



**Protocolo para avaliação dos efeitos de proteínas tóxicas a insetos-praga sobre a abelha sem ferrão *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina)**

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 197***

**Protocolo para avaliação dos efeitos de  
proteínas tóxicas a insetos-praga sobre a  
abelha sem ferrão *Trigona spinipes*  
(Hymenoptera, Apidae, Meliponina)**

Maria Augusta Pereira Lima<sup>1</sup>  
Marcelo dos Santos Lara<sup>2</sup>  
Lucio Antonio de Oliveira Campos<sup>3</sup>  
Erich Y.T. Nakasu<sup>4</sup>  
Simoni C. Dias<sup>5</sup>  
Claúdia Brod<sup>6</sup>  
Edison R. Sujii<sup>7</sup>  
Eliana M. G. Fontes<sup>8</sup>  
Carmen S. S. Pires<sup>9</sup>

*Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*  
Brasília, DF  
2007

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –  
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-  
3624 <http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*  
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*  
Membros: *Arthur da Silva Mariante*  
*Maria de Fátima Batista*  
*Maurício Machain Franco*  
*Regina Maria Dechechi Carneiro*  
*Sueli Correa Marques de Mello*  
*Vera Tavares de Campos Carneiro*  
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*  
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*  
Editoração eletrônica: *Daniele Alves Loiola*

Legenda da foto: *Trigona spinipes*  
Autoria da foto: Carolina F. Cardoso

1ª edição  
1ª impressão (2007):

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

P 967 Protocolo para avaliação dos efeitos de proteínas tóxicas a insetos-praga sobre a abelha sem ferrão *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina) / Simoni C. Dias ... [et al.]. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.  
29 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 197).

1. *Trigona spinipes* - abelha sem ferrão. 2. Abelha sem ferrão - toxicidade de proteínas - OGMs. 3. Toxina Cry1Ac - algodão GM - resistente a insetos. I. Dias, Simoni C. II. Série.

632.96 - CDD 21.

## Protocolo para avaliação dos efeitos de proteínas tóxicas a insetos-praga sobre a abelha sem ferrão *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina)

---

Maria Augusta Pereira Lima<sup>1</sup>  
Marcelo dos Santos Lara<sup>2</sup>  
Lucio Antonio de Oliveira Campos<sup>3</sup>  
Erich Y.T. Nakasu<sup>4</sup>  
Simoni C. Dias<sup>5</sup>  
Claúdia Brod<sup>6</sup>  
Edison R. Sujii<sup>7</sup>  
Eliana M. G. Fontes<sup>8</sup>  
Carmen S. S. Pires<sup>9</sup>

### Resumo

Técnicas de engenharia genética oferecem oportunidade para a criação de plantas resistentes a insetos devido a síntese de proteínas entomotóxicas. Visando avaliar a biossegurança de algodão transgênico resistente a insetos-praga sobre polinizadores, foi desenvolvido método de bioensaio para larvas de *Trigona spinipes*, abelha silvestre de ampla ocorrência em flores de algodão no Brasil, utilizando a proteína Cry1Ac como modelo. Desenvolveu-se protocolo de criação das larvas em condições controladas de laboratório, usando o alimento natural das abelhas. A partir do alimento larval, coletado em diferentes ninhos, avaliou-se a proporção de pólen para estimar a quantidade de proteína GM que potencialmente poderia ser ingerida pelas abelhas em condições de campo. Mediu-se o pH do alimento para verificar se a atividade da proteína poderia ser alterada por esse fator. A atividade das toxinas após incorporação no alimento natural das abelhas foi comprovada em bioensaio desenvolvido para esse fim, utilizando larvas da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, inseto susceptível à toxina Cry1Ac. Inicialmente foram utilizadas cúpulas de plástico para criação das abelhas, resultando na morte precoce das larvas. Entretanto, obtivemos sucesso mantendo-as em cúpulas de cera natural utilizando placas de ELISA como suporte. Cada cúpula foi preenchida com 36µl de alimento e ovo provenientes dos mesmos ninhos. Bioensaios foram montados com abelhas submetidas a três tratamentos, com cinco repetições cada (40 ovos/repetição): (i) alimento larval + água destilada e autoclavada; (ii) alimento larval + água destilada e autoclavada + Cry1Ac (18µg/larva) e (iii) alimento larval puro (controle). A mortalidade e o desenvolvimento das abelhas foram monitorados diariamente. O protocolo de criação de operárias obteve resultados satisfatórios (91% de sobrevivência no controle). Análises estatísticas não demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos em relação à mortalidade, longevidade e massa corporal dos adultos. Bioensaios com rainhas não obtiveram resultados satisfatórios, devido à alta mortalidade das larvas. A metodologia desenvolvida para criação de operárias é adequada para estudos de toxicidade de proteínas entomotóxicas sobre larvas de *T. spinipes*. Os resultados obtidos indicam que Cry1Ac é segura para *T. spinipes*, embora sejam necessários estudos com rainhas.

Palavras-chave: plantas transgênicas; Cry1Ac; abelhas sem ferrão; bioensaios.

---

<sup>1</sup> Doutoranda em Entomologia, UFV

<sup>2</sup> Graduando de Engenharia Ambiental, UFV

<sup>3</sup> Biólogo, Ph.D., Depto. de Biologia Geral – UFV

<sup>4</sup> Graduando de Biologia, Centro Universitário de Brasília

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D., Universidade Católica de Brasília

<sup>6</sup> Eng. Agr., Embrapa Cenargen

<sup>7</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Cenargen

<sup>8</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Cenargen

<sup>9</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Cenargen

## Abstract

Genetic engineering techniques offer opportunities for the creation of insect-resistant plants due to the synthesis of entomotoxical proteins by plants. To evaluate the biosafety of GM cotton to pollinators, it was developed bioassay methods for rearing *Trigona spinipes* larvae, wild bee commonly found in cotton flowers in Brazil, using Cry1Ac protein as model. Protocols of brood rearing were developed using laboratory controlled conditions and natural bee food. Larval food was collected in different nests and had the percentage of pollen analyzed, to estimate the quantity of GM protein could be eaten by bees in field conditions. Larval food pH was also evaluated, to verify if protein activity could be affected by this factor. Toxin activity, after been added in larval bee food, was tested by bioassays with *Anticarsia gemmatalis*, a soybean pest susceptible to Cry1Ac. At the beginning, plastic domes were used for bee rearing, resulting in precocious larvae death. However, we had success keeping larvae inside domes of natural wax, using Elisa plates as support for them. Each dome received 36µl of food and an egg, both collected in the same nest. Bioassays had bees exposed to three treatments, with 5 replicates each one (40 eggs/replicate): (i) larval food + sterile water; (2) larval food + sterile water + Cry1Ac (18µg/larva) and (iii) pure larval food (control). Bee mortality and development were monitored daily. Brood rearing methods were well succeeded (91% of survival in control). Statistical analyses showed that the three treatments are equal in relation to mortality, longevity and corporal body mass of adults. Bioassays for queen rearing were not well succeeded, due to high mortality of larvae. The methodology developed for workers rearing was satisfactory for toxicological studies of entomotoxic proteins using *T. spinipes* larvae. Results shows that Cry1Ac is safe for *T. spinipes*, but studies with queens are necessary.

Keywords: transgenic plants; Cry1Ac; stingless bees; bioassays.

## Introdução

O desenvolvimento de técnicas de engenharia genética oferece oportunidade para a criação de plantas resistentes a insetos devido à inserção e expressão, naqueles organismos, de genes responsáveis pela síntese de proteínas entomotóxicas (JOUANIN et al., 1998). Uma das principais preocupações ecológicas relacionadas às culturas transgênicas resistentes a insetos-praga está associada aos possíveis efeitos deletérios sobre organismos não-alvo (MICHELLE, 2001).

As primeiras plantas transgênicas resistentes a insetos foram desenvolvidas com o uso de genes que codificam proteínas entomotóxicas derivadas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt). Mais recentemente, interesses científicos e comerciais sobre culturas resistentes a insetos têm sido focados, principalmente, em plantas Bt (MALONE et al., 2001). O uso de plantas modificadas com genes de Bt apresenta inúmeros benefícios, como ausência de toxicidade sobre humanos e animais domésticos, redução do uso de inseticidas químicos, eficiência no controle de insetos alvo ocasionando maior produtividade, preservação de insetos benéficos como inimigos naturais e redução de doenças fúngicas transmitidas às plantas por insetos praga (BOBROWSKI et al., 2003).

O algodão transgênico Bollgard® (Bt), comercializado pela Monsanto a partir de 1996, tem sido apontado como uma tecnologia revolucionária no combate a insetos-praga dessa cultura (AGI et al., 2001). Na China, por exemplo, o algodão Bt resultou em uma diminuição drástica no uso de inseticidas e ocasionou, em alguns plantios, o aumento das populações de insetos benéficos (WU e GUO, 2005). Essa variedade transgênica expressa a proteína Cry1Ac, tóxica a várias espécies de Lepidoptera que causam importantes danos à cultura algodoeira (AGI et al., 2001).

Apesar das lagartas de Lepidoptera se alimentarem somente de folhas, o promotor mais utilizado em plantas transgênicas é constitutivo, ocasionando a expressão da entomotoxina em todos os tecidos vegetais (GROSSI-DE-SÁ e ROMANO, 2003). Vários tecidos do algodão transgênico expressam a toxina Cry1Ac (GREENPLATE, 1997, 1999), aumentando a possibilidade de que artrópodes não-alvo entrem em contato com as proteínas inseticidas. Portanto, as análises de risco do algodão Bt devem envolver estudos a respeito de possíveis efeitos das proteínas sobre os organismos associados aos plantios.

Os polinizadores constituem um dos grupos de insetos benéficos que pode ser prejudicado em consequência da ingestão de pólen e néctar de plantas GM. Esses animais são fundamentais para o funcionamento de quase todos os ecossistemas terrestres, incluindo

agroecossistemas (KEVAN, 1999). Portanto as análises de risco de plantas transgênicas devem incluir investigações sobre prováveis efeitos em espécies que auxiliam na reprodução cruzada das plantas.

Importantes visitantes florais de plantas nativas e cultivadas, as abelhas são polinizadores chave em regiões tropicais (CANE, 2001), além de serem os principais polinizadores da maioria das culturas agrícolas (KEVAN, 1999). A exposição, direta ou indireta, de abelhas às substâncias produzidas por plantas GM pode ocasionar danos a esses insetos. Efeitos diretos podem surgir após a ingestão de proteínas inseticidas expressas pelas plantas; indiretos podem ser consequência de alterações no fenótipo da planta devido à introdução do transgene (MALONE e PHAM-DELÈGUE, 2001).

As avaliações de toxicidade de produtos transgênicos inseticidas sobre abelhas realizadas, até o momento, foram desenvolvidas com um pequeno número de espécies. Devido ao seu grande valor como polinizador, além da importância econômica, vários trabalhos verificaram se essas toxinas oferecem riscos à abelha *Apis mellifera* (MALONE e PHAM-DELÈGUE, 2001) (revisado por). Além disso, poucos estudos abordaram sobre metodologias para testes em larvas (BANBENDRIER et al., 2004), período no qual provavelmente as abelhas estarão, em condições de campo, mais expostas às proteínas GM, devido ao maior consumo de pólen do que durante a fase adulta.

Dentre as abelhas, os meliponíneos (Hymenoptera, Apidae, Meliponina) – conhecidos popularmente como “abelhas sem ferrão” (NOGUEIRA-NETO, 1970) – destacam-se pela riqueza e abundância de espécies, que habitam regiões tropicais do mundo e subtropicais da América do Sul (SILVEIRA et al., 2002). Slaa et al. (2000) verificaram que as abelhas sem ferrão podem ser polinizadores efetivos em plantações, tornando-se uma alternativa importante, em relação às abelhas melíferas, para a polinização comercial.

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

*Trigona spinipes* tem sido uma das espécies de meliponíneos mais abundantes em flores de algodão em diferentes localidades do Brasil (PIRES et al., 2006). O número de indivíduos nos ninhos é bastante grande, podendo chegar a 180 mil, fazendo com que a existência de apenas uma colônia em determinado local seja suficiente para torná-la mais abundante nas flores do que outras abelhas (ALMEIDA e LAROCCA, 1988). Recursos florais podem ser coletados pelas operárias a distâncias consideráveis, pois o raio de forrageamento ao redor

do ninho é de 840 metros e as campeiras são capazes de comunicar a direção de fontes de alimento que distem até 630 metros das colônias (ALMEIDA e LAROCA, 1988). A eficiência na capacidade de recrutamento e a capacidade das operárias de coletarem em flores de algodão em locais onde essa planta é a principal fonte de alimento, também podem aumentar a ocorrência da espécie em plantações de *Gossypium* (ARPAIA et al., 2006).

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

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

A primeira etapa das avaliações de risco de plantas GM sobre abelhas consiste na realização de testes com produtos transgênicos purificados (MALONE et al., 2004). Portanto, as avaliações de toxicidade desenvolvidas durante este trabalho foram realizadas por meio de bioensaios com proteínas purificadas. Quando em contato com o alimento larval das abelhas, essas proteínas podem ser inativadas, devido a variáveis como o pH do alimento (VEGUNOPAL et al., 1992). Dessa forma, avaliou-se o pH da dieta ingerida pelas larvas e a atividade da toxina após incorporação no alimento das abelhas.

Os objetivos desse estudo foram: a) desenvolver metodologias para a realização de testes de toxicidade de proteínas sintetizadas por OGMs sobre abelhas sem ferrão e b) avaliar se a toxina Cry1Ac, produzida pelo algodão GM resistente a insetos liberado para plantios comerciais no Brasil em 2005 é tóxica à *T. spinipes*.



## Material e Métodos

### Coleta e manutenção das colônias

Todas as colônias de *Trigona spinipes* utilizadas neste trabalho foram coletadas no município de Viçosa, MG, Brasil (20°45'S e 42°52'W), durante o primeiro semestre de 2006 e transferidas para o Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa, onde foram mantidas em condições de campo.

### Teste da atividade da toxina

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

Bioensaios para avaliar efeitos de toxinas sobre organismos não alvo devem ser conduzidos em condições que propiciem a exposição dos insetos à substância testada. Além disso, a presença e a atividade das toxinas devem ser comprovadas (HILBECK e SCHMIDT, 2006). Para verificar se as larvas de *T. spinipes* seriam realmente expostas à toxina Cry1Ac ativa, a proteína foi previamente testada em larvas de *Anticarsia gemmatalis*, lepidoptera suscetível à toxina Cry1Ac.

Verificou-se que as larvas de *T. spinipes* poderiam iniciar a ingestão do alimento larval logo após a montagem dos experimentos e demorar, no máximo, 15 dias para o término da alimentação. Conseqüentemente, a proteína poderia ficar exposta às condições de criação das larvas por até 15 dias. Em virtude disto, foram realizados dois experimentos com *A. gemmatalis*. No primeiro, a toxina foi adicionada ao alimento das abelhas e fornecida às lagartas logo em seguida ao preparo. No segundo, a toxina foi misturada ao alimento e este material foi incubado por 15 dias nas condições de criação das larvas (34°C e 99%UR). Em ambos os testes, lagartas de segundo instar de *A. gemmatalis* foram submetidas a quatro tratamentos: (1) dieta artificial pura; (2) dieta artificial aspergida com 50µg de Cry1Ac (quantidade tóxica às lagartas); (3) dieta artificial aspergida com o alimento de *T. spinipes* e (4) dieta artificial aspergida com alimento larval de *T. spinipes* + 50µg de Cry1Ac. O primeiro experimento foi conduzido com apenas uma repetição por tratamento com 30 lagartas em cada. O segundo experimento foi repetido 4 vezes, com 30 lagartas em cada repetição. As lagartas foram observadas por sete dias, e as taxas de mortalidade utilizadas como indicativo da atividade de Cry1Ac.

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

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

Foram coletados favos contendo cria em fase de ovo em 6 ninhos de *T. spinipes*. As células de cria foram desoperculadas com o auxílio de uma pinça e, após a retirada dos ovos, o alimento larval foi removido utilizando-se uma bomba de sucção. Coletou-se 30ml de alimento em cada ninho, que foram distribuídos em 6 tubos de centrifuga (5ml por tubo). O alimento contido em cada tubo teve a massa avaliada por uma balança de precisão. O alimento então foi centrifugado até a total separação dos grãos de pólen da porção líquida do alimento larval. O sobrenadante foi descartado e o pólen permaneceu depositado na base dos tubos da centrífuga. Posteriormente, esse material foi mantido em estufa de secagem a 60°C até a desidratação completa, quando a massa seca do pólen foi determinada, utilizando a mesma balança de precisão.

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

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

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

O alimento fornecido às larvas foi obtido nas mesmas colônias onde foram coletadas as abelhas. Favos contendo cria jovem foram retirados dos ninhos com cuidado para que os

ovos permanecessem em posição vertical sobre o alimento, uma vez que o tombamento dos mesmos ocasionaria a sua morte. Esse material era transferido para o laboratório, onde as células de cria foram desoperculadas e tiveram os ovos removidos com o auxílio de um estilete de metal com extremidade dobrada em ângulo reto. O alimento larval foi removido dessas células sob condições assépticas, com o auxílio de uma bomba de sucção, armazenado em frascos de vidro estéreis e homogeneizado. Posteriormente, com o auxílio de uma micropipeta de repetição, células artificiais foram preenchidas com 36µl de alimento, quantidade necessária para uma larva de operária de *T. spinipes* se alimentar (BUSCHINI e CAMPOS, 1995). Inicialmente testaram-se cúpulas de plástico transparente, com 50µl de volume, para criação das abelhas. Como os resultados não foram satisfatórios, passou-se a utilizar células confeccionadas com cera de *Apis mellifera*, conforme sugerido por Buschini e Campos (1995).

As cúpulas foram mantidas em placas de polipropileno de fundo arredondado (Placas de Elisa) e identificadas individualmente. Em bioensaios preliminares, após o provisionamento das cúpulas, larvas recém-eclodidas (total de 30 unidades por repetição) foram retiradas dos favos e colocadas sobre o alimento com o auxílio do estilete. Cada cúpula foi mantida em uma cavidade da Placa de Elisa e fechada com opérculos também confeccionados com cera natural.

As placas foram colocadas em frascos dessecadores mantidos em estufa do tipo B.O.D. a  $34^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e 99% de umidade relativa do ar até o término do período de alimentação. Posteriormente, as cúpulas foram retiradas dos frascos e mantidas na mesma estufa a  $34^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $70 \pm 10\%$  de umidade. A temperatura de  $34^{\circ}\text{C}$  foi escolhida por corresponder à da área de cria das colônias naturais da espécie (SAKAGAMI, 1982). Durante a realização dos bioensaios preliminares, observou-se que, dependendo da localização no interior da estufa, a temperatura poderia variar em até  $1^{\circ}\text{C}$ . Com o objetivo de evitar que essa variação interferisse nos resultados dos experimentos, todos os frascos dessecadores contendo as placas eram modificados de posição no interior da estufa diariamente.

### **Bioensaios com operárias de *T. spinipes***

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

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

**Tratamento 1:** 35,1µl de alimento de *T. spinipes* + 0,9µl de solução de proteína Cry1Ac diluída em água destilada e autoclavada. Cada abelha se alimentou de 18µg de toxina, misturada ao alimento larval;

**Tratamento 2:** 35,1µl de alimento de *T. spinipes* + 0,9µl de água destilada e autoclavada (mesmo volume utilizado para adicionar Cry1AC ao alimento no tratamento 1);

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

As abelhas foram mantidas na estufa até a emergência dos adultos e observadas todos os dias, com o objetivo de se avaliar a mortalidade e o tempo de desenvolvimento em cada estágio (ovo, larva e pupa). A longevidade, em dias, das operárias também foi medida nos diferentes tratamentos. As abelhas adultas foram coletadas logo após a emergência (prazo máximo de 24 horas) e anestesiadas a frio. Cada indivíduo teve a massa corporal avaliada utilizando-se uma balança de precisão.

Todos os parâmetros foram avaliados por meio de teste cego. Os efeitos da dieta sobre a longevidade e massa corporal dos adultos foram comparados por ANOVA ONE-WAY. As médias das mortalidades dos ovos, larvas, pupas e abelhas adultas foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis, pois não era possível a adoção da ANOVA (ZAR, 1999).

### **Bioensaios com rainhas de *T. spinipes***

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

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

**Tratamento 1:** 298,35µl de alimento de *T. spinipes* + 7,65µl de solução de proteína Cry1Ac diluída em água destilada e autoclavada. Cada abelha se alimentou de 50µg de

toxina, concentração de Cry1Ac tóxica a espécies-alvo (WRIGHT et al., 1997; CERDA et al., 2003);

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

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

Cada tratamento continha 34 ovos provenientes da mesma colônia e individualizados em células de cera. A quantidade de água adicionada ao alimento larval nos tratamentos 1 e 2 correspondeu a 2,5% do total da solução fornecida para a alimentação das abelhas. Essa proporção foi escolhida por ser a mesma utilizada nos experimentos com operárias e por ser o menor volume de água necessário para diluir a toxina. O experimento foi montado no dia 17/10/2006 e as abelhas foram observadas diariamente até a pupação e próximo ao período de emergência.

## Resultados

### Teste da atividade da toxina

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

No experimento no qual a toxina foi adicionada ao alimento das abelhas e fornecida às lagartas de *A. gemmatalis* logo em seguida ao preparo, a mortalidade das larvas foi maior nos dois tratamentos em que havia exposição à toxina Cry1Ac. As mortalidades foram 15,15% quando as larvas foram submetidas à ingestão de dieta pura, 86,95% quando a toxina foi adicionada a mesma dieta, 32,87% ao se alimentarem da dieta misturada ao alimento de *T. spinipes* e 73,91% quando tratadas com a dieta, alimento de *T. spinipes* e Cry1Ac (Fig. 1).

Resultados semelhantes foram observados no experimento no qual o alimento das abelhas misturado à toxina foi incubado por 15 dias. A sobrevivência das larvas de *A. gemmatalis* foi mais baixa nos dois tratamentos em que ingeriram a toxina, em relação aos controles (Fig. 2). Em ambos os experimentos, o tratamento com a toxina misturada ao alimento larval apresentou um índice de mortalidade menor quando comparado ao tratamento com Cry1Ac pura fornecida às larvas (Fig. 2). É provável que o longo período de incubação tenha diminuído a toxicidade da proteína, mas a mortalidade foi maior neste tratamento do que no controle (alimento puro), demonstrando que mesmo após 15 dias de contato com o alimento larval, a toxina continuou exercendo efeito sobre as larvas de *A. gemmatalis*.

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

A proporção de pólen do alimento larval das diferentes colônias pode ser observada na Figura 3. O alimento ingerido pelas larvas contém, em média, 10,27% (desvio padrão = 0,96; n = 5) de pólen seco em sua composição.

O algodão transgênico Bollgard® expressa a toxina Bt no pólen a uma concentração de 0,6µg/g (GREENPLATE, 1997). Sabendo-se que as larvas ingerem 36µl de alimento durante o desenvolvimento e que aproximadamente 10,3% desse alimento é composto por pólen, pode-se afirmar que elas consomem cerca de 3,71µg de pólen. Baseando-se nesse resultado e na concentração de Cry1Ac no pólen, conclui-se que se cada indivíduo se alimentasse exclusivamente de pólen de algodão GM, ingeriria 0,000002226µg de Cry1Ac.

Apesar da concentração de Cry1Ac no pólen do algodão GM já ter sido determinada (GREENPLATE, 1997), a proporção de toxinas Bt expressa nesse tecido pode variar de acordo com o tipo de promotor utilizado (MALONE et al., 2004). Outros fatores como temperatura, idade da planta e limitação de nutrientes também podem interferir no nível de expressão das proteínas Cry no algodão (GREENPLATE, 1999; CHEN et al., 2005; COVIELLA et al., 2000). Além disso, a toxina Cry1Ac produzida nos tecidos pode interagir com metabólitos secundários produzidos pelo algodão, interferindo na eficácia do controle sobre espécies-alvo (OLSEN et al., 2005).

Por esta razão, nos bioensaios foi fornecida 18,0µg da toxina/larva, quantidade aproximadamente 8 milhões de vezes maior do que a que seria ingerida pelos indivíduos da colônia, se todo pólen armazenado no ninho fosse de algodão transgênico expressando a proteína Cry1Ac.

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

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

A utilização de indivíduos na fase larval para montagem dos experimentos pode interferir nas análises de longevidade das abelhas, uma vez que é difícil a padronização da idade das larvas durante a transferência das abelhas. Para eliminar tal possibilidade, passamos a usar indivíduos na fase de ovo para a montagem dos bioensaios. Portanto nos bioensaios para

testes de toxicidade, foram transferidos ovos - e não larvas - para as cúpulas de cera. Como os bioensaios foram avaliados diariamente, pôde-se observar a data de eclosão de cada ovo e conseqüentemente, determinar com precisão a longevidade de cada larva estudada.

### **Bioensaios com operárias de *T. spinipes***

A mortalidade das operárias foi baixa em todas as fases de desenvolvimento e em todos os tratamentos (Tabela III). A mortalidade das abelhas ao longo do desenvolvimento (eclosão dos ovos à emergência dos adultos) não diferiu significativamente entre os tratamentos (Tabela III). As análises também não revelaram diferenças significativas entre os tratamentos quanto às mortalidades nas fases de ovo, larva e pupa (Tabela III).

A longevidade das abelhas não diferiu entre os tratamentos ( $F=0,22$ ;  $p=0,46$ ;  $n=5$ ). A duração média de desenvolvimento em cada estágio, nos diferentes tratamentos, está descrita na Tabela IV. A massa corporal média das abelhas adultas foi igual entre os tratamentos ( $F=0,1479$ ;  $p=0,8641$ ;  $n=5$ ; Fig.4).

### **Bioensaios com rainhas de *T. spinipes***

Apesar da metodologia utilizada para os testes com rainhas ter sido adaptada dos protocolos desenvolvidos para testes com operárias, os resultados obtidos com a casta reprodutora não foram satisfatórios. No tratamento controle, 79,41% das abelhas completaram o desenvolvimento, demorando em média  $69,37 \pm 3,66$  dias para empuparem e  $86,61 \pm 3,67$  dias para emergirem. Nos demais tratamentos, porém, 100% das abelhas morreram. No tratamento com a solução de água e toxina, 91,18% dos ovos eclodiram, mas as larvas não desenvolveram adequadamente e sobreviveram por no máximo 10 dias após a eclosão. No tratamento no qual se misturou apenas água ao alimento larval, 52,94% dos ovos eclodiram e a maior longevidade larval foi de 6 dias.

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

## Discussão

A metodologia desenvolvida durante este trabalho é adequada para a realização de testes de toxicidade de proteínas GM sobre operárias de *T. spinipes* e pode ser utilizada para testes com outras toxinas e com pesticidas sintéticos. O protocolo também pode ser aplicado a outros meliponíneos, desde que alguns parâmetros como a quantidade de alimento a ser fornecida às larvas e o tamanho das cúpulas sejam adaptados a cada espécie.

Os testes realizados para verificar a atividade da toxina antes da montagem dos bioensaios são fundamentais para que as análises de toxicidade sejam válidas. O pH pode influenciar nos resultados, pois em alguns casos interfere na toxicidade das proteínas (VEGUNOPAL et al., 1992; TRAN et al., 2001). Valores de pH no alimento das larvas compatíveis com a manutenção da atividade protéica indicam que essas proteínas seriam ingeridas na forma ativa pelas larvas. O pH ácido encontrado no alimento de *T. spinipes* não interferiu na atividade das toxinas, fato posteriormente comprovado com os experimentos com *A. gemmatalis*. Porém, caso a dieta tivesse pH básico, poderia haver inatividade, pois quando mantidas em pH maiores do que 9,0, toxinas Cry1A sofrem alterações significativas em sua estrutura química secundária, podendo modificar a atividade inseticida (VEGUNOPAL et al., 1992).

O estabelecimento de dosagens das proteínas para os testes de toxicidade sobre abelhas depende do conhecimento da quantidade de pólen ingerido pelas larvas (BABENDREIER et al., 2004). Segundo esses autores a ingestão direta de pólen é a única fonte significativa de produtos transgênicos para as larvas de abelhas. Durante o desenvolvimento, larvas de operárias de *A. mellifera* consomem 1,52-2,04mg de pólen (BABENDREIER et al., 2004). Em *T. spinipes*, observamos que cada larva ingere cerca de 3,7µg de pólen seco, o que expõe cada indivíduo, em condições de campo, a uma quantidade de proteína GM muito menor do que aquela potencialmente consumida por *A. mellifera*.

Em relação ao protocolo de criação de *T. spinipes*, nos bioensaios preliminares (dados não apresentados) ocorreram muitas contaminações por fungos, que resultou na mortalidade precoce de 100% das larvas. Portanto é importante que seja feita a esterilização adequada de todo material utilizado e uma haja boa higienização da incubadora onde as abelhas serão mantidas.

A criação em cúpulas de plástico também foi ineficaz, uma vez que o alimento sofreu rápida desidratação, ocasionando a morte de todos os indivíduos. Esta alternativa foi testada porque larvas de *A. mellifera* são criadas em cúpulas de plástico (REMBOLD e LACKNER, 1981; SILVA et al., 2005). Porém as larvas de abelha melífera são alimentadas



de forma progressiva, em intervalos regulares, não havendo tempo para a desidratação do alimento antes do consumo pelas abelhas. Já larvas de meliponíneos têm alimentação massal e, no caso de *T. spinipes*, levam em torno de 8 dias para terminar o consumo do alimento. Por esta razão, as abelhas não conseguiam ingerir todo o alimento disponível, que desidratava antes desse período, causando a morte na fase larval.

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

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

A maioria das pesquisas desenvolvidas sobre toxicidade de Bt sobre *A. mellifera* não verificou alterações na mortalidade em diferentes fases de desenvolvimento (ARPAIA, 1996; HANLEY et al., 2003; MALONE et al., 2004); longevidade, taxa de consumo de alimento e comportamento de vôo (MALONE et al., 1999; MALONE e PHAM-DELÉGUE, 2001; LIU et al., 2005); peso pupal e concentração proteica na hemolinfa dos adultos (ARPAIA, 1996; HANLEY et al., 2003); desenvolvimento da glândula hipofaríngea (MALONE et al., 2004) e atividade enzimática (LIU et al., 2005).

Os resultados obtidos neste estudo indicam que Cry1Ac é segura para *T. spinipes*. Porém, para que a biossegurança do algodão GM sobre essa espécie seja confirmada, outros aspectos da bionomia das operárias devem ser investigados e desenvolvidos protocolos para testes com rainhas.

Grande parte dos estudos desenvolvidos com análise de risco de plantas GM sobre abelhas realizou apenas testes com adultos. Entretanto, ensaios com larvas não devem ser

descartados, pois nessa fase de desenvolvimento as abelhas ingerem grande quantidade de pólen. Além disso, as toxinas Cry são tóxicas aos insetos alvo principalmente durante a fase larval. Portanto a metodologia desenvolvida neste trabalho, envolvendo a criação de larvas desde o momento da eclosão, deve ser considerada em testes futuros de toxicidade de plantas GM sobre diferentes espécies de meliponíneos e, quando possível, aplicada a outros grupos de abelhas.

## Conclusões

- O protocolo desenvolvido para avaliar os efeitos de Cry1Ac sobre *T. spinipes* é adequado para realização de análise de risco de entomotoxinas sobre a espécie, podendo ser utilizado para ensaios com outras substâncias e adaptado para criação de outros meliponíneos;
- Estudos prévios sobre o alimento larval das espécies são importantes para validar os bioensaios;
- O alimento larval de *T. spinipes* não interfere na toxicidade de Cry1Ac em condições de laboratório;
- Não foram encontrados efeitos da toxina Cry1Ac sobre a mortalidade, longevidade e massa corporal de operárias de *T. spinipes*.

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

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

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

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

**Tabela III** - Mortalidade de operárias de *T. spinipes*, alimentadas com alimento larval puro, diluído em água e misturado à solução de água e a proteína Cry1Ac do *Bacillus thuringiensis*, ao longo das fases de desenvolvimento.

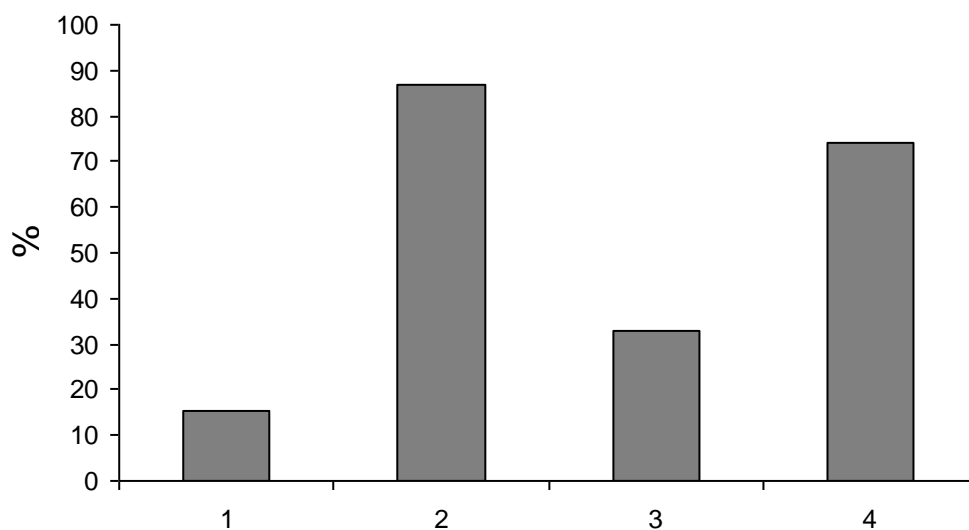
<b>Fases do desenvolvimento</b>	<b>Alimento puro (controle)</b>	<b>Alimento + água</b>	<b>Alimento + água + Cry1Ac</b>
Ovo <sup>1</sup>	3,5% (n = 1,4) * a	3,5% (n = 1,4) a	4,5% (n = 1,8) a
Larva <sup>2</sup>	4,66% (n = 1,8) a	8,81% (n = 3,4) a	7,33% (n = 2,8) a
Pupa <sup>3</sup>	1,09% (n = 0,4) a	1,7% (n = 0,6) a	2,26% (n = 0,8) a
Total <sup>4</sup>	9% (n = 3,6) a	13,5% (n = 5,4) a	13,5% (n = 5,4) a

- Letras iguais indicam que não há diferenças significativas entre os resultados das linhas.
- <sup>1</sup> Kruskal-Wallis; KW = 0,149; p = 0,9282; n = 5
- <sup>2</sup> Kruskal-Wallis; KW = 1,267; p = 0,5308; n = 5
- <sup>3</sup> Kruskal-Wallis; KW = 0,6338; p = 0,7284; n = 5
- <sup>4</sup> Kruskal-Wallis; KW = 1,471; p = 0,4792; n = 5
- \*Os percentuais e números absolutos correspondem ao número médio de abelhas mortas nas repetições de cada tratamento.

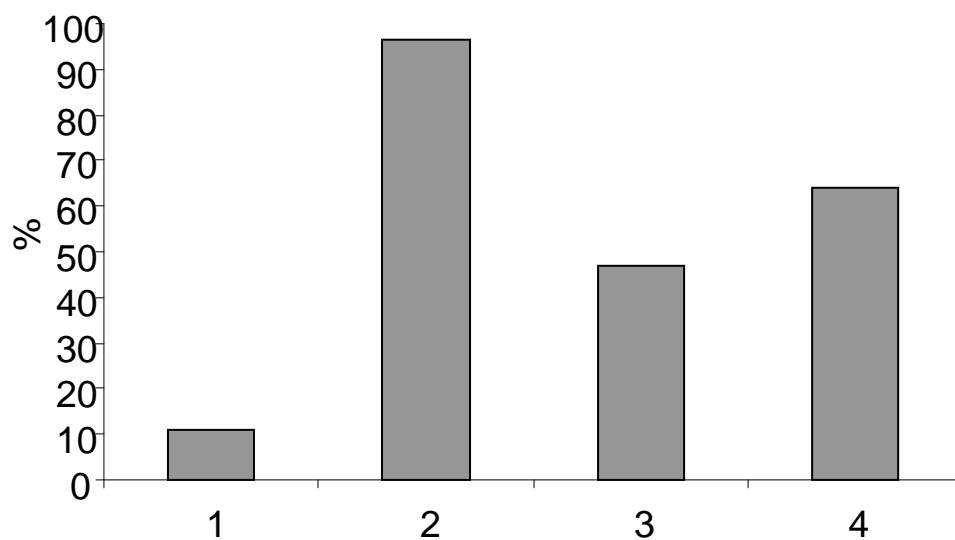
**Tabela IV.** Período médio de desenvolvimento e longevidade, em dias, de operárias de *T. spinipes* submetidas à ingestão de alimento larval puro, diluído em água e misturado à solução de água e a proteína Cry1Ac do *Bacillus thuringiensis*.

<b>Tratamentos</b>	<b>Alimento puro (controle)</b>	<b>Alimento + água</b>	<b>Alimento + água + Cry1Ac</b>
Período larval	17.02 ± 0.42	16.92 ± 0.27	17.02 ± 0.37
Período pupal	17.34 ± 0.52	17.29 ± 0.34	17.31 ± 0.59
Longevidade <sup>1</sup>	34.36 ± 0.41 a	34.21 ± 0.24 a	34.33 ± 0.46 a

- 1- Letras iguais indicam que não há diferenças significativas entre os resultados das linhas (ANOVA; F=0,217; p=0,458; n=5).

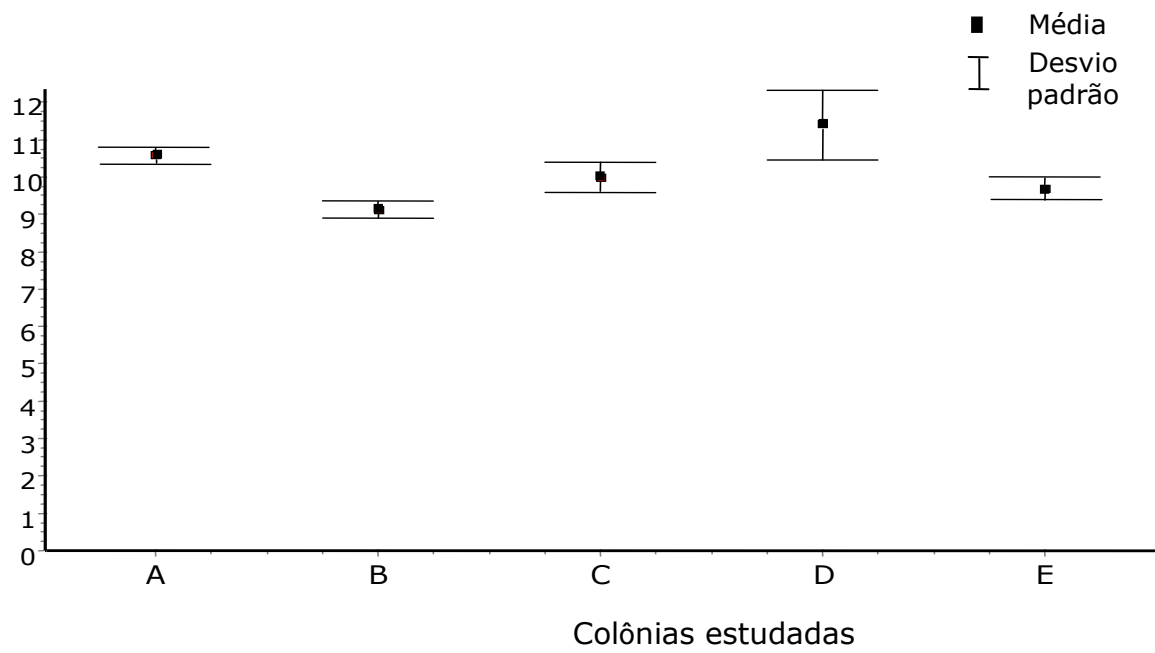


**Figura 1** – Porcentagem de mortalidade de larvas de *A. gemmatalis* após sete dias de alimentação em dieta artificial submetidas a diferentes tratamentos: T1 = dieta pura (controle); T2 = dieta aspergida com a proteína Cry1Ac (50 $\mu$ g/larva); T3 = dieta + alimento larval de *T. spinipes* fresco e T4 = dieta artificial + alimento larval de *T. spinipes* fornecidos logo após o preparo + Cry1Ac (50 $\mu$ g/larva).

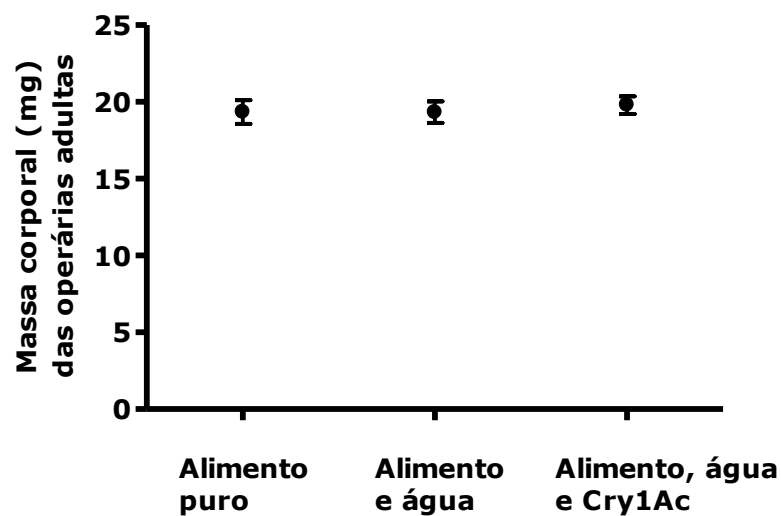


**Figura 2** – Porcentagem de mortalidade de larvas de *A. gemmatalis* após sete dias de alimentação em dieta artificial submetidas a diferentes tratamentos: T1 = dieta pura (controle); T2 = dieta artificial aspergida com a proteína Cry1Ac (50µg/larva); T3 = dieta artificial + alimento larval de *T. spinipes* incubado a 34°C por 15 dias e T4 = dieta artificial + alimento larval de *T. spinipes* incubado a 34°C por 15 dias + Cry1Ac (50µg/larva).





**Figura 3** – Porcentagem de pólen seco do alimento larval de *T. spinipes*. O alimento foi coletado em cinco colônias originárias da região de Viçosa, MG e mantidas no Apiário da UFV.



**Figura 4-** Massa corporal de abelhas adultas ( $\pm$  erro padrão) de *Trigona spinipes* criadas durante a fase larval com alimento larval natural puro, diluído em água e misturado à solução de água e a proteína Cry1Ac do *Bacillus thuringiensis*. Todos os tratamentos foram mantidos em condições controladas de laboratório (34°C e 99% de umidade relativa do ar).

## Referências

- AGI, A. L.; MAHAFFEY, J. S.; BRADLEY JUNIOR, J. R.; VAN DUYN, J. W. Efficacy of seed mixes of transgenic *Bt* and nontransgenic cotton against bollworm, *Helicoverpa zea* Boddie. **The Journal of Cotton Science**, v. 5, p. 74-80, 2001.
- ALMEIDA, M. C.; LAROCA, S. *Trigona spinipes* (Apidae, Meliponinae): taxonomia, bionomia e relações tróficas em áreas restritas. **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, v. 17, p. 67-108, 1988.
- ARPAIA, S. Ecological impact of Bt-transgenic plants: 1. Assessing possible effects of CryIIIB toxin on honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. **Journal of Genetic and Breeding**, Rome, v. 50, p. 315-319, 1996.
- ARPAIA, S.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; PIRES, C. S. S.; SILVEIRA, F. S. Non-target and biodiversity impacts on pollinators and flower visiting insects. In: HILBECK, A.; ANDOW, D.; FONTES, E. (Ed.). **Environmental risk assessment of genetically modified organisms: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil**. Cambridge: CABI Publishing, 2006. p. 155-174.
- BABENDREIER, D.; KALBERER, N.; ROMEIS, J.; FLURI, P.; BIGLER, F. Pollen consumption in honey beelarvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. **Apidologie**, Versailles, v. 35, p. 293-300, 2004.
- BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 843-850, 2003.

- BUSCHINI, M. L. T.; CAMPOS, L. A. O. Caste determination in *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apidae): influence of the available food and the juvenile hormone. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 55, n. 1, Supl., p. 121-129, 1995.
- CANE, J. H. Habitat fragmentation & native bees: a premature verdict? **Conservation Ecology**, v. 5, 2001. Disponível em: <<http://www.consecol.org/vol5/iss1/art3>>. Acesso em: 20 set. 2005.
- CERDA, H.; SAYYED, A. H.; WRIGHT, D. H. Laboratory culture conditions affect stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac in *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 127, p. 142-145, 2003.
- COVIELLA, C. E.; MORGAN, D. J. W.; TRUMBLE, J. T. Interactions of elevated CO<sub>2</sub> and nitrogen fertilization: Effects on production of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic plants. **Environmental Entomology**, College Park, US, v. 29, n. 4, p. 781-787, 2000.
- GREENPLATE, J. T. Response to reports of early damage in 1996 commercial Bt-transgenic cotton (Bollgard®) plantings. **Society of Invertebrate Pathology Newsletter**, v. 29, p. 15-18, 1997.
- GREENPLATE, J. T. Quantification of *Bacillus thuringiensis* insect control protein Cry1Ac over time in Bollgard cotton fruit and terminals. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, US, v. 92, n. 6, p. 1377-1383, 1999.
- GROSSI-DE-SÁ, M. F.; ROMANO, E. Genética molecular de plantas para resistência a insetos. In: PIRES, C. S. S.; FONTES, E. M. G.; SUJII, E. R. (Ed.). **Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas: o algodão resistente a insetos como estudo de caso**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: CNPq, 2003.
- HANLEY, A. V.; HUANG, Z. Y.; PETT, W. L. Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 42, n. 4, p. 77-81, 2003.
- HILBECK, A.; SCHMIDT, J. E. D. Another view on Bt proteins - How specific are they and what else might they do? **Biopesticides International**, v. 2, p. 1-50, 2006.
- JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, Limerick, Irlanda, v. 131, p. 1-11, 1998.
- KEVAN, P. G. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, p. 373-393, 1999.
- LIU, B.; XU, C.; YAN, F.; GONG, R. The impacts of the pollen of insect-resistant transgenic cotton on honeybees. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 14, p. 3487-3496, 2005.
- MALONE, L. A.; BURGESS, E. P. J.; GATEHOUSE, H. S.; VOISEY, C. R.; TREGIDGA, E. L.; PHILIP, B. A. Effects of ingestion of a *Bacillus thuringiensis* toxin and a trypsin inhibitor on honey bee flight activity and longevity. **Apidologie**, Versailles, v. 32, p. 57-68, 2001.
- MALONE, L. A.; BURGESS, E. P. J.; STEFANOVIC, D. Effects of a *Bacillus thuringiensis* toxin, two *Bacillus thuringiensis* biopesticide formulations, and a soybean trypsin inhibitor on honey bee (*Apis mellifera* L.) survival and food consumption. **Apidologie**, Versailles, v. 30, p. 465-473, 1999.

MALONE, L. A.; PHAM-DELÉGUE, M-H. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees. **Apidologie**, Versailles, v. 32, p. 287-304, 2001.

MALONE, L. A.; TODD, J. H.; BURGESS, E. P. J.; CHRISTELLER, J. T. Development of hypopharyngeal glands in adult honey bees fed with a Bt toxin, a biotin-binding protein and a protease inhibitor. **Apidologie**, Versailles, v. 35, p. 655-664, 2004.

MARVIER, M. Improving risk assessment for nontarget safety of transgenic crops. **Ecological Applications**, Tempe, US, v. 12, n. 4, p. 1119-1124, 2002.

MICHELLE, M. Ecology of transgenic crops. **American Scientist**, New Haven, US, v. 89, p. 160-197, 2001.

MORAES, S. S.; BAUTISTA, A. R. L.; BLANDINA, F. V. Avaliação da toxicidade aguda (DL<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub>) de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): via de contato. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, SP, v. 29, p. 31-37. 2000.

NIEH, J. C.; BARRETO, L. S.; CONTRERA, F. A. L.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Olfactory eavesdropping by a competitively foraging stingless bee, *Trigona spinipes*. **Proceedings of the Royal Society of London Series B- Biological Sciences**, London, v. 271, p. 1633-1640, 2004a.

NIEH, J. C.; CONTRERA, F. A. L.; YOON, R. R.; BARRETO, L. S.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Polarized short odor-trail recruitment communication by a stingless bee, *Trigona spinipes*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 56, p. 435-448, 2004b.

NIEH, J. C.; KRUIZINGA, K.; BARRETO, L. S.; CONTRERA, F. A. L.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Effect of group size on the aggression strategy of an extirpating stingless bee, *Trigona spinipes*. **Insectes Sociaux**, Paris, v. 52, p. 147-154, 2005.

NOGUEIRA-NETO, P. **A criação das abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae)**. São Paulo: Chácaras e Quintais, 1970. 365 p.

OLSEN, K. M.; DALY, J. C.; FINNEGAN, E. J.; MAHON, R. J. Changes in Cry1Ac Bt transgenic cotton in response to two environmental factors: temperature and insect damage. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, US, v. 98, n. 4, p. 1382-1390, 2005.

PIRES, C. S. S.; SILVEIRA, F. A.; CARDOSO, C. F.; OLIVEIRA, G. M.; PEREIRA, F. F. O.; SOUZA, V. V.; NAKASU, E. Y. T.; PAES, J. S. O.; TELES, E.; SILVIE, P.; RODRIGUES, S.; MIRANDA, J.; SCOMPARINI, A.; BASTOS, C.; OLIVEIRA, G. S.; OLIVEIRA, J. E.; SANTOS, J. B.; BARROSO, P. A. V.; SUJII, E.; FONTES, E. M. G. **Visitantes florais em espécies cultivadas e não cultivadas de algodoeiro (*Gossypium spp*), em diferentes regiões do Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 148).

REMBOLD, H.; LACKNER, B. Rearing of honeybee larvae in vitro: effect of yeast extract on queen differentiation. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 20, p. 165-171, 1981.

SAKAGAMI, S. F. Stingless bees. In: HERMANN, H. R. (Ed.). **Social insects**. New York: Academic Press, 1982. v. 3.

SILVA, I. C.; MESSAGE, D.; DAMIÃO-CRUZ, C.; SILVA, M. V. G. B. Aplicação de análises multivariadas para determinação de casta de abelhas *Apis mellifera* L. (africanizadas),

obtidas em laboratório. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 34, n. 2, p. 635-640, 2005.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. P.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e classificação**. Belo Horizonte: Silveira F.A., 2002. 253 p.

SLAA, E. J.; SANCHEZ, L. A.; SANDI, M.; SALAZAR, W. A scientific note on the use of stingless bees for comercial pollination in enclosures. **Apidologie**, Versailles, v. 31, p. 141-142, 2000.

TRAN, L. B.; VACHON, V.; SCHWARTZ, J. L.; LAPRADE, R. Differential effects of pH on the pore-forming properties of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 67, n. 10, p. 488-494, 2001.

VEGUNOPAL, M. G.; WOLFERSBERGER, M. G.; WALLACE, B. A. Effects of pH on conformational properties related to the toxicity of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1159, p. 185-192, 1992.

WRIGHT, D. J.; LOBAL, M.; GRANERO, F.; FERRÉ, J. A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only in part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, n. 5, p. 1814-1819, 1997.

WU, K. M.; GUO, Y. Y. The evolution of cotton pest managment practices in China. **Annual Review of Entomology**, Stanford, US, v. 50, p. 31-52, 2005.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4<sup>th</sup> ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 663 p.