

# ANÁLISE DO EFEITO DO PÓLEN DO MILHO TRANSGÊNICO RESISTENTE A INSETOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Galleria mellonella* (FABRICIUS, 1754) (Lepidoptera, Pyralidae) E POSSÍVEIS CONSEQUÊNCIAS ECOLÓGICAS

ANALYSIS THE EFFECT POLLEN FROM INSECT-RESISTANT TRANSGENIC CORN ON THE DEVELOPMENT OF *Galleria mellonella* (FABRICIUS, 1754) (Lepidoptera, Pyralidae) AND POSSIBLE ECOLOGICAL CONSEQUENCES

Henrique TREVISAN<sup>1</sup>; Ana AGUIAR<sup>2</sup>; Bernardo SABUGOSA-MADEIRA<sup>3</sup>; Acacio Geraldo de CARVALHO<sup>4</sup>; Ilda ABREU<sup>2</sup>

1. Pós-doutorando, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Produtos Florestais, hentrevisan@gmail.com; 2. Professora, Doutora, Universidade do Porto, Faculdade de Ciências, Porto, Portugal. aaguiar@fc.up.pt, ianoronh@fc.up.pt; 3. Professor, Doutor, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Refóios do Lima, Portugal. jbcspm@yahoo.com; 4. Professor, Doutor, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Produtos Florestais. acacio@ufrj.br.

**RESUMO:** O presente trabalho tem o objetivo de avaliar os efeitos do pólen do milho transgênico, que expressa a proteína entomopatogênica Cry1Ab, sobre aspectos biológicos da traça da cera (*Galleria mellonella*) e com isso propor uma discussão sobre as possibilidades de afecção desse pirálídeo à campo, debatendo possíveis efeitos ecológicos. Um ensaio biológico foi realizado, onde se ofertou às larvas pólen do milho transgênico, pólen do milho convencional e pólen comercial. A duração da fase larval foi afetada pela composição da dieta, sendo que as constituídas de pólen de milho convencional e transgênico apresentaram os resultados mais expressivos. A mortalidade foi superior nos indivíduos alimentados com a mistura de cera virgem e pólen transgênico, no entanto não diferiu dos demais alimentos, quando junto ao pólen transgênico, foi associado favo de *Apis mellifera*. A largura e comprimento das pupas providas de lagartas alimentadas com cera virgem adicionada com pólen transgênico ou convencional foram significativamente inferiores quando comparados aos valores das mensurações realizadas nas pupas providas de outras dietas. O pólen do milho, convencional ou transgênico, por si só é um alimento menos adequado ao desenvolvimento de *G. mellonella*, em relação a uma dieta composta por pólen de várias plantas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Traça da cera. Milho Bt. *Zea mays*

## INTRODUÇÃO

A adoção de vegetais transgênicos que expressam proteínas entomopatogênicas tem suscitado diversas discussões éticas e científicas. Dentre essas, presumíveis impactos no meio ambiente, em consequência de alteração de interações ecológicas, se destacam entre os principais debates (SIQUEIRA et al., 2004). Um desses casos é a relação do lepidóptero *Galleria mellonella* (Linnaeus 1758) (Lepidoptera, Pyralidae), conhecida como traça da cera, com abelhas *Apis mellifera*.

Esse lepidóptero ocorre naturalmente em colônias de abelhas, juntamente com *Achroia grisella* (Fabricius, 1754) (Lepidoptera, Pyralidae), ocupando o mesmo nicho ecológico. As larvas alimentam-se de cera velha, pólen e mel, material presente nas colméias de abelhas (VANDERBERG; SHIMANUKI, 1990.)

Devido a esse hábito alimentar, certos investigadores o consideram praga de apiários (BRIGHENTI et al., 2005), já outros o classificam

como um organismo importante na reciclagem de matéria orgânica dentro das colméias (SABUGOSA-MADEIRA et al., 2007; SABUGOSA-MADEIRA; ABREU, 2009; TREVISAN et al., 2012). Nessa primeira visão são considerados nocivos às abelhas, e por isso são combatidos, pois as larvas inutilizam os favos e consomem o pólen, prejudicando assim a produção de mel (VANDERBERG; SHIMANUKI, 1990). Na segunda visão, de acordo com Sabugosa-Madeira et al. (2007), a presença destes pirálídeos nas colônias não só liberam espaço pela destruição de favos velhos e inutilizados (principalmente em colônias selvagens) como, em caso de morte da colônia, destroem toda a cera restante que tenha larvas e pólen. Nesse contexto, desempenham um papel importante no controle de diversas doenças microbianas que afetam as abelhas (MELATHOPOULOS et al., 2004). Logo, pode-se considerar que se não fosse pela atuação das traças de cera, os favos velhos permaneceriam por períodos muitos longos no ambiente, o que, desta

forma, seria fonte de dispersão de doenças nas abelhas.

Sob a linha de raciocínio, que considera a ação desses piralídeos um benefício ecológico às colméias, a afecção destes organismos pode ser interpretada como nocivo à apicultura. Dessa forma, a implementação de plantações transgênicas resistentes a insetos, pela utilização das denominadas plantas Bt, pode ser um dos fatores com efeitos nocivos sobre estes lepidópteros (SABUGOSA-MADEIRA et al., 2007; TREVISAN et al., 2012). Sendo assim, as abelhas ao coletarem e acumularem nas colônias pólen de plantações transgênicas com essa característica, poderão com isso, expor as larvas desses piralídeos à intoxicação pela ação da proteína entomopatogênica Cry, presente no pólen, o que poderá desestabilizar a relação das abelhas com as traças, já que, pequenas quantidades desse pólen, podem ser letais à *G. mellonella* (HANLEY et al., 2003).

Diante do exposto, o presente trabalho tem o objetivo de avaliar os efeitos do pólen do milho Bt, que expressa a proteína entomopatogênica Cry1Ab, sobre aspectos biológicos de *G. mellonella*, e com isso propor uma discussão sobre as possibilidades de afecção deste piralídeo em campo debatendo possíveis efeitos ecológicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos laboratórios de entomologia e palinologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, (FCUP), Portugal, no período de Julho a Dezembro

de 2009. Excursões a campo foram realizadas para a coleta de panículas de milho convencional (cultivar PR65 – Pionner®) e milho transgênico da cultivar Mas58.YG (Maïsadour®), derivada da linhagem MON810, expressando, portanto, a proteína Cry1Ab.

No laboratório, as panículas foram submetidas à secagem em estufa ventilada a 25 °C, durante 2 dias. Após secas, procedeu-se a crivagem do pólen, que depois de isolado e limpo foi acondicionado em tubos de plástico e conservados a -20°C, até serem utilizados na dieta das larvas de *G. mellonella*.

Uma população base de *G. mellonella* foi obtida com a criação em laboratório a partir de pupas coletadas em ambiente natural. Estas foram acomodadas em uma caixa telada que serviu de gaiola, de forma que ao emergirem, os adultos permanecessem confinados no seu interior. No mesmo local foi ofertado, como sítio de oviposição, um papel dobrado em tiras paralelas, sendo uma das extremidades grampeadas, originando, desta forma arestas, que serviram como sítio de postura para *G. mellonella*, de onde os ovos foram coletados para o ensaio.

Para a análise dos efeitos do pólen transgênico em *G. mellonella*, foi realizado um bio ensaio onde foram ofertados como alimento às lagartas, diferentes substratos alimentares, cuja composição variou no tipo e quantidade de pólen, bem como na presença de matéria orgânica proveniente de favo de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Composição dos substratos alimentares ofertados a *G. mellonella*.

| Tratamento          | Composição  |
|---------------------|---|
| 100% Bt             | 2,50g de pólen de milho Bt + 20g de cera virgem                   |
| 50% Bt + 50% conv.* | 1,25g de pólen Bt + 1,25g pólen convencional + 20g de cera virgem |
| 80% com. + 20% Bt   | 2,00g pólen comercial + 0,50g de pólen Bt + 20g de cera virgem    |
| 100% conv.          | 2,50g de pólen de milho convencional+ 20g de cera virgem          |
| 100% com.**         | 2,50 de pólen comercial+ 20g de cera virgem                       |
| 100% Bt + favo      | 2,50g de pólen de milho Bt + 20g favo de <i>A. mellifera</i>      |

\* convencional \*\* comercial

Os tratamentos (100% Bt); (100% com.); (80% com. + 20% Bt); (100% conv.) e (50% Bt + 50% Conv) foram preparados com cera virgem. Somente o tratamento (100% Bt + favo) não recebeu esta cera, pois neste caso, utilizou-se na preparação do substrato, favo coletado em colméia de *A. mellifera*. Portanto, no referido tratamento levou-se

em consideração à presença de outros componentes na dieta de *G. mellonella*, como por exemplo, restos de mecônio e exúvias, simulando assim, condições alimentares naturais. O pólen comercial é formado pela aglutinação do pólen de diferentes espécies de flores, efetuada pelas abelhas operárias, o qual é coletado no ingresso da colônia.

Para a montagem deste tratamento foi pesado 20 g de favo utilizado por *A. mellifera* obtido em apiário para, cada placa de Pétri. Posteriormente, essas placas, devidamente forradas com papel antiaderente, foram submetidas a autoclavagem a 70 °C durante 10 minutos. Desta forma obteve-se uma placa de cera homogênea, e eliminaram-se ovos *G. mellonella* que eventualmente pudessem estar presentes neste material. Cada lagarta recebeu 2,5 g de pólen, nas proporções descritas na Tabela 1, juntamente com a cera ou favo em proporções suficientes para uma dieta “*ad libidum*” (NOMURA et al., 2006).

Para o início das avaliações, utilizaram-se lagartas com nove dias de vida. Esse procedimento foi adotado porque as larvas recém eclodidas são muito sensíveis, dificultando a manipulação. Cada tratamento foi composto por trinta lagartas, individualizadas nas placas de Pétri e dispostas em blocos inteiramente casualizados. Para simulação do interior das colméias, as lagartas permaneceram em ambiente com luminosidade reduzida durante o período de avaliação. Os parâmetros biológicos considerados foram: mortalidade larval, duração do período de pré-pupa, pupa e longevidade do adulto. O peso e dimensões das pupas também foram registrados. Considerou-se o período de pré-pupa, fase em que a lagarta permanecia em uma estrutura de fios de seda confeccionada pela larva, a qual não se alimentava nem se locomovia. A longevidade do adulto foi obtida confinando os adultos em gaiolas entomológicas. Calcularam-se em dias as seguintes fases: larval, de pré-pupa, pupa e o ciclo de vida. As avaliações dos parâmetros biológicos bem como ambientais (temperatura e umidade relativa do ar) foram realizados diariamente.

O tratamento estatístico foi realizado pelo programa BioEstat versão 5.0. A normalidade dos

dados foi conferida pelo teste de Lillefors, e quando normais aplicara-se o teste de Tukey a 5% de significância para análise de variâncias. Os dados não normais foram analisados pelo teste de Kruskal-wallis, e quando detectada diferença entre postos médios, utilizou-se o teste de Student-Newman-Keys na comparação desses valores, e as diferenças foram expressas na média verdadeira. A existência de diferença significativa entre os valores absolutos, como os utilizados nos cálculos percentuais, foi verificada pela aplicação de um teste de independência do qui-quadrado a 5% de significância, uma vez constatada essa diferença, os dados foram analisados pela partição dos mesmos em tabelas de contingência 2x2, no mesmo nível de significância. Procedimentos estatísticos sugeridos por AYRES et al. (2007).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As temperaturas médias ( $\pm$ DP), máxima e mínima, em °C, registradas durante a execução do ensaio biológico foram: 28,5 $\pm$ 1,3 e 23,3 $\pm$ 1,3, respectivamente. A média ( $\pm$ DP) da umidade relativa do ar, obtida durante o mesmo período foi: 66,12 $\pm$ 2,4.

As larvas de *G. mellonella* alimentadas com dieta constituída de cera virgem (100% Bt) ou cera virgem (50% Bt + 50% conv.) ou com apenas cera virgem (100% conv.) desenvolveram-se mais lentamente, sendo a duração desta fase superior às que foram submetidas aos outros alimentos (Tabela 2). Por outro lado, as larvas que receberam favo de *A. mellifera* com pólen Bt 100%, tiveram a duração da fase larval significativamente reduzida 33,86 dias, em relação aos indivíduos provenientes dos outros alimentos testados (Tabela 2).

**Tabela 2.** Duração média ( $\pm$  desvio padrão), em dias, do período larval, pré-pupa, pupa, longevidade do adulto e do ciclo de vida de *G. mellonella* alimentadas com pólen de milho convencional (conv.), transgênico (Bt), comercial (com) em diferentes proporções.

| Tratamento         | Período larval    | Pré-pupa        | Pupa            | Adulto           | Ciclo de vida      |
|--------------------|-------------------|-----------------|-----------------|------------------|--------------------|
| 100% Bt            | 66,09 $\pm$ 09 a  | 15,60 $\pm$ 7 a | 15,40 $\pm$ 8 a | 14,70 $\pm$ 6 a  | 118,73 $\pm$ 16 a  |
| 50% Bt + 50% conv. | 59,56 $\pm$ 14 a  | 8,13 $\pm$ 5 ab | 16,60 $\pm$ 9 a | 17,60 $\pm$ 12 a | 109,73 $\pm$ 20 a  |
| 80% com. + 20% Bt  | 25,80 $\pm$ 06 d  | 2,14 $\pm$ 2 c  | 11,74 $\pm$ 2 a | 16,84 $\pm$ 9 a  | 64,37 $\pm$ 9 d    |
| 100% conv.         | 55,90 $\pm$ 16ab  | 8,21 $\pm$ 14ab | 14,62 $\pm$ 4 a | 16,54 $\pm$ 8 a  | 103,46 $\pm$ 23 ab |
| 100% com.          | 40,20 $\pm$ 12 bc | 4,65 $\pm$ 2 b  | 11,06 $\pm$ 5 a | 22,31 $\pm$ 13 a | 84,50 $\pm$ 11 bc  |
| 100% Bt + favo     | 33,86 $\pm$ 13 c  | 6,29 $\pm$ 2 b  | 11,08 $\pm$ 4 a | 13,31 $\pm$ 8 a  | 72,67 $\pm$ 14 dc  |

<sup>(1)</sup>Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste Student-Newman-Keys (P<0,05)

A duração da fase larval de *G. mellonella* é altamente dependente das condições em que se desenvolvem, bem como da população de origem. Nesse sentido, Cardoso et al. (2007) registraram

uma duração média da fase larval para *G. mellonella*, em favo de *A. mellifera*, que variou de 40,4 (22 °C) a 23,3 dias (32 °C). Esses valores foram semelhantes a alguns encontrados nesse trabalho

(Tabela 2). No entanto são inferiores aos relatados por El-Sawaf (1950) que obteve uma média de 68,37 dias a 29,6 °C e um aumento para 225 dias quando a temperatura decresceu para 18,6 °C. Já Nomura et al. (2006), em dieta composta por favo de *A. mellifera* + pólen, registraram uma duração média da fase larval de 48,9 dias.

A análise dos dados obtidos neste trabalho sugere que o pólen do milho convencional ou transgênico, por si só, pode ser considerado um alimento inadequado ao desenvolvimento larval de *G. mellonella*, em comparação com os demais alimentos analisados neste experimento, face ao prolongamento da fase larval. Segundo Lara (1991) o efeito de plantas resistentes aos insetos, traduz-se numa alteração em suas fases de desenvolvimento, geralmente prolongando seu ciclo. Ainda, segundo Cardoso et al. (2007) o registro de uma menor fase larval em *G. mellonella* é indicativo de que as condições em que as larvas estão sendo criadas são ideais. Além disso, o pólen do milho Bt pode agravar essa inadequação, tendo em vista o maior registro do período larval observado em indivíduos alimentados com cera virgem e pólen transgênico que contem a proteína Cry1Ab.

No entanto, quando o pólen de milho Bt foi ofertado junto com os elementos do favo de *A. mellifera*, como as exúvias, o mecônio entre outros, notou-se um desenvolvimento larval mais rápido, em relação aos demais alimentos compostos à base de cera virgem e pólen de milho, transgênico ou convencional, o que pode indicar, que a presença destes elementos orgânicos na dieta de *G. mellonella*, complementa a nutrição larval, e pode atenuar, portanto, a eventual carência nutricional ocasionada por uma dieta à base unicamente de cera virgem e pólen de milho, seja transgênico ou convencional.

Foi observado que no interior das placas de Pétri as larvas construíram galerias com fios de seda, concordando com a observação de Zacarin et al. (2004), que relatam que o comportamento das larvas de *G. mellonella* ao se alimentarem constroem galerias, e que com o passar do tempo estas são recobertas com partículas fecais, como observado também neste experimento. Ainda acrescentaram, que para entrarem na fase de pré-pupa, construíam galerias na madeira presente nas colméias, onde tecem casulos e pupam, geralmente uma ao lado da outra. Na placa de Pétri, a fase de pré-pupa foi observado quando com fios de seda a lagarta, fechou as extremidades da galeria, e permaneceu neste local sem se alimentar até a pupação.

A fase de pré-pupa, também, teve sua duração afetada pelo tipo de alimento ofertado. As lagartas alimentadas com substratos compostos por cera virgem (100% Bt), cera virgem (50% Bt + 50% conv.) e cera virgem (100% conv.) originaram pré-pupas que permaneceram nesta fase por um tempo maior, em relação às lagartas submetidas às outras dietas (Tabela 2). Essa observação também apóia a hipótese de que o alimento composto por material proveniente do milho é o menos adequado ao desenvolvimento de *G. mellonella*. No tratamento composto por 100% Bt + favo, a duração da fase de pré-pupa difere, estatisticamente, da observada no tratamento composto por cera virgem (100% Bt), sendo significativamente inferior. Essa constatação também reforça a idéia de que o material orgânico presente no favo complementa a alimentação larval, mesmo na presença de quantidade significativa de pólen Bt.

Para a duração da fase de pupa, não foi observada diferença na duração deste parâmetro, em nenhum dos alimentos, pela comparação realizada pelo teste de Student-Newman-Keys a 5% de significância (Tabela 2). Valores semelhantes foram obtidos por Cardoso et al., (2007), em diferentes temperaturas, que registraram 18,2 dias (22 °C), 15,0 dias (27 °C) e 12,2 dias (32 °C). No entanto os resultados são diferentes dos obtidos por Brar et al., (1996), que encontraram valores menores para a fase de pupa (4,5 a 4,8 dias) a 32 °C.

A duração do ciclo de vida médio de *G. mellonella* para os indivíduos alimentados com cera virgem (100% Bt), cera virgem (50% Bt + 50% conv.) e cera virgem (100% conv.) revelou-se estatisticamente igual quando comparados (Tabela 2). Os indivíduos tiveram seu ciclo de vida estendido, principalmente pela ampliação da duração da fase larval, incluindo nesta o período de pré-pupa. A isso corrobora o fato de que nas fases de pupa e adulto, o alimento não influenciou a sua duração.

Para os indivíduos que foram alimentados com favo de *A. mellifera* (100% Bt), registrou-se um ciclo de vida médio de 72,67 dias, valor este significativamente menor em relação ao constatado nos indivíduos cuja dieta era composta de cera virgem e 100% de pólen Bt. No entanto, este valor demonstrou-se estatisticamente igual aos observados no tratamento com 100% de pólen comercial e no fracionado com 20% de pólen Bt (Tabela 2).

A largura e o comprimento das pupas foram influenciados pelo tipo de alimento. As larvas que foram alimentadas com cera virgem e pólen de milho, em qualquer teor ou genótipo, originaram pupas significativamente menos largas e compridas,

em comparação com as que receberam, em sua dieta, pólen Bt e favo de *A. mellifera* (Tabela 3). Nestas últimas, quando a comparação foi realizada com os valores médios das mensurações realizadas

em pupas providas de larvas alimentadas com pólen comercial, mesmo na presença de 20% de Bt, não ocorreu diferença estatística (Tabela 3).

**Tabela 3.** Peso médio ( $\pm$  desvio padrão), em gramas, largura e comprimento médio ( $\pm$  desvio padrão), em cm, de pupas de *G. mellonella* providas de lagartas alimentadas com pólen de milho convencional (conv.), transgênico (Bt), comercial (com) em diferentes proporções.

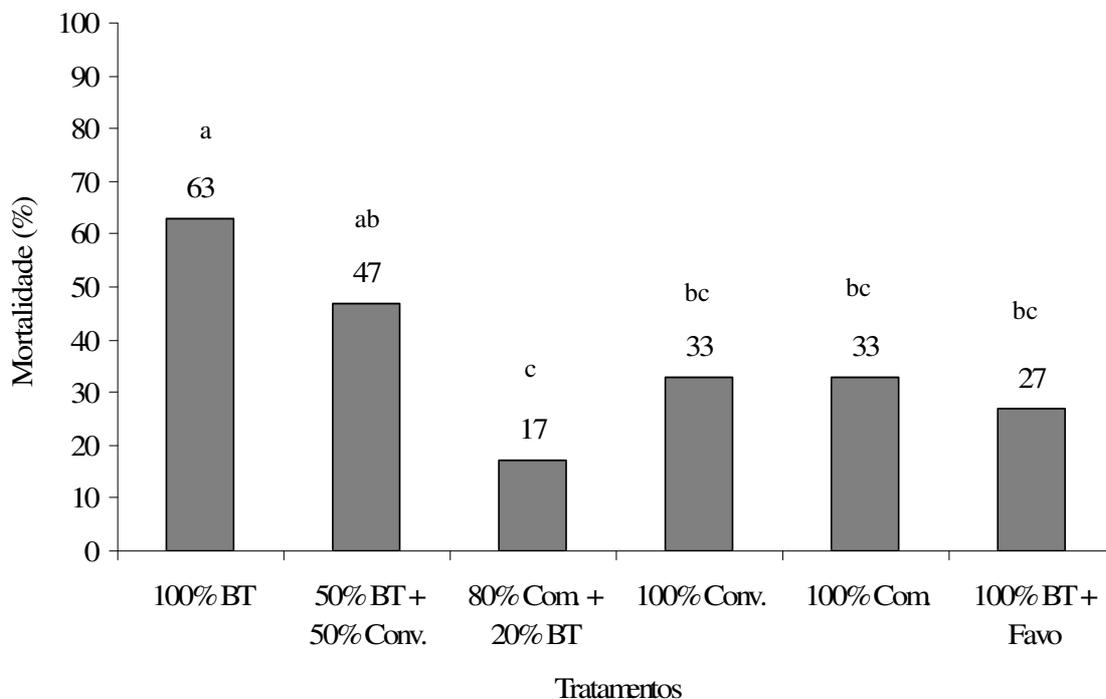
| Tratamento         | Peso                | Largura            | Comprimento        |
|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| 100% Bt            | 0,1266 $\pm$ 0,07 a | 0,36 $\pm$ 0,03 b  | 1,21 $\pm$ 0,12 b  |
| 50% Bt + 50% conv. | 0,1514 $\pm$ 0,08 a | 0,36 $\pm$ 0,05 b  | 1,24 $\pm$ 0,11 b  |
| 80% com. + 20% Bt  | 0,1548 $\pm$ 0,04 a | 0,41 $\pm$ 0,03 a  | 1,44 $\pm$ 0,18 a  |
| 100% conv.         | 0,1327 $\pm$ 0,06 a | 0,36 $\pm$ 0,03 b  | 1,27 $\pm$ 0,10 b  |
| 100% com.          | 0,1303 $\pm$ 0,03 a | 0,39 $\pm$ 0,06 ab | 1,32 $\pm$ 0,13 ab |
| 100% Bt + favo     | 0,1662 $\pm$ 0,05 a | 0,42 $\pm$ 0,07 a  | 1,43 $\pm$ 0,15 a  |

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (peso) e Student-Newman-Keys (comprimento e largura) ( $P < 0,05$ ).

Estas observações reforçam a idéia de que o pólen Bt, na presença da matéria orgânica do favo, não propicia um efeito negativo significativo no desenvolvimento das pupas de *G. mellonella* nem no ciclo de vida, em relação aos demais alimentos testados. A isso soma-se a observação de que as pupas providas de lagartas alimentadas com favo de *A. mellifera* adicionado com pólen Bt, apresentam peso superior, embora neste parâmetro

não tenha sido registrada diferença estatística em nenhuma comparação.

A mortalidade larval foi significativamente superior no tratamento cujas lagartas foram alimentadas com cera virgem (100% Bt), tendo atingido um percentual de 63%. Este valor não se demonstrou diferente pelo teste de Qui-quadrado, quando comparado com o observado em lagartas onde a dieta foi à base de cera virgem (50% Bt + 50% conv.) (Figura 1).



Valores seguidos de mesma letra, entre barras, não diferem estatisticamente pelo teste de Qui-quadrado ( $P < 0,05$ ).

**Figura 1.** Mortalidade larval percentual de *G. mellonella* alimentadas com pólen de milho convencional (conv.), transgênico (Bt), comercial (Com) em diferentes proporções

O pólen do milho transgênico ou convencional, retardou o desenvolvimento larval, em relação aos demais alimentos avaliados. No alimento composto por cera virgem (100% conv.), a mortalidade não foi tão expressiva quando comparada com a dos alimentos cuja dieta continha cera virgem e pólen Bt (100% Bt + 50% Bt) (Figura 1).

No alimento composto por favo de *A. mellifera* (100% Bt) foi registrado uma mortalidade larval de 27%, valor esse igual estatisticamente aos dos outros tratamentos, exceto o que era composto por cera virgem (100% Bt) (Figura 1). Isso demonstra que a presença da matéria orgânica (exúvias, mecônio e mesmo o pólen de outras plantas) quando associada ao pólen Bt, como fonte de alimento das larvas, não ocasionou um efeito tão tóxico quanto ao observado no tratamento composto por cera virgem (100% Bt). Desta forma, pode-se especular que nas colônias de *A. mellifera*, onde naturalmente essa matéria orgânica ocorre, essa toxicidade também seja atenuada.

Dentro desta discussão, Hanley et al. (2003) estudaram a mortalidade de larvas de *G. mellonella* expostas ao pólen provindo de dois eventos de milho transgênico, um que expressa a proteína Cry1Ab, presente neste experimento, e outro a proteína Cry1f. Estes autores concluíram que a mortalidade das larvas submetidas à alimentação com pólen que expressava a proteína Cry1Ab não diferiu da mortalidade observada no tratamento cujas larvas foram expostas ao pólen convencional, discordando dos resultados deste trabalho. Já as que receberam pólen com a presença da proteína Cry1f, a mortalidade foi total. Nesta abordagem experimental, os autores não levaram em consideração a presença da cera ou mesmo da matéria orgânica, que naturalmente ocorrem associados à dieta de *G. mellonella*, quando em ambiente natural.

Para explicarem a diferença na mortalidade das larvas alimentadas com pólen de milho transgênico, que possuem proteínas distintas, esses autores relatam que a expressão de Cry1f é em torno de 31-33 ng/mg de pólen. Já no milho que expressa a proteína Cry1Ab, o teor da mesma é menor, em torno de 1,1-1,7 ng/mg de pólen. Desta forma a mortalidade superior em Cry1f teria sentido. Também levantam a hipótese de que *G. mellonella* pode ser mais sensível a Cry1f do que Cry1Ab. Ainda não se tem resposta se a proteína Cry1f associada à matéria orgânica dos favos teria sua propriedade inseticida atenuada, como observado neste experimento com a proteína Cry1Ab em *G. mellonella*.

Ainda, sobre a sensibilidade de *G. mellonella* à proteína Cry, Sauka e Benintende, (2008) relatam que este lepidóptero é conhecidamente suscetível a Cry9Aa. Dado esse fato, torna-se altamente conveniente avaliar a influência do pólen de plantas transgênicas que expressam essa proteína específica sobre *G. mellonella*. Uma vez que a viabilidade deste evento transgênico foi estudada em plantas de tabaco, batata, couve-flor e em nabo silvestre, tendo sido obtido promissores resultados na atividade inseticida contra pragas, fruto da expressão de Cry9Aa nos tecidos vegetais (KUVSHINOV et al., 2001), tornando-as, portanto, com potencial para liberação comercial e posterior plantio em larga escala.

Dentro dessa discussão sobre a suscetibilidade de *G. mellonella* a essas proteínas entomopatogênicas, soma-se a informação de que existem algumas combinações de proteínas Cry que mostram uma toxicidade sinérgica em relação aos lepidópteros (LEE et al., 1996). Estes autores observaram em bioensaios que houve sinergismo entre as proteínas Cry1Aa e Cry1Ac, enquanto que a mistura de Cry1Aa e Cry1Ab mostrou antagonismo em relação ao controle de *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1759). Desta forma, pode-se especular se a mistura de diferentes tipos de proteínas Cry possa ocorrer no interior das colônias de abelhas, face a coleta de pólen pelas operárias nas diferentes plantas transgênicas com essa característica, e se isso poderia proporcionar alguma consequência em *G. mellonella*.

Nesse debate sobre a toxicidade de produtos transgênicos à entomofauna, Siqueira et al., (2004) relatam que vários casos de efeitos negativos de plantas geneticamente modificadas a insetos resultaram de estudos em laboratório que, muitas vezes, não podem ser extrapolados para condições de campo. Nesse sentido, cabe refletir se toxicidades observadas em laboratório sobre *G. mellonella*, ou mesmo as apontadas teoricamente, podem também ser conferidas em condições de campo. Para isso, investigar em ambiente natural os níveis de exposição à toxina, bem como as condições destas estarem ativas quando em contato com o inseto, é algo profícuo na elucidação desta questão. Avaliar ainda os possíveis efeitos ecológicos, resultantes deste tipo de interação, segundo Siqueira et al., (2004), também é algo que se deve considerar neste tipo de estudo.

Sobre essa conjectura, estimativas da coleta de pólen de milho pelas abelhas, pode, teoricamente, fornecer informações sobre a exposição das larvas de *G. mellonella* as proteínas Cry, expressas no

milho Bt. Sobre isso Sabugosa-Madeira (2008) avaliou os fluxos polínicos de *A. mellifera*, e relatou que no verão, no Norte de Portugal, em zonas de cultivo de *Zea mays* (milho), este contribuiu em cerca de 17% da dieta das abelhas. Já Louveaux e Albisetti (1963) demonstraram que na ausência de outras fontes de pólen, o milho supriu cerca de 90% da demanda de pólen das colméias avaliadas numa região da França. Deste modo, esses fatos podem ser considerados indícios de que a exposição das larvas de *G. mellonella* ao pólen Bt possa ocorrer, diante da comprovada coleta desse material por *A. mellifera*.

No entanto, cabe investigar se esse fluxo polínico realizado por *A. mellifera* em milho, ou em outra cultura transgênica, ocorra também de forma significativa em ambientes tropicais, como no Brasil, onde a fonte de pólen é maior, devido a uma maior diversidade de plantas. Em algodão, por exemplo, Junior e Malerbo-Souza (2004) concluíram que *A. mellifera* foi, em Ribeirão-Preto, o inseto mais freqüente nas flores do algodoeiro, fornecendo indícios, desta forma, de que a coleta de pólen por esse himenóptero é significativa nessa cultura. Logo, faz-se pertinente considerar o pólen do algodão Bt, nas investigações sobre o assunto aqui discutido, bem como de todas as outras culturas que expressam essa característica com diferentes proteínas Cry e que são visitadas por abelhas.

Ainda, conforme recomendação de Hanley et al. (2003), a ação entomopatogênica por eles constatada sobre *G. mellonella* do pólen Bt que contém a proteína Cry1f, deve ser comprovada em ensaios de campo, como anteriormente assinalado. Essa abordagem torna-se importante, já que ao coletar o pólen, as abelhas adicionam saliva no mesmo, e desta forma veiculam enzimas neste material polínico (SABUGOSA-MADEIRA, 2008). Desconhece-se a ação destas enzimas sobre as diferentes proteínas Cry contidas no pólen das plantas transgênicas. Soma-se a isso os fatores ambientais que podem atuar na proteína entomopatogênica presente no pólen, como por exemplo, a luz ultravioleta, que segundo Navon (2008), promove uma rápida degradação de proteínas Cry.

Logo, considerando as possibilidades do pólen Bt ser coletado de forma significativa pelas abelhas, e a proteína Cry não ser degradada pelos efeitos ambientais ou sofrer alguma modificação na propriedade inseticida, proporcionada pelas enzimas salivares das abelhas, e desta forma entrar em contato com as larvas de *G. mellonella* nas colméias, mesmo assim, a probabilidade da geração de descendentes ainda é muito grande, face a diversidade alimentar que existe dentro da colônia,

como a presença de exúvias, pólen de outras plantas etc. Mesmo em condições de quantidade significativa de pólen Bt, o ciclo biológico de *G. mellonella* pode ser completado, como observado neste trabalho com a proteína Cry1Ab. Essa observação sugere que a pressão de seleção de descendentes que poderiam tornar-se resistentes a esta proteína, pode ocorrer. Resistência essa, já relatada em Lepidoptera, na cultura do algodão transgênico que expressa a proteína Cry1Ac (BAGLA, 2010).

Os presumíveis efeitos ecológicos de uma possível ação tóxica do pólen Bt sobre *G. mellonella*, como por exemplo a deficiente reciclagem da cera velha e conseqüente aumento da prevalência de agentes patogênicos às abelhas nas colônias, tem sido relatado por pesquisadores como Sabugosa-Madeira et al. (2007); Sabugosa-Madeira e Abreu (2009); Trevisan et al. (2012) embora sem comprovação efetiva, bem como, a afirmação feita por Hanley et al. (2003) de que o pólen de milho transgênico, que expressa a proteína Cry1f, possa ser utilizado como inseticida à *G. mellonella*. No entanto, para uma avaliação real dessas ponderações, são necessários estudos de campo, levando em consideração as diferentes proteínas transgênicas, o que não foi realizado até o momento.

## CONCLUSÕES

O pólen do milho transgênico que expressa a proteína Cry1Ab, ocasiona mortalidade larval significativa em larvas de *Galleria mellonella* quando ofertado com cera virgem. No entanto quando oferecido junto com favo de *Apis mellifera* a mortalidade não é significativa.

O pólen do milho associado a cera virgem, em qualquer genótipo, como alimento retarda o desenvolvimento larval de *Galleria mellonella* e origina pupas menos largas e compridas, em relação a uma mistura de pólenes variados com a mesma cera.

O favo de *Apis mellifera* adicionado ao pólen Bt, é substrato alimentar à *Galleria mellonella* que origina pupas igualmente largas e compridas aos indivíduos que se alimentaram com cera virgem e pólen de diversas plantas.

O ciclo de vida de *Galleria mellonella* é prolongado quando em sua fase larval os indivíduos se alimentam de uma dieta a base de cera virgem e pólen de milho, em qualquer genótipo.

**AGRADECIMENTOS.**

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por ter concedido ao primeiro autor uma bolsa de

estudos que viabilizou o estágio doutoral em Portugal, e por consequência esta investigação. A pós-doutoranda Manuela Oliveira pela ajuda em ensaios laboratoriais. A empresa Hectagro por incentivar o trabalho, fornecendo sementes.

**ABSTRACT:** This study aims to evaluate the effects of transgenic corn pollen, which expresses the Cry1Ab protein entomopathogenic on biological aspects the wax moth (*Galleria mellonella*) and thus propose a discussion on the possibilities for this condition pyralid the field, discussing possible ecological effects. For this we performed a bioassay, where it was offered to the larvae conventional and commercial Bt pollen, The duration of the larval stage of *G. mellonella* was affected by the supply of Mays pollen, conventional or transgenic, provided the biggest records. Mortality was higher in individuals fed with transgenic pollen and bee wax, but did not differ from other foods, when they were fed with transgenic pollen and honeycomb of *Apis mellifera*. The width and the length of larvae originated from larvae fed with beeswax added to conventional or transgenic pollen were lower than other treatments. The Mays pollen, conventional or transgenic alone is a less suitable food for the development of *G. mellonella*, in relation to a diet consisting of pollen from various plants.

**KEYWORDS:** Wax moth. Bt maize. *Zea mays*.

**REFERÊNCIAS**

- AYRES, M.; AYRES Jr, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. A. **BioEstat 5.0 – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, Tefé, 2007. 380p.
- BAGLA, P. Hardy Cotton-Munching Pests Are Latest Blow to GM Crops. **Science**, Washington, v. 327, p. 1439, 2010.
- BRAR, H. S.; B. S. BRAR, G. S.; GATORIA, H. S. JHAJJ. Biology of greater wax moth, *Galleria mellonella* L. infesting *Apis mellifera* L. colonies in Punjab. **Journal Insect Science**, colonies in Punjab, v. 9, p. 12-14, 1996.
- BRIGHENTI, D. M.; CARVALHO, C. F.; CARVALHO, G. A.; BRIGHENTI, C. R. G. Eficiência do *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki (Berliner, 1915) no controle da traça da cera *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 29, p. 60-68, 2005.
- CARDOSO, A. C.; M.; PRATA, C. A.; PREZOTO, J. F. F. Exigências térmicas de estágios imaturos de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, p. 657-661, 2007.
- EL-SAWAF, S. K. The life-history of the greater wax-moth (*Galleria mellonella* L.) in Egypt, with special reference to the morphology of the mature larva. **Bulletin de la Société Fouad 'ier d' Entomologie**, Cairo, v. 34, p. 247-297, 1950.
- HANLEY, A., HUANG, Z., PETT, W. Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. **Journal of Apicultural Research**, Cardiff, v. 42, p. 77-81, 2003.
- JUNIOR, J. L. B. S.; MALERBO-SOUZA, D. T. Frequência dos insetos na polinização e produção de algodão. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 26, p. 461-465, 2004.
- KUVSHINOV, V.; KOIVU, K.; KANERVA, A.; PEHU, E. Transgenic crop plants expressing synthetic Cry9aa gene are protected against insect damage. **Plant Science**, Ireland, v. 160, p. 341-353, 2001.
- LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo, Ícone, 1991. 336p.

- LEE, M. K.; CURTISS, A.; ALCANTARA, E.; DEAN, D. H. Synergistic Effect of the *Bacillus thuringiensis* Toxins CryIAa and CryIAc on the Gypsy Moth, *Lymantria dispar*. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 583-586, 1996.
- LOUVEAUX, J.; ALBISETTI, J. Observations préliminaires sur la récolte du pollen par les abeilles dans "les grandes landes" de la forêt Landaise. **Annales Abeille**, Paris, v. 6, p. 229-234, 1963.
- MELATHOPOULOS, A., NELSON, D., CLARK, K. HIGH. Velocity electron-beam radiation of pollen and comb for the control of *Paenibacillus larvae* subspecies larvae and *Ascosphaera apis*. **American Bee Journal**, San Antonio, v. 144, p. 714-720, 2004.
- NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection reality and prospects. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, p. 669- 676, 2000.
- NOMURA, E.; CHAUD-NETTO, J.; GOBBI, N. Efeito da dieta no ciclo biológico das lagartas das traças-da-cera *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera, Pyralidae) e *Achroia grisella* (Fabricius, 1754) (Lepidoptera, Pyralidae). **Revista Brasileira de Zoociências**, Juiz de Fora, v. 8, p. 1-6, 2006.
- SABUGOSA-MADEIRA, J. B. C. **Estudo comparativo dos fluxos polínicos anemófilos e entomófilos (*Apis mellifera* spp) e respectivo contributo na produtividade agrícola e qualidade dos produtos da colmeia** 2008. 145 p. Tese (Doutorado)- Universidade do Porto, Porto.
- SABUGOSA-MADEIRA, J. B.; ABREU, I. O pólen de milho geneticamente modificado. Implicações no desequilíbrio ecológico das colméias. **Revista Real Academia Galega de Ciências**, Santiago de Compostela, v. 28, p. 71-85, 2009.
- SABUGOSA-MADEIRA, J. B., ABREU, I., 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.
- SAUKA, D. H.; BENINTENDE, G. B. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 40, p. 124-140, 2008.
- 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. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**. Brasília, v. 21, p. 11-81, 2004.
- TREVISAN, H.; CARVALHO, A. G.; AGUIAR, A.; MADEIRA, B.; ABREU, I. Pólen do milho transgênico - Possível efeito ecológico nas colônias de abelhas. **Agrotec**, Porto, n. 01, p. 80-81, 2012.
- VANDENBERG, J. D.; SHIMANUKI, H. Viability of *Bacillus thuringiensis* and its efficacy for larvae of the greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae) following storage of treated combs. **Journal of Economic Entomology**, Columbia, v. 83, p. 760-765, 1990.
- ZACARIN, G. G.; GOBBI, N.; CHAUD-NETTO, J. Preferência de *Apanteles galleriae* Wilkinson (Hymenoptera: Braconidae) por *Galleria mellonella* (L.) ou *Achroia grisella* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p. 65-70, 2004.