. Interferências no agrossistema e riscos ambientais de culturas transgênicas tolerantes a herbicidas e protegidas contra insetos. **Caderno de Ciências e Tecnologia**. Brasília, v. 21, p. 11-81, 2004

SOMERVILLE, D., HORNITZTY, M., Nosema Disease. **Primefact**, 699. 2007

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

SPIVAK, M. Impactos do desaparecimento das abelhas no cenário internacional. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 17 E DE MELIPONICULTURA**, 3, Belo Horizonte, MG, Anais 2008.

STOCKTAD, E.. The case of the empty hives. **Science**, 316: 970-972, 2007.

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

THOMPSON, V. C. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees III. Effect of age of bees of a resistant line on their response to disease-killed brood. **Journal of Apicultural Research**, 3: 25-30, 1964.

Z. LIPINSKI, M. FARJAN, K. ŻOLTOWSKA, B. POLACZEK. Effects of Dietary Transgenic *Bacillus thuringiensis* Maize Pollen on Hive Worker Honeybees. **Polish J. of Environ. Stud.** Vol. 17, No. 6, 957-96, 2008.

WHITAKER, J., SZALANSKI, A.L, KENCE, M., Molecular detection of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* from Turkish honey bees. **Apidologie** 41, 364-374, 2010

WOODROW, W. A; HOLST, E. C. The mechanism of colony resistance to American foulbrood. **Journal of Economic Entomology**, 35 (3): 327-330, 1942.

YE X, AL-BABILI S, KLÖTI A, ZHANG J, LUCCA P, BEYER P, POTRYKUS I Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid free) rice endosperm. **Science** 287: 303-305, 2000.