

UFRRJ

INSTITUTO DE FLORESTAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E FLORESTAIS**

TESE

**Análise da Influência de Plantas Transgênicas em *Urbanus
acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperiiidae) e em
Galleria mellonella (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera:
Pyralidae)**

HENRIQUE TREVISAN

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E
FLORESTAIS**

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE PLANTAS TRANSGÊNICAS EM *Urbanus
acawoios* (WILLIAMS, 1926) (LEPIDOPTERA: HESPERIIDAE) E EM
Galleria mellonella (LINNAEUS, 1758) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)**

HENRIQUE TREVISAN

Sob a orientação do Professor
Acacio Geraldo de Carvalho

e Co-orientação das Professoras
Ana Álvares Ribeiro Marques de Aguiar
Ilda da Conceição Abreu de Noronha

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciências** no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Ambientais e
Florestais, área de concentração em
Conservação da Natureza.

Seropédica, RJ
Maio de 2010

631.5233

T814a

T

Trevisan, Henrique, 1976-.

Análise da influência de plantas transgênicas em *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperiiidae) e em *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera:Pyralidae) / Henrique Trevisan - 2010.

78 f.: il.

Orientador: Acácio Geraldo de Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais.

Bibliografia: f. 71-78.

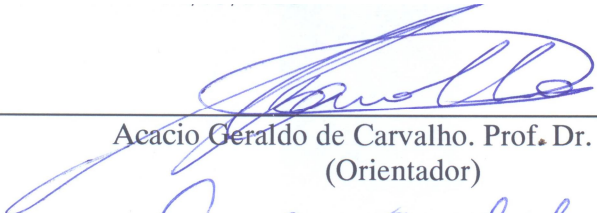
1. Plantas transgênicas - Teses. 2. Plantas transgênicas - Efeito dos herbicidas - Teses. 3. *Bacillus thuringiensis* - Teses. I. Carvalho, Acacio Geraldo de, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E FLORESTAIS

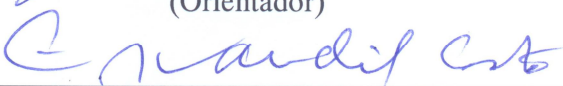
HENRIQUE TREVISAN

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de Concentração em Conservação da Natureza.

TESE APROVADA EM 31/05/2010



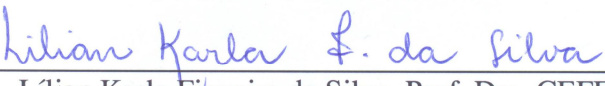
Acacio Geraldo de Carvalho. Prof. Dr. UFRRJ
(Orientador)



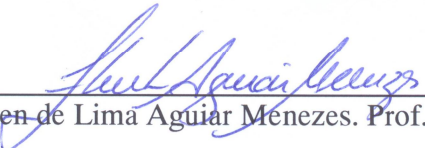
Ervandil Corrêa Costa. Prof. Dr. UFSM



Marco Antonio Diodato. Prof. Dr. UFERSA



Lillian Karla Figueira da Silva. Prof. Dra. CEFET-RJ



Elen de Lima Aguiar Menezes. Prof. Dra. UFRRJ

Ao meu Pai Argemiro Trevisan, por ter me ensinado o valor do amor, e nele encontrar a certeza do caminho. Em especial a minha mãe Vilza Aparecida Fernandes Trevisan “*in memoriam*”, que partiu ao encontro do Pai criador, e que sempre será meu símbolo eterno de força e garra, para continuar trilhando a estrada chamada vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao divino Pai eterno pela oportunidade desta vida.

Ao mestre Jesus Cristo Redentor pela iluminação do caminho.

A Virgem da Conceição pelo seu significado em minha vida.

Aos meus Guias e protetores, pelo direcionamento e proteção.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pelo aprendizado científico ao longo da graduação do mestrado e do doutorado.

Ao Prof. Dr. Acacio Geraldo de Carvalho, pela orientação e todo apoio concedido em todas as etapas do trabalho.

Às professoras Dra. Ana Álvares Ribeiro Marques de Aguiar e Dra. Ilda da Conceição Abreu de Noronha, da Universidade do Porto, que me acolheram e me orientaram durante o período de estágio doutoral em Portugal.

Ao Dr. Bernardo Sabugosa Madeira por todo o apoio concedido no período do estágio doutoral em Portugal, e posterior a esse também, contribuindo com excelentes discussões.

À professora Dra. Isabel Mafra, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por toda a contribuição no experimental que envolveu a biologia molecular.

Aos meus irmãos Erica Trevisan e Eduardo Trevisan, pelos estímulos e apoio.

Aos estagiários Camila Souza Rocha e Amós Siqueira Teodoro, pela ajuda na parte prática do trabalho.

Aos companheiros do alojamento da Pós Graduação da UFRRJ, Marcus Sandes Pires, Julio Cesar Cenci de Aguiar, Daniele Fernanda Rosin e Patrícia Barizon, por toda amizade companheirismo e paciência nos momentos de tensão.

Aos meus amigos Marcio de Mello Gomes e Júlio Gama, pelas orações e palavras amigas que me conduziram à horizontes mais adequados no decorrer desta caminhada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de uma bolsa de estudos com estágio doutoral em Portugal.

RESUMO

TREVISAN, Henrique. **Análise da influência de plantas transgênicas em *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperiiidae) e em *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae).** 2010. 78 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais e Florestais) Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

O presente trabalho foi realizado em duas etapas, com experimentais distintos, e que resultaram em dois capítulos. O primeiro versa sobre a avaliação da influência do complexo tecnológico empregado na soja transgênica, em aspectos biológicos de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperiiidae). Quatro canteiros de soja foram cultivados, sendo três com soja geneticamente modificada cultivar P98R62 (soja GM_{RR}) e um com soja convencional, cultivar BRS 232 (soja conv.). Somente em dois canteiros com plantas transgênicas foi aplicado o herbicida na concentração de 1200 g ia ha⁻¹, nas formulações Roundup Ready® e Roundup WG®, ambos aplicados duas vezes, aos 25 e 45 dias após a emergência das plântulas. Ovos providos de uma criação em borboletário ao ar livre, e oriundos de uma mesma fêmea, foram utilizados para montagem de cinco tratamentos com 25 lagartas cada, sendo estes constituídos por lagartas alimentadas com folhas de soja conv. soja GM_{RR} sem aplicação do herbicida, soja GM_{RR} tratada com glifosato na formulação Roundup Ready®, GM_{RR} tratada com glifosato na formulação Roundup WG® e folhas de *C. fairchildiana*. A mortalidade de larvas foi superior nos tratamentos que continham soja GM_{RR}, com ou sem aplicação de herbicida, quando comparada com a mortalidade das larvas alimentadas com *C. fairchildiana* e soja conv. As pupas providas de lagartas alimentadas com soja conv. e *C. fairchildiana* apresentaram-se 100% viáveis, já as providas de GM_{RR} tratada com Roundup Ready®, Roundup WG® e sem aplicação de herbicida, apresentaram-se 84,6%; 87,5% e 88,2% viáveis, respectivamente. O segundo capítulo versa sobre a avaliação da influência do pólen do milho transgênico resistente a insetos, sobre *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae). Esse piralídeo é um lepidóptero associado à colméias de abelhas, suas larvas se alimentam de cera velha, pólen, exúvias etc. Existem opiniões contrárias quanto a sua inocuidade às abelhas, e conseqüentemente a produção apícola, certos investigadores o consideram pragas de apiários, já outros o classificam como um organismo importante na reciclagem de matéria orgânica dentro das colméias. Nessa última visão, podem ser considerados benéficos às abelhas. Dentro desse contexto, a adoção de cultivos transgênicos resistentes a insetos pela expressão da proteína Bt, de *Bacillus thuringiensis*, poderá causar afecção das larvas de *G. mellonella*. As abelhas ao coletarem pólen e armazenar nas colméias podem expor esse lepidóptero a intoxicação pela proteína Bt presente no pólen. O presente trabalho tem o objetivo de avaliar a influência do pólen do milho Bt sobre *G. mellonella* e com isso traçar uma discussão sobre a possibilidade de afecção à campo deste lepidóptero. Para isso foi realizado um ensaio biológico, onde foi ofertado às larvas pólen Bt, convencional e comercial. A duração da fase larval de *G. mellonella* foi afetada pela oferta de pólen, sendo que o do milho, convencional ou transgênico, forneceu os maiores registros na duração. A mortalidade foi superior nos indivíduos alimentados com cera virgem e pólen transgênico, no entanto não diferiu dos demais alimentos, quando junto ao pólen Bt, foi ofertado favo de *Apis mellifera*. A largura e comprimento das pupas providas de lagartas alimentadas com cera virgem adicionada ao pólen transgênico ou convencional, foram inferiores aos demais tratamentos. 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: Transgênicos, insetos não alvo, herbicida, *Bacillus thuringiensis*.

ABSTRACT

TREVISAN, Henrique. **Analysis of the influence the transgenic plants in *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: HesperIIDae) and *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae).** 2010. 78 f. Thesis (Doctorate in Environmental Sciences and Forestry). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

This study was conducted in two stages, with different experiments and culminating in two chapters. The first focuses on the evaluation of the influence of the complex technology used in transgenic soybean in the biological aspects of *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: HesperIIDae). Four plots of soybeans were grown, three of genetically modified soybean cultivar P98R62 (soybean GMRR) and with a conventional soybean cultivar BRS 232 (Soybean conv.). Only two plots with transgenic herbicide were applied at a concentration of 1200 g ai ha⁻¹, the Roundup Ready® and Roundup® WG, both applied twice, 25 and 45 days after emergence. 125 eggs coming from a butterfly rearing in the open air, and from the same female, were used to assemble the five treatments each with 25 larvae, which are made of larvae fed on leaves of Soybean conv., Soy GMRR without herbicide application, soy GMRR treated with glyphosate in Roundup Ready®, GMRR treated with glyphosate in Roundup® WG and leaves of *C. fairchildiana*. The mortality rate of larvae was higher in treatments containing soy GMRR, with or without herbicide, when compared with the mortality of larvae fed with *C. fairchildiana* and soybean conv. The pupae originated from larvae fed on soy conv. and *C. fairchildiana* were shown 100% viable, as coming from the GMRR treated with Roundup Ready®, Roundup® WG and without herbicide, were shown up 84.6%, 87.5% and 88.2% viable, respectively. The second chapter deals with an assessment of the influence of pollen from transgenic corn resistant to insects on *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae). This is a lepidopteran pyralids associated with beehives; their larvae feed on old wax, pollen, exuviae, etc. There are conflicting opinions about its safety to bees, beekeeping and therefore, to consider a pest of apiaries, others to classify as an important organism in the recycling of organic matter inside the hive. This last view may be considered beneficial to bees. Within this context, the adoption of transgenic crops resistant to insects by expressing the Bt protein from *Bacillus thuringiensis*, may cause disease of the larvae of *G. mellonella*. Bees to collect pollen and store in the hives can expose this lepidopteran to intoxication by Bt proteins present in pollen. This study aims to evaluate the influence of Bt corn pollen on *G. mellonella* and then trace a discussion about the possibility of the condition field of Lepidoptera. For this a bioassay was performed, where it was offered to the larvae pollen Bt, conventional and commercial. The duration of the larval stage of *G. mellonella* was affected by the supply of pollen, and the corn by 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 pollen from Bt was offered honeycomb of *Apis mellifera*. The width and length of larvae originated from larvae fed with bee wax added to conventional or transgenic pollen were lower than other treatments. The corn pollen, conventional or GM alone is a less suitable food for the development of *G. mellonella*, in relation to a diet consisting of pollen from various plants.

Key words: Transgenic, non-target insect, herbicide, *Bacillus thuringiensis*.

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1.	Valores observados para teor de macronutrientes presentes nas folhas de soja resistente ao glifosato, coletadas por ocasião do florescimento após aplicação desse herbicida em diferentes formulações, 25 dias após o plantio-----	13
Tabela 2.	Caracterização técnica das cultivares de soja utilizadas no estudo, conforme dados do fabricante.-----	17
Tabela 3.	Formulações do herbicida, época de aplicação e doses utilizadas nos canteiros de soja transgênica. Seropédica, RJ, 2008-----	17
Tabela 4.	Caracterização técnica dos produtos fitossanitários utilizados no estudo, conforme dados do fabricante.-----	18
Tabela 5.	Condições ambientais verificadas por ocasião das aplicações dos herbicidas, aos 25 e 45 dias após a emergência (DAE) das plântulas de soja. Seropédica, RJ, 2008.-----	19
Tabela 6.	Constituição e nomenclatura dos tratamentos utilizados no experimento. Seropédica, RJ, 2008.-----	20
Tabela 7.	Duração média (\pm DP), em dias, dos cinco ínstaes larvais de <i>Urbanus acawoios</i> alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro. Seropédica, RJ, 2008.-----	22
Tabela 8.	Duração média (\pm DP), em dias, dos períodos de pré-pupa, larval e pupal, longevidade do adulto e ciclo de vida de <i>Urbanus acawoios</i> , alimentados com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro. Seropédica, RJ, 2008.-----	23
Tabela 9.	Peso médio (\pm DP), em g, de lagartas, do segundo ao quinto ínstar larval, de <i>Urbanus acawoios</i> , alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro. Seropédica, RJ, 2008.-----	24

Tabela 10.	Peso médio (\pm DP), em g, de pré-pupas e pupas de <i>Urbanus acawoios</i> , provindas de lagartas alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro. Seropédica, RJ, 2008.-----	25
Tabela 11.	Índice de desenvolvimento médio(\pm DP) de lagartas de <i>U. acawoios</i> alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro. Seropédica, RJ, 2008.-----	31

CAPÍTULO II

Tabela 1.	Composição dos substratos alimentares ofertados a <i>G. mellonella</i> .-----	52
Tabela 2.	Reagentes e concentrações utilizados na reação em PCR para detecção do promotor (CaMV 35S) do gene de resistência a insetos expresso no milho MON 810.-----	57
Tabela 3.	Programa de temperaturas e tempos, utilizados no termociclador, para amplificação do promotor (CaMV 35S) do gene de resistência a insetos expresso no milho MON 810.-----	57
Tabela 4.	Reagentes utilizados na reação em PCR para detecção do gene da invertase do milho.-----	57
Tabela 5.	Programa de temperaturas e tempos, utilizados no termociclador, para amplificação do gene da invertase do milho.-----	58
Tabela 6.	Duração média (\pm DP), em dias, do período larval, pré-pupa, pupa, longevidade do adulto e do ciclo de vida de <i>G. mellonella</i> alimentadas com pólen de milho convencional (conv.), transgênico (Bt), comercial (com.) em diferentes proporções. Vairão, PT, 2009-----	61
Tabela 7.	Peso médio (\pm DP), em gramas, largura e comprimento médio (\pm DP), em cm, de pupas de <i>G. mellonella</i> provindas de lagartas alimentadas com pólen de milho convencional (conv.), transgênico (Bt), comercial (com.) em diferentes proporções. Vairão, PT, 2009-----	63

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.	<i>Urbanus acawoios</i> realizando cópula. Seropédica,RJ, 2008.-----	8
Figura 2.	Esquema que ilustra a lesão bioquímica promovida pela inibição da conversão de ácido chiquímico em ácido corismático pela ação do glifosato.-----	10
Figura 3.	Construção genética presente na soja Roundup Ready: 35S : Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor. CTP : peptídeo de transito para o cloroplasto. CP4-EPSPS : gene da 3-enolpiruvil-chiquimato-5-fosfatossintase. NOS : terminador da nopalina sintase.-----	10
Figura 4.	Aplicação do herbicida em Canteiro de soja Transgênica. Seropédica, RJ, 2008.-----	18
Figura 5.	Borboletários utilizados para criação de <i>Urbanus acawoios</i> em cativeiro. Seropédica, RJ, 2008.-----	19
Figura 6.	Lagartas individualizadas em placas de Petri e separadas por tratamento. Seropédica, RJ, 2008.-----	20
Figura 7.	Gaiolas entomológicas confeccionadas com material reciclável. Seropédica, RJ, 2008-----	21
Figura 8.	Comprimento e largura médio, em mm, de pupas de <i>U. acawoios</i> providas de lagartas alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro. Seropédica, RJ, 2008.-----	26
Figura 9.	Mortalidade larval percentual de lagartas de <i>Urbanus acawoios</i> alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro. Seropédica, RJ, 2008-----	27
Figura 10.	Percentual de mortalidade, por ínstar, de lagartas alimentadas com folhas soja transgênica tratadas com Roundup Ready. Seropédica, RJ, 2008.-----	28
Figura 11.	Percentual de mortalidade, por ínstar, de lagartas alimentadas com folhas soja transgênica tratada com Roundup WG. Seropédica, RJ, 2008.-----	28

Figura 12.	Percentual de mortalidade, por ínstar, de lagartas alimentadas com folhas de soja RR. Seropédica, RJ, 2008-----	28
Figura 13.	Percentual de mortalidade, por ínstar, de lagartas alimentadas com folhas de soja convencional. Seropédica, RJ, 2008.-----	28
Figura 14.	Percentual de mortalidade, por ínstar, de lagartas alimentadas com folhas de sombreiro. Seropédica, RJ, 2008-----	28
Figura 15.	Sobrevivência percentual acumulada de lagartas de 1° à 5° ínstar de <i>Urbanus acawoios</i> alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro. Seropédica, RJ, 2008-----	30
Figura 16.	Viabilidade de pupas provindas de lagartas de <i>Urbanus acawoios</i> alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro. Seropédica, RJ, 2008.-----	34
Figura 17.	Percentual de lagartas de <i>Urbanus acawoios</i> alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro que atingiram a fase adulta.-----	35

CAPÍTULO II

Figura 1.	Esquema dos efeitos das proteínas Cry no intestino médio de insetos suscetíveis -----	42
Figura 2.	Localização geográfica da coleta de pólen do milho convencional em Portugal.-----	48
Figura 3.	Localização geográfica da coleta de pólen do milho transgênico em Portugal.-----	49
Figura 4.	Coleta de panículas em plantação de Milho. Macieira de Rates, PT, 2009.-----	49
Figura 5	Crivagem do pólen. Porto, PT, 2009-----	50
Figura 6.	Pólen depositado na bandeja coletora após crivagem. Porto, PT, 2009.-----	50

Figura 7.	Ovos de <i>G. mellonella</i> ovipositados no papel, em criação de laboratório. Vairão, PT, 2009.-----	51
Figura 8.	Derretimento de favos utilizados por <i>Appis mellifera</i> em autoclave. Vairão, PT, 2009.-----	52
Figura 9.	Favo de <i>A ppis mellifera</i> derretido em autoclave. Vairão, PT, 2009.----	53
Figura 10.	Câmara de criação das lagartas de <i>Galleria mellonella</i> em ambiente com luminosidade reduzida artificialmente. Vairão, PT, 2009.-----	54
Figura 11.	Gaiolas entomológicas para criação de adultos de <i>Galleria mellonella</i> dispostas em ambiente com luminosidade reduzida artificialmente. Vairão, PT, 2009.-----	55
Figura 12.	Eletroforese em gel de poliacrilamida dos polipeptídicos presentes nos extratos polínicos de planta de milho transgênico (Bt) e convencional (com.). M – Marcador. Porto, PT, 2009-----	59
Figura 13.	Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR para a detecção molecular do evento específico do milho MON810. Porto, PT, 2009----	60
Figura 14.	Mortalidade larval percentual de <i>G. mellonella</i> alimentadas com pólen de milho convencional (conv.), transgênico (Bt), comercial (com.) em diferentes proporções. Vairão, PT, 2009-----	64
Figura 15.	<i>Apis mellifera</i> visitando panícula de <i>Zea mays</i> (milho). Macieira de Rates, PT 2009.-----	66
Figura 16.	Viabilidade pupal de <i>G. mellonella</i> alimentada na fase larval com pólen de milho convencional (conv.), transgênico (Bt), comercial (com.) em diferentes proporções. Vairão, PT, 2009.-----	67
Figura 17.	Percentual de larvas de <i>G. mellonella</i> que atingiram a fase adulta alimentadas com pólen de milho convencional (conv.), transgênico (Bt), comercial (com.) em diferentes proporções. Vairão, PT, 2009.----	68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL -----	1
CAPITULO I -----	4
RESUMO-----	5
ABSTRACT-----	6
1. INTRODUÇÃO-----	7
2. REVISÃO DE LITERATURA-----	7
2.1. <i>Urbanus acawoios</i> (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperidae).-----	7
2.2. Ação de culturas transgênicas resistente a herbicidas e possíveis implicações em insetos.-----	8
3. MATERIAL E MÉTODOS-----	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	22
5. CONCLUSÕES-----	35
CAPITULO II -----	37
RESUMO-----	38
ABSTRACT-----	39
INTRODUÇÃO-----	40
2. REVISÃO DE LITERATURA-----	40
2.1 Efeitos de culturas transgênicas Bt em insetos não alvo.-----	40
3. MATERIAL E MÉTODOS-----	48
3.1. Obtenção do pólen transgênico e convencional.-----	48
3.1.1. Coleta, crivagem, secagem e armazenagem do pólen de milho.-----	49
3.2. Obtenção da população base de <i>Galleria mellonella</i> .-----	51
3.3. Análise da ação do pólen transgênico em <i>Galleria mellonella</i> .-----	51
3.4. Extração e quantificação de proteínas em pólen convencional e transgênico.-----	55

3.4.1 Extração de proteínas.-----	55
3.4.2 Quantificação de proteínas.-----	56
3.5 Detecção do gene Cry1Ab por reação em PCR.-----	56
3.5.1 Extração de DNA.-----	56
3.5.2 Primers e parâmetros utilizados na reação por PCR para detecção do evento MON810 (ISO 21569, 2005).-----	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	57
4.1 Perfil de proteínas do milho convencional e transgênico.-----	58
4.2 Detecção do gene Cry1Ab, evento MON810, em pólen de milho transgênico.-----	60
4.3 Análise da influência do pólen Bt em <i>G. mellonella</i> .-----	61
5. CONCLUSÕES -----	68
2. CONCLUSÕES GERAIS -----	69
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	70
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	71

1. INTRODUÇÃO GERAL

Recentemente a biotecnologia vegetal permitiu, através da engenharia genética, a criação de plantas geneticamente modificadas com características agronômicas desejáveis. A adoção desses vegetais pela agricultura, culminou em intensas discussões científicas, que esbarram também em questões éticas e ideológicas, sobre sua segurança ambiental e alimentar.

Dentre os inúmeros tipos de vegetais transgênicos que vem sendo cultivados no mundo, as duas culturas que ocupam as maiores áreas, são as de plantas resistentes ao herbicida glifosato, em torno de 74 milhões de ha, e as resistentes a insetos, em torno de 14 milhões de ha plantados (JAMES, 2008).

As primeiras, conhecidas como plantas RR, receberam essa abreviação do nome comercial do herbicida Roundup Ready® e as segundas, conhecidas como plantas Bt, receberam essa abreviação em função do nome da bactéria denominada *Bacillus thuringiensis*. Esse microorganismo é utilizado no controle biológico de determinados grupos de insetos praga, em função de sua atividade entomopatogênica, atividade essa expressa nas plantas Bt.

O glifosato, princípio ativo do herbicida Roundup Ready®, inibe a síntese dos aminoácidos aromáticos atuando na enzima 5 enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) (SHANER e BRIDGES, 2003). As plantas transgênicas resistente a esse herbicida, foram obtidas pela inserção de um gene oriundo do genoma da *Agrobacterium sp.* o qual codifica uma variante da EPSPs, especialmente tolerante à inibição pelo glifosato (PADGETTE et al., 1995).

Sendo assim, sob tratamento com esse agroquímico, as plantas com essa característica não são afetadas, em virtude da ação continuada e sistemática da enzima alternativa, insensível ao produto (SANTOS et al., 2007). Já as plantas infestantes da cultura, acabam morrendo pela ação do herbicida, sendo esta a característica agronômica desejável.

No caso dos vegetais transgênicos resistentes a insetos, pode-se dizer que a propriedade entomopatogênica da bactéria *B. thuringiensis* foi a inspiração desta tecnologia. Essa característica inseticida é atribuída pela ação de proteínas denominadas Cry, produzidas pelo microorganismo quando na fase de esporulação. Nesse sentido, a resistência a insetos das plantas Bt foi obtida pela inserção do gene bacteriano precursor destas proteínas, no genoma dessas plantas. Dessa forma, quando expresso nos vegetais, estes passam a produzir tais proteínas, e o inseto fitófago ao alimentar-se dos tecidos desses vegetais, acaba morrendo pela ação desta proteína, o que pode, dessa forma, controlar uma possível praga da cultura em questão.

Dentre as plantas transgênicas comerciais mais cultivadas no Brasil, a soja Roundup Ready®, liberada legalmente para comercialização no Brasil desde 1998, pela CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança), é a cultura de maior destaque, sendo que 59% de toda a safra de 2008 de grãos de soja, foi provinda de cultivares resistentes a herbicidas, segundo a empresa de consultoria agrícola Agroconsult.

As plantas Bt ocupam uma área menor de cultivo no Brasil, sendo que apenas o algodão, liberado para comercialização em 2005, e o milho, liberado em 2007, são as únicas culturas que possuem a característica Bt, e que são cultivadas comercialmente no Brasil. Também por ter seu cultivo liberado mais recentemente, a quantidade de pesquisas também é menor.

Embora os pareceres técnicos, que levam em consideração o plantio, a segurança ambiental e alimentar, emitidos pela CNTBio, sobre a utilização destes vegetais, se demonstram conclusivos quanto a inocuidade de interações nocivas a essas questões, ainda paira muita dúvida e incerteza, mesmo no meio científico.

Sobre essa conjectura, Nodari e Guerra (2000) relatam que a discussão mundial sobre os riscos e impactos dos OGMs (Organismos geneticamente modificados) na saúde humana e

animal e ao meio ambiente, bem como seus impactos socioeconômicos, estão longe de terminar, sendo que a quantidade de informação científica é insuficiente. Os mesmos autores afirmam que pouco se conhece sobre os efeitos diretos dos produtos dos transgenes em organismos, no solo e na água, e não são conclusivos os estudos sobre pássaros ou outros animais que consomem insetos que se alimentam de plantas transgênicas.

No Brasil a grande maioria dos trabalhos onde é avaliada a influência da tecnologia RR e Bt em artrópodes, limita-se na realização de levantamentos populacionais nos plantios, com a exceção a trabalhos com insetos predadores, almejando, dessa forma, entender o impacto destas tecnologias na ocorrência e abundância dos insetos, sejam eles não alvos ou tido como pragas.

Nesse sentido, fazem-se necessários estudos onde organismos presentes na fauna local e que estejam associados direta ou indiretamente às culturas transgênicas, tenham sua biologia e etologia estudadas em trabalhos onde a transgênia seja levada em consideração, e no caso das plantas RR, o agrotóxico também. Aliado a essa premissa, também é necessário uma discussão com abordagens ecológicas, onde os dados da biologia dos organismos avaliados sirvam de base para discussões dos possíveis impactos que o uso da tecnologia possa ocasionar ao meio ambiente.

Sobre esses impactos, pesquisadores portugueses demonstraram o potencial efeito em colméias colocadas na vizinhança de campos de milho transgênico resistentes a insetos (SABUGOSA-MADEIRA et al. 2007). O pólen destas plantas, por conter a proteína Cry, poderia estar afetando negativamente a vida de lepidópteros, entre eles *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), denominada traça de cera, que vive em associação com as colméias. Esse lepidóptero desempenha um papel importante na limpeza de favos e impede, dessa forma, a proliferação de agentes patogênicos muito prejudiciais a abelhas (MELATHOPOULOS et al. 2004). As pesquisas sobre o real impacto do pólen Bt na biologia deste lepidóptero não são conclusivas.

Relativo a ação da tecnologia Roundup Ready® em insetos, nota-se um número maior de pesquisas que avaliam a ocorrência e abundância desses organismos nos cultivos com essa característica. Entre elas, Pereira et al. (2007) que registraram uma menor abundância destes organismos após a aplicação de glifosato na soja RR. Brondani et al. (2008) afirmam que a soja RR e a aplicação do glifosato alteraram a ocorrência de algumas espécies de insetos-praga e inimigos naturais em cultivos dessas plantas. Essas respostas populacionais discrepantes podem estar relacionadas a fatores como a composição qualitativa de plantas infestantes presentes nos cultivos RR ou o efeito direto do herbicida, que até o momento não foi comprovado efetivamente (BORNDANI et al., 2008).

No entanto, trabalhos sobre a ação dessa tecnologia na biologia de artrópodes, em especial em Lepidoptera, não são contundentes e numerosos, bem como os que avaliam os possíveis efeitos em interações ecológicas nesse grupo de organismos. Dessa forma poucas iniciativas são encontradas na literatura, a exemplo a investigação de Morjan e Pedigo (2002), que concluíram que variedades de soja RR tratada e não tratada com glifosato, e variedades de soja convencional isogênicas, não afetaram significativamente aspectos biológicos de *Hypena scabra* (Lepidoptera: Noctuidae), uma desfolhadora da soja comum nos Estados Unidos da América.

No Brasil é observado com certa facilidade pesquisas onde é avaliada a influência da alimentação com folhas de cultivares de soja convencional na biologia de lepidópteros, como exemplo os trabalhos de Silva (1995) e Pinto (2001), com a espécie *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperidae). Esse hesperídeo é um severo desfolhador de *Clitoria fairchildiana* (Fabaceae), promovendo a desfolha completa desta árvore em surtos anuais. Embora não seja uma praga efetiva em *Glycine max* (Fabaceae), ele também ocorre nesta

planta e completa seu ciclo biológico quando alimentado com folhas desse vegetal, como demonstrado nestes dois trabalhos. Por essa característica pode ser considerada uma espécie com potencial para ser utilizada em investigações sobre a influência da soja RR e do agrotóxico associado a essa tecnologia, em Lepidoptera.

Diante do exposto, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar a influência da soja RR e da aplicação do glifosato no desenvolvimento de *U. acawoios*, sendo o objeto de estudo do primeiro capítulo, bem como a do pólen do milho Bt no desenvolvimento de *G. mellonella*, discussão abordada na segunda parte deste trabalho. Propõe-se também discutir, em função da análise do desenvolvimento desses lepidópteros, parte do possível impacto dessas tecnologias no ambiente.

CAPÍTULO I

EFEITO DA SOJA TRANSGÊNICA RESISTENTE À HERBICIDA E DA APLICAÇÃO DE GLIFOSATO EM *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperiiidae)

RESUMO

A tecnologia denominada Roundup Ready[®], nome comercial de plantas modificadas geneticamente que possuem a característica de serem resistentes a herbicidas a base de glifosato, pode ser considerada, atualmente, como o evento de maior expressão da biotecnologia vegetal, haja visto os milhões de hectares plantados no mundo. O Brasil é o terceiro maior produtor de soja do mundo, e após a liberação do cultivo destas variedades transgênicas, em 1998 pela CTNBio, intensas discussões sobre a influência desta tecnologia no ambiente e conseqüentemente nos organismos nele presentes, foram travadas, entre debates científicos acalorados, que também esbarram em questões éticas e ideológicas, o tema ainda é elemento de muita dúvida e incertezas. Nesse sentido foi realizado este experimental, com o objetivo de avaliar a influência desta tecnologia em *Urbanus acawoios*, lepidóptero desfolhador da espécie florestal *Clitoria fairchildiana* (Fabaceae), mas que também completa seu ciclo em *Glycine max* (Fabaceae). Quatro canteiros de soja foram cultivados, sendo três com soja geneticamente modificada cultivar P98R62 (soja GM_{RR}) e um com soja convencional, cultivar BRS 232 (soja conv.). Somente em dois canteiros com plantas transgênicas foi aplicado o herbicida na concentração de 1200 g ia ha⁻¹, nas formulações Roundup Ready[®] e Roundup WG[®], ambos aplicados duas vezes, aos 25 e 45 dias após a emergência das plântulas. 125 ovos providos de uma criação em borboletário ao ar livre, e oriundos de uma mesma fêmea, foram utilizados para montagem de cinco tratamentos com 25 lagartas cada, sendo estes constituídos por lagartas alimentadas com folhas de soja conv., soja GM_{RR} sem aplicação do herbicida, soja GM_{RR} tratada com glifosato na formulação Roundup Ready[®], GM_{RR} tratada com glifosato na formulação Roundup WG[®] e folhas de *C. fairchildiana*. Na duração média de cada um dos cinco instares larvais, em dias, para as lagartas alimentadas com folhas destes vegetais, foi constatado diferença significativa nos indivíduos alimentados com folhas de *C. fairchildiana*, sendo esta significativamente inferior, quando comparada com as médias obtidas nos outros tratamentos. A mortalidade percentual de larvas foi superior nos tratamentos que continham soja GM_{RR}, com ou sem aplicação de herbicida, quando comparada com a mortalidade das larvas alimentadas com *C. fairchildiana* e soja conv. As pupas providas de lagartas alimentadas com soja conv. e *C. fairchildiana* apresentaram-se 100% viáveis, já as providas de GM_{RR} tratada com Roundup Ready[®], Roundup WG[®] e sem aplicação de herbicida, apresentaram-se 84,6 %; 87,5% e 88,2% viáveis, respectivamente.

Palavras chave: Transgênicos, insetos não alvo, herbicida

ABSTRACT

A technology called Roundup Ready ®, trade name of genetically modified plants that possess the characteristic of being resistant to glyphosate-based herbicides, can be considered nowadays as the event of increased expression of plant biotechnology, there are millions of hectares planted in the world. Brazil is the third largest soybean producer in the world, and after liberating the cultivation of these transgenic varieties in 1998 by the National Biosafety Technical committee (CTNBio), intense discussions about the influence of technology on the environment and consequently on the organisms presented in it were caught between a heated scientific debate, which also run into ethical and ideological issues, the topic is still an element of much doubt and uncertainty. In that sense this study was conducted with the objective of evaluating the influence of this technology in *Urbanus acawoios*, lepidopteran forest species defoliating *Clitoria fairchildiana* (Fabaceae), but also completes its cycle in *Glycine max* (Fabaceae). Four plots of soybeans were grown, three of genetically modified soybean cultivar P98R62 (soybean GMRR) and with a conventional soybean cultivar BRS 232 (Soybean conv.). Only two plots with transgenic herbicide were applied at a concentration of 1200 g ai ha⁻¹, the Roundup Ready ® and Roundup ® WG, both applied twice, 25 and 45 days after emergence. 125 eggs coming from a butterfly rearing in the open air, and from the same female, were used for assembly five treatments each with 25 larvae, which are made of larvae fed on leaves of Soybean conv., Soy GMRR without herbicide application, soy GMRR treated with glyphosate in Roundup Ready ®, GMRR treated with glyphosate in Roundup ® WG and leaves of *C. fairchildiana*. On average duration of each of the five larval instars in days for the larvae fed on leaves of these plants, we found significant differences in individuals fed with leaves of *C. fairchildiana*, which is significantly lower when compared with the averages in the other treatments. The mortality rate of larvae was higher in treatments containing soy GMRR, with or without herbicide, when compared with the mortality of larvae fed *C. fairchildiana* and soybean conv. The pupae originated from larvae fed on soy conv. and *C. fairchildiana* were shown 100% viable, whereas the ones coming from the GMRR treated with Roundup Ready ®, Roundup ® WG and without herbicide, showed up 84.6%, 87.5% and 88.2% viable, respectively.

Key words: Transgenic, non-target insects, herbicide

1. INTRODUÇÃO

Com o advento das plantas geneticamente modificadas para expressarem resistência ao herbicida glifosato, muito tem se discutido sobre o impacto desta molécula no ambiente, haja vista a sua crescente utilização no agroecossistema, embora o cultivo destas plantas seja autorizado desde 1998 pela CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança), o tema ainda é objeto de muita polêmica e discussão no meio político e científico.

Dentro desta questão, uma das áreas de investigação concerne à influência deste agrotóxico na comunidade de artrópodes, sejam eles tidos como insetos benéficos, como no caso dos predadores, ou como insetos pragas, como no caso de lagartas desfolhadoras. Em ambas linhas de pesquisa o foco principal das investigações deve estar atrelado nas relações ecológicas entre inseto x planta x ambiente, buscando sempre uma abordagem ecológica, onde a influência da tecnologia avaliada seja focada no ponto de vista da sustentabilidade ambiental.

A maioria dos trabalhos nacionais onde é avaliada a influência da tecnologia Roundup Ready® (RR) em artrópodes, limita-se na realização de levantamentos populacionais, com a exceção a trabalhos com insetos predadores, almejando entender o impacto dessa tecnologia na ocorrência dos insetos, sejam eles benéficos ou tido como pragas. Nesse sentido, fazem-se necessários estudos onde organismos presentes na fauna local, tenham sua biologia e etologia estudadas em trabalhos onde a transgênia seja levada em consideração, e no caso das plantas RR, o agrotóxico também.

Grande parte da literatura científica sobre o assunto é estrangeira, e as pesquisas são feitas com os organismos nativos desses países e em condições edafoclimáticas locais, portanto, as avaliações ambientais e econômicas em outros países poderiam ser validadas em alguns casos, mas em outros casos são necessários estudos em locais específicos do cultivo, uma vez que os riscos dependem das características edafoclimáticas de cada região e de polinização de cada espécie (PESSÔA et al., 2006).

Nessa conjectura, Nodari e Guerra (2000) afirmam que pouco se conhece sobre os efeitos diretos do produto dos transgenes em organismos, no solo e na água, e não são conclusivos os estudos sobre pássaros ou outros animais que consomem insetos que se alimentam de plantas transgênicas. Nesse sentido, se faz necessários estudos que contemplem essa demanda.

Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar a influência da soja RR e da aplicação do herbicida Roundup em duas formulações, no desenvolvimento de *Urbanus acawoios* e com isso discutir hipóteses sobre a possível ação desta tecnologia em Lepidoptera.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: HesperIIDae).

U. acawoios (Figura 1) é um lepidóptero associado à espécie florestal *Clitoria fairchildiana* (Fabaceae), amplamente utilizada na arborização de vias públicas. Grandes surtos populacionais, segundo Nogueira e Habib (2002), por três ou duas gerações, causam grandes danos à essa espécie florestal, resultando na completa desfolha da copa. Os mesmos autores relatam uma total ausência de informação sobre essa espécie de inseto.



Figura 1. *Urbanus acawoios* realizando cópula. Seropédica,RJ, 2008.

No entanto, pesquisas foram realizadas no Instituto de Florestas, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no Laboratório de Entomologia Florestal, avaliando a influência de genótipos diferentes de feijão, soja e forrageiras da família Fabaceae, na biologia deste inseto, o que culminou na defesa de duas teses e quatro dissertações: Pinto (2001) Wendt (2004), Silva (1995), Machado (2000), Ventura (2001) e Silva (2003), respectivamente.

As pesquisas basearam-se em premissas, como a relatada por Holtz et al. (2003), de que herbívoros podem se adaptar a espécies de plantas filogeneticamente próximas ao seu hospedeiro de origem. Estas culturas sendo de grande importância econômica, e de mesma família botânica do hospedeiro nativo, a avaliação da possível adaptação deste inseto, torna-se profícua, pois se trata de um voraz desfolhador.

Nestes trabalhos foram estudadas a influência dessas plantas no desenvolvimento dos indivíduos da geração F zero, ou seja, provindos de ovos coletados no próprio hospedeiro típico no campo, e as larvas criadas com as folhas das respectivas culturas, em laboratório.

Nessas pesquisas constatou-se que o *U. acawoios* completa o ciclo biológico em todos os genótipos vegetais utilizados, com diferenças na duração das fases, em função do tipo de alimento ofertado. Para dar prosseguimento aos estudos se faz necessário estabelecer um protocolo que seja adequado à reprodução desta espécie de lepidóptero, uma vez estabelecido essa metodologia, avaliações consecutivas do ciclo biológico do inseto, alimentado com folhas das culturas de importância econômica, e em gerações posteriores a F zero, fornecerão valiosas informações quanto a real probabilidade, deste desfolhador, se tornar uma praga efetiva dessas plantas.

2.2 Ação de culturas transgênicas resistente a herbicidas e possíveis implicações em insetos.

Recentemente a biotecnologia vegetal permitiu, através da engenharia genética, a criação de plantas geneticamente modificadas com características agrônomicas desejáveis. A adoção

desses vegetais pela agricultura, culminou em intensas discussões científicas, que esbarram também em questões éticas e ideológicas, sobre sua segurança ambiental e alimentar. Uma dessas discussões concerne sobre influência dessas tecnologias em organismos, entre eles os insetos.

A tecnologia Roundup Ready (RR) é um desses casos, representa plantas modificadas geneticamente para serem resistentes a um herbicida cujo princípio ativo é o glifosato, sendo, segundo James (2008), o vegetal transgênico mais cultivado no mundo, em torno de 74 milhões de ha.

No Brasil, o cultivo de plantas que expressam essa característica é liberado, segundo o órgão regulador, a CTNBio em três culturas: a soja, aprovada para plantio em setembro de 1998, o milho e o algodão, ambos aprovados para cultivo em setembro de 2008.

Sem dúvida a soja é a de maior expressão, entre essas culturas, pois representa a maior área plantada no Brasil. Segundo a empresa de consultoria agrícola Agroconsult, cerca de 58,2% da safra brasileira 2008/09 desta oleaginosa foi provinda de plantas resistentes ao glifosato, sendo a região Sul do país a que mais cultivou esse vegetal, cerca de 75,4% de sua safra, sucedida pela região Centro Oeste (51%), região Sudeste (45,7%) e região Nordeste com 32,7%.

Pode-se dizer que a adoção desta tecnologia leva obrigatoriamente o uso de um agroquímico, o herbicida a base de glifosato, portanto, qualquer avaliação ambiental completa sobre essa questão, inclusive na influência em artrópodes, deve-se levar em consideração o uso e a ação dessa molécula nas plantas, bem como dos adjuvantes presentes nas formulações comerciais dos herbicidas. A modificação genética também é um fator a se considerar, sendo necessário esclarecer eventuais alterações na fisiologia da planta, bem como na sua bioquímica, em função da ação da construção genética introduzida ou mesmo da aplicação do herbicida, e associá-las a possíveis interferências nas relações entre organismos envolvidos, entre eles os insetos.

Nesse sentido, entendendo o mecanismo de ação do herbicida glifosato no vegetal, nota-se que a molécula provoca uma lesão bioquímica na planta, inibindo a síntese dos aminoácidos aromáticos, atuando na enzima precursora EPSPs 5 enolpiruvilchiquimato-3- fosfato sintase, evitando a transformação do ácido chiquímico em ácido corismático (SHANER e BRIDGES, 2003) (Figura 2). Assim a fitotoxicidade, segundo Roman et al. (2007), não resulta da falta de aminoácidos, e sim por um acúmulo de compostos intermediários tóxicos, como o ácido chiquímico, acúmulo esse promovido pela enzima EPSPs inibida pela ação do glifosato que compete pelo seu sítio ativo.

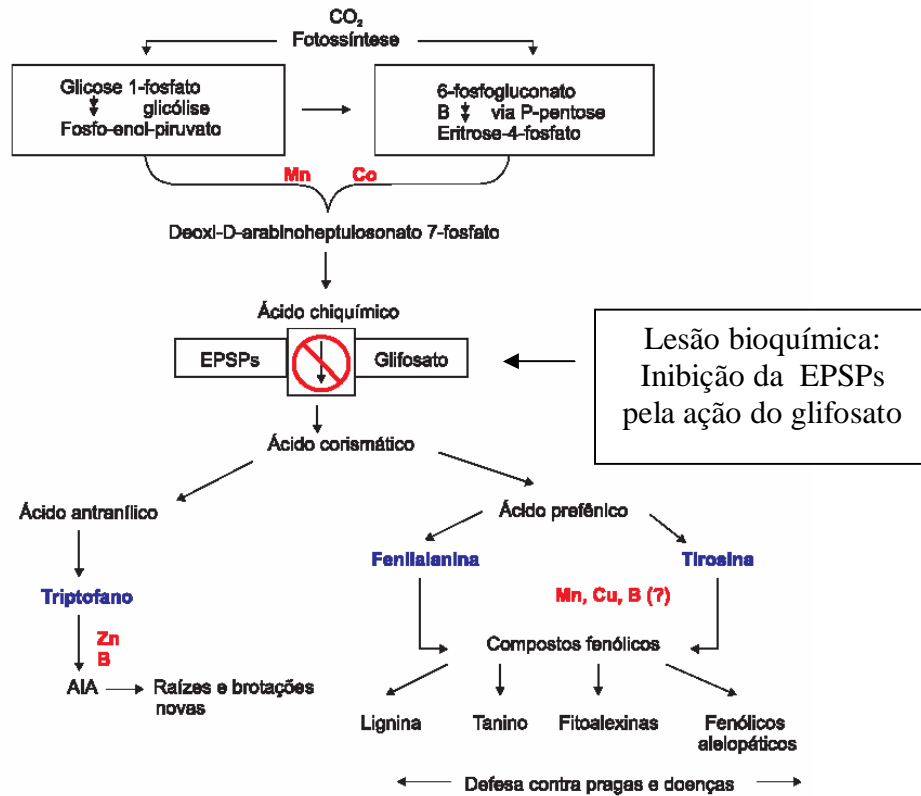


Figura 2. Esquema que ilustra a lesão bioquímica promovida pela inibição da conversão de ácido chiquímico em ácido corísmático pela ação do glifosato (YAMADA e CASTRO, 2007).

No caso de plantas transgênicas resistente ao glifosato (RR), a tolerância ao herbicida foi obtida pela inserção de um gene (*AroA*) oriundo do genoma da *Agrobacterium* sp., estirpe CP4, a qual codifica uma variante da EPSPs (CP4 EPSPs), especialmente tolerante à inibição pelo glifosato (PADGETTE et al., 1995). A construção genética inserida nas plantas RR está esquematizada na Figura 3.



Figura 3. Construção genética presente na soja Roundup Ready: **35S**: Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor. **CTP**: peptídeo de transito para o cloroplasto. **CP4-EPSPS**: gene da 3-enolpiruvil-chiquimato-5-fosfatossintase. **NOS**: terminador da nopalina sintase.

Sob tratamento com esse herbicida, segundo Santos et al. (2007), as plantas com essa característica não são afetadas, em virtude da ação continuada e sistemática da enzima alternativa, insensível ao produto. Já as plantas infestantes da cultura, acabam morrendo pela ação do herbicida, sendo esta a característica agrônômica desejável.

Sem dúvida alguma, trata-se de uma inovação tecnológica de grande valor agrônômico, o que de certa forma justifica o anseio e desejo da utilização por parte de muitos agricultores. No

entanto, essa empolgação e esse furor para adoção da tecnologia, promovem uma aceitação precoce, deixando de lado muitas questões científicas que deveriam ser avaliadas com maior cautela e com um tempo maior de estudos, face às incertezas que ainda pairam no meio científico, mesmo após 11 anos de cultivo, caso da soja RR no Brasil. Isso sem levar em consideração muitos aspectos políticos e ideológicos que também envolvem essa questão e que igualmente deveriam ser avaliados de forma mais efetiva.

Logo, o texto propõe focar sua discussão em uma vertente desta problemática, a influência desta tecnologia em insetos, de um ponto de vista agrônomo ou mesmo ecológico, realizando, dessa forma, um apanhado do estado atual da arte e com isso gerar subsídios para posicionamentos mais concretos sobre essa questão.

Portanto, em questões normativas sobre organismos geneticamente modificados (OGM), a instituição brasileira responsável por legislar sobre esse assunto é a CTNBio, e em seu parecer técnico sobre a liberação da soja RR no Brasil, de 1998, informa sobre o que acredita ser a influência dessa tecnologia em insetos associados a essa cultura:

“Não há indicação de que o uso de cultivares derivados da linhagem GTS 40-3-2(soja RR) levará a alterações significativas no perfil e na dinâmica de populações de insetos associados à cultura da soja convencional”. Sendo este o posicionamento oficial do governo brasileiro, sobre o assunto.

Já, uma das fabricantes e fornecedoras de sementes de plantas RR, a multinacional Monsanto®, em sua notificação de 2009, para Ensaio de Plantas Superiores Geneticamente Modificadas, em Portugal, neste caso o milho RR, se posiciona de uma maneira que se pode considerar bem mais cautelosa sobre o assunto:

“Através de transferência trófica e processos de decomposição, outros organismos como predadores das pragas do milho poderão ser expostos a alguns níveis muito baixos destas proteínas (proteínas exógenas). A expressão das novas proteínas de NK603 (Milho RR) expressas é assim uma característica de PSGM (Plantas Superiores Geneticamente Modificadas) que pode causar efeitos adversos em organismos não alvo”. Dentre esses organismos “não alvo”, encontram-se os insetos.

Sendo assim, fica evidenciado que a multinacional afirma que efeitos adversos podem ocorrer em organismos não alvo, em função das novas proteínas expressas na planta, pela inserção do gene de resistência ao glifosato. No entanto, não menciona uma possível influência do herbicida sobre esses organismos, seja por entrarem em contato direto com o produto, no momento da aplicação, ou por utilizarem as plantas RR tratadas com o herbicida como alimento. Também não é mencionado possível efeito indireto a esses organismos, originário, por exemplo, pela modificação do agroecossistema, ocasionado pelo declínio da população de plantas infestantes.

Portanto, para a correto entendimento da questão, a busca pelo conhecimento tem que esbarrar numa visão que procure elucidar todos os aspectos científicos envolvidos na tecnologia avaliada, sejam eles químicos, fisiológicos ou ecológicos, e associá-los aos organismos, como os insetos.

Nesse sentido algumas pesquisas foram conduzidas para se tentar entender melhor o papel da tecnologia RR, em uma possível influência em insetos. Essas investigações buscaram explicar

questões relacionadas com a dinâmica de ocorrência dos insetos em plantações RR, sejam benéficos ou tidos como praga, bem como a ação do herbicida sobre essa questão. Também, em menor número, é observado pesquisas onde se avaliou a influência de plantas RR, e do herbicida, na biologia de alguns insetos.

Além dessas linhas de pesquisa, vale destacar também as investigações que procuram avaliar a nutrição desse grupo de plantas, buscando com isso elucidar a influência desse complexo tecnológico em parâmetros nutricionais destes vegetais. No que concerne a insetos, essa linha de pesquisa tem relevância científica, pois, algo que já se sabe, é que os aspectos nutricionais dos vegetais, podem influenciar a ocorrência e o desenvolvimento dos insetos fitófagos que deles se alimentam (PANIZZI e PARRA, 1991).

Dentro deste contexto, sabe-se que plantas e animais evoluíram juntos durante centenas de milhões de anos, e que existem entre eles as mais intrincadas interações e interdependências, e grande parte dessa evolução tem sido ao nível químico. Assim, ao contrario das características estruturais evidentes de uma flor polinizada por insetos ou uma planta carnívora, as adaptações de uma planta aos seus predadores geralmente não são visíveis (EDWARDS e WRATTEN, 1981).

A inserção de novos genes em plantas por engenharia genética, pode ocasionar interferências nesse processo evolutivo, uma vez que não se podem prever exatamente todas as conseqüências bioquímicas e fisiológicas da expressão deste na planta. Esse fato, conseqüentemente, pode suscitar hipóteses de que influências na relação entre inseto e a planta, estabelecida pelo processo evolutivo durante milhões de anos, possam ser instauradas, sendo, portanto alvo de estudos.

Deste modo, a busca pelo entendimento de alguns processos que podem ser suscitados pela modificação genética em plantas RR, e neste caso pelo uso do herbicida também, o estudo da nutrição deste grupo de plantas revelou algumas particularidades que associadas ao conhecimento já solidificado sobre as relações entre insetos e plantas, principalmente em questões tróficas, podem gerar hipóteses factuais.

Assim sendo, dentro desta conjectura, já se sabe que a modificação genética da soja para conferir tolerância ao glifosato, bem como a ação do herbicida, tem efeito marcante no balanço nutricional da cultura, com destaque para N, P, Ca, Mg e Mn (FRANCHINI, et al., 2008).

Nessa mesma linha de investigação, Santos et al. (2007) observaram alterações significativas no teor de nutrientes de folhas de soja transgênica tratada com glifosato, entre eles N, Ca, e Mg, (Tabela 1) e intoxicação nas plantas pelo uso de diferentes formulações de herbicida a base de glifosato. Para o N e Ca a quantidade destes nutrientes foi significativamente inferior à observada na soja RR, testemunha, que não foi tratada com os pesticidas, a diferença registrada para o teor de N, foi constatada apenas nas plantas tratadas com as formulações Roundup Ready® e Zapp qi®, e para o teor do nutriente Ca, a redução notada ocorreu em todas as plantas tratadas com os pesticidas, independente da formulação. Já para Mg a quantidade deste nutriente foi significativamente superior à testemunha em todas as avaliações.

Tabela 1. Valores observados para teor de macronutrientes presentes nas folhas de soja resistente ao glifosato, coletadas por ocasião do florescimento após aplicação desse herbicida em diferentes formulações, 25 dias após o plantio (SANTOS et al. 2007).

Tratamento	N	P	K	S	Ca	Mg
	(g Kg ⁻¹)					
Testemunha	36,41 a	1,20	16,32	10,90	11,44 a	2,81 b
Roundup Ready	27,95 b	0,93	16,16	12,84	8,81 c	4,16 a
Raundup Transorb	30,89 ab	1,01	18,52	11,97	10,12 b	4,43 a
Zapp Qi	29,16 b	1,02	18,84	12,70	7,94 c	3,84 a

Portanto, buscando associação ao que foi exposto sobre os aspectos nutricionais de plantas RR, sabe-se que o teor nutricional dos vegetais tem efeito sob o desenvolvimento e ocorrência dos insetos (PANIZZI e PARRA, 1991). Sendo assim, cabe refletir de que forma os aspectos nutricionais das plantas poderiam afetar os insetos. Nesse contexto, Rodriguez (1960) mencionou que diversos insetos, entre eles larvas de lepidópteros, se beneficiam da presença em excesso de N, por exemplo. Também foi mencionado por Panizzi e Parra (1991), que certas espécies de insetos apresentam taxas de crescimento, consumo, eficiência de utilização do alimento, superiores em plantas com maior teor de N. Ainda, foi sugerido por Auerbach e Strong (1981) que os baixos teores de N encontrados em certas plantas, pode ser uma estratégia de defesa contra herbívoros, e que a aplicação de fertilizantes, com conseqüente troca de teores nutrientes, poderia quebrar essa possível defesa. Ainda, sobre a influência do N na ocorrência de insetos, Ventura et al. (2007) verificaram aumento do número de insetos, concomitantemente ao aumento de doses de fertilizantes a base de N, na cultura da berinjela.

Também é importante dizer que influência de plantas com teores diferenciados de N, em insetos, é algo que ainda não está totalmente elucidado, e que resultados de pesquisas que avaliam essa questão apresentam dados contraditórios. Sobre isso, Sampaio et al. (2007) observaram que o teor de N em vegetais pode correlacionar-se positiva ou negativamente com a ação de determinadas pragas. Avaliando as injúrias de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) na cultura do milho, Sampaio et al. (2007) registraram maior dano em condições de excesso e deficiência de N no solo.

Estudos demonstraram que o balanço nutricional da soja transgênica RR é modificado, inclusive para o nutriente N, pela aplicação de diferentes formulações de herbicidas a base glifosato, bem como pela modificação genética (SANTOS et al., 2007; FRANCHINI, et al., 2008). Nesse sentido, é pertinente procurar estabelecer linhas de pesquisas onde seja avaliada a influência desse aspecto sobre o manejo integrado de pragas, bem como na ação em interações ecológicas entre inseto e planta, e seu possível impacto no ambiente. Algo que até o momento não foi estudado de forma adequada.

Dentro do contexto da avaliação da tecnologia RR sobre insetos em campo, Pereira et al. (2007) analisaram a ação do glifosato em cultura de soja RR sobre a densidade de artrópodes de solo. Concluíram que a aplicação de glifosato apresentou influência sobre a abundância total de artrópodes desse grupo, sendo que as populações do predador da família Galumnidae e do detritívoro da família Entomobryidae apresentaram-se mais preditivas da ação deste herbicida sobre o agroecossistema.

Relataram ainda que a menor abundância total de artrópodes observada, pode estar associada com um possível efeito tóxico deste herbicida sobre a comunidade de insetos. Ainda na

tentativa de explicar esses registros, os autores alertam também para o fato de que pesquisas onde é avaliado o impacto do glifosato em artrópodes, os resultados são, geralmente, mais associados com as implicações indiretas provocadas pela modificação do agroecossistema, que com o efeito direto de sua composição química. Dentre esses efeitos indiretos, a diminuição da diversidade de plantas daninhas, pode afetar a redução de artrópodes, através da redução na disponibilidade de alimento, locais para oviposição e áreas para refúgio (MONNING e BRADLEY, 2007).

Na investigação realizada por Brondani et al. (2008), onde estudaram a ocorrência de insetos na parte área da soja RR e da convencional, relatam que a utilização da cultivar transgênica e da aplicação do herbicida glifosato, alterou a ocorrência de algumas espécies de insetos-praga e inimigos naturais. Levantam, entre outras hipóteses, que essas respostas populacionais, como as observadas neste trabalho, podem estar correlacionadas com o efeito direto do herbicida, efeito esse que até o momento não foi comprovado.

Sobre esse assunto, Woiwod e Schuler (2007) apresentaram uma discussão sobre a influência de culturas resistente a herbicidas em insetos e seu impacto na biodiversidade. Relatam, que no Reino Unido, no final do ano de 1998 foram feitas avaliações para aprovação de três cultivos com essa característica, milho, colza e beterraba. As pesquisas tinham o objetivo de avaliar a relação do cultivo desses vegetais com o possível declínio da biodiversidade agrícola. Segundo esses autores, esta experiência tornou-se uma das maiores avaliações de risco agroecológicas já realizada e forneceu informações importantes bem além do seu propósito original. Esse estudo propiciou que a colza e a beterraba RR tivesse seu cultivo negado em função das atuais diretrizes estabelecidas comercialmente.

Dentre algumas das principais conclusões, Woiwod e Schuler (2007) relatam que o declínio das plantas daninhas e conseqüentemente de seus bancos de sementes, pode ocasionar um possível efeito deletério em longo prazo, na biodiversidade das terras agrícolas. Quanto aos insetos, em geral, foi registrado um número maior de Collembola, que segundo especulações, seria pelo aumento de vegetação morta, propiciada pelo uso do herbicida.

Já para borboletas e abelhas, foi registrado um declínio significativo nas populações desses insetos, no interior e nas margens dos campos, com exceção para a cultura do milho, que forneceu registros semelhantes ao do cultivo não transgênico. Esse declínio foi atribuído ao fato de ocorrer uma diminuição da oferta de néctar, pela ausência de plantas daninhas, principalmente da família Asteracea.

Adicionalmente, Woiwod e Schuler (2007) discutem que esses registros podem se tornar impactantes do ponto de vista ambiental, uma vez que fosse constatada uma carência real de néctar nas terras agrícolas. Contudo, dentre desse contexto, descrevem que uma prática para mitigar essa questão seria o cultivo de campos com flores permanente ao redor das plantações desse grupo de OGMs, como alternativa a conservação das populações desses artrópodes.

Essa prática pode ser uma abordagem necessária em países europeus, onde a biodiversidade é menor em comparação a países tropicais, sendo essa preocupação necessária, pois a oferta de alimento a esses insetos pode vir de áreas agrícolas. No Brasil, essa preocupação, no caso desta tecnologia, pode ser considerada menos importante, uma vez que a grande diversidade de habitats e plantas, podem ser suficientes como alternativa às áreas agrícolas, oferecendo condições, assim, para a conservação desse grupo de artrópodes.

Cabe também evidenciar que, nos relatos feitos por Pereira et al. (2007), Brondani et al. (2008) e Woiwod e Schuler (2007), as diferenças na ocorrência dos insetos por eles registradas, em cultivos de plantas RR, foram atribuídas a distintas suposições, no entanto não mencionaram a hipótese do balanço nutricional destas plantas ter atuado direta, indiretamente ou em associação

a essas suposições. O que não deveria ser rejeitado como possibilidade, dada a relevância desse aspecto sobre a ocorrência e desenvolvimento de insetos.

Estudos mais específicos sobre a influência do glifosato sobre predadores também foram conduzidos, e são de extrema importância para o entendimento da ação desse complexo tecnológico em insetos considerados benéficos. Dentre esses trabalhos, Giolo et al. (2005) revelaram informações importantes sobre essa questão. Sabe-se que os herbicidas a base de glifosato são formulados a base de diferentes sais, como sal potássico, sal de isopropilamina e sal de amônio.

Avaliando a seletividade de cinco formulações de herbicidas a base de glifosato em laboratório sobre capacidade de parasitismo das fêmeas de *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), os autores registraram que a seletividade das formulações foi dependente do tipo de sal. Aquelas à base de sal potássico e de sal de amônio foram levemente nocivas aos adultos do parasitóide. Sendo aquela à base de sal de isopropilamina foi moderadamente nociva aos adultos de *T. pretiosum*. Ainda concluem que esses resultados propiciam indícios de que o tipo de sal presente nas formulações à base de glifosato, constitui em fator preponderante para a toxicidade à forma adulta desse parasitóide.

Na mesma linha de avaliação, Manzoni et al. (2006) estudaram a ação de doze agrotóxicos na seletividade de *T. pretiosum*, acaricidas, fungicidas e herbicidas. Concluíram que três acaricidas, cinco fungicidas, um inseticida são inócuos ao parasitóide, um herbicida a base de glifosato (Polaris[®]) levemente nocivo e outros dois herbicidas, um a base de glufosinato sal de amônia (Finale[®]) e outro a base de glifosato (Roundup Original[®]) são moderadamente nocivos ao *T. pretiosum*. Neste caso, o tipo de sal das formulações Polaris[®] e Roundup Original[®] é o mesmo, sal de isopropilamina, mas isso não os associou a mesma categoria de nocividade, conforme a redução do parasitismo, como encontrado por Giolo et al. (2005).

Nestes dois casos os parasitóides foram expostos diretamente em resíduos do herbicida, e as avaliações foram feitas sob estas condições.

Já Lacerda (2008), avaliando toxicidade de produtos fitossanitários, entre eles o glifosato, a *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), usou outra abordagem para as avaliações. O autor obteve, em uma das avaliações, pupas de *A. gemmatalis* provindas de lagartas alimentadas com folhas de soja RR tratadas com o glifosato em laboratório, e nesta condição avaliou o parasitismo destas por *P. elaeisis*. Dentre os resultados, pupas de *A. gemmatalis* de lagartas alimentadas com folhas de soja RR tratadas com o herbicida glifosato não afetaram a percentagem de parasitismo de *P. elaeisis* com valor igual ou superior a 81,25% em todos os tratamentos. No entanto, a emergência desse parasitóide foi menor com lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com uma cultivar RR tratada com glifosato (18,75%) que na testemunha sem herbicida foi 75,00%.

As folhas de soja RR utilizadas por Lacerda (2008), foram obtidas pela imersão das mesmas na calda do produto em laboratório e posteriormente ofertadas às lagartas, para obtenção das pupas. Usando essa abordagem, as questões aqui levantadas sobre a influência do glifosato nos aspectos nutricionais dessas plantas, são descartados, pois as folhas foram tratadas após serem coletadas nos vegetais. Portanto, uma avaliação mais preditiva desta questão poderia ser feita utilizando folhas de soja provindas de tratamento com o herbicida em simulação das condições de campo. Dessa forma, pode-se levar em consideração a ação deste produto sobre a fisiologia da planta viva, ação essa evidenciada em diversas pesquisas.

A discussão aborda que o tipo de planta afeta a qualidade do hospedeiro e de que o produto transgêneo pode afetar o organismo, diretamente, pela ingestão e, indiretamente, por metabólitos secundários da digestão desses compostos (ANDOW e HILBECK, 2004). Logo,

essas observações reforçam ainda mais a idéia de que as alterações desencadeadas pela aplicação do glifosato em soja RR, neste texto apontadas anteriormente, possam ser consideradas em avaliações desse tipo, como no caso da pesquisa conduzida por Lacerda (2008), na obtenção das pupas de *A. gemmatalis* que foram submetidas ao parasitismo por *P. elaeisis*.

Ainda, sobre a influência dessa tecnologia sobre a biologia de insetos, Morjan e Pedigo (2002), em um estudo vinculado a multinacional Monsanto, concluíram que variedades de soja RR, tratada e não tratada com glifosato, e variedades de soja convencional isogênicas, não afetam significativamente aspectos biológicos de *Hyponomeuta scabra* (Lepidoptera: Noctuidae), uma desfolhadora da soja, comum nos Estados Unidos. Concluíram ainda, que o tipo de alimento não influencia a duração da fase larval, pupal, sobrevivência e a sexagem dos indivíduos, bem como o efeito do estresse da planta, causado pela aplicação do glifosato, não leva a alterações na adequação do vegetal como hospedeiro para *H. scabra*.

Em outro estudo conduzido em laboratório, Jackson e Pitre (2004a) avaliaram a influência da soja RR e do herbicida Roundup Ultra, cuja formulação contém sal de amônio, sobre *Geocoris punctipes*, concluíram não haver interação desta tecnologia sobre o desenvolvimento de nenhuma das fases do inseto (ovo, ninfa e adulto). No entanto, em outro estudo, Jackson e Pitre (2004b) registraram diminuição deste inseto em campos de soja RR durante três e quatro semanas após segunda aplicação do herbicida nestas áreas. Sugeriram ainda que essa diminuição foi ocasionada pelo efeito indireto ocasionado declínio da população de plantas daninhas. Como conclusão, também relatam que populações de outros insetos, *Cerotoma trifurcata* (Coleoptera), *Spissistilus festinus* (Hemiptera), *Plathypena scabra* (Lepidoptera) e *A. gemmatalis* (Lepidoptera), não tiveram sua ocorrência afetada pela aplicação do herbicida ou mesmo pela transgênia, quando comparada com a testemunha, soja convencional.

Embora, em campo, Jackson e Pitre (2004b) não tenham encontrado interferências na ocorrência destes insetos, em relação à soja convencional, isso, não necessariamente descarta a possibilidade que influências nos aspectos biológicos desses organismos, possam ser instauradas pela utilização dessa tecnologia, ou mesmo na interação da relação inseto x planta. No caso de *A. gemmatalis*, Lacerda (2008) registrou um peso médio de pupas provindas de lagartas alimentadas com Soja RR, tratada e não tratada com glifosato, inferior ao observado em pupas provindas de lagartas alimentadas com folhas da testemunha.

A influência da tecnologia RR em insetos, ainda é elemento de dúvidas e discussões, embora já exista certo consenso sobre a interferência indireta, na ocorrência das populações de insetos, pela diminuição das populações de plantas daninhas, muito se tem a pesquisar. Essas pesquisas devem focar na elucidação das possíveis alterações da relação inseto x planta, bem como no estudo da biologia desses organismos, uma vez que já se conhece alteração do balanço nutricional dessas plantas, fator esse, intrinsecamente associado ao desenvolvimento e ocorrência dos insetos fitófagos.

Frente a essa situação, recomenda-se a realização de experimentos em cada região do país, em anos sucessivos, em condições de campo e laboratório, de modo a obter-se as reais respostas à aplicação de glifosato na soja RR, sobre o desenvolvimento e ocorrência de insetos presentes na fauna brasileira. Essa afirmativa é feita em função de que a maioria dos trabalhos encontrados abordaram a problemática em apenas uma vertente, pela influência indireta da tecnologia, ou em condições de simulação não preditiva da realidade de campo, ou mesmo, por não terem realizado os estudos sob o ponto de vista da nutrição vegetal desse grupo de plantas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Instituto de Florestas, Departamento de Produtos Florestais, Laboratório de Entomologia Florestal no período de agosto à novembro de 2008.

Canteiros de soja transgênica e soja convencional foram cultivados para a obtenção das folhas que serviram de alimento para as lagartas. Dentre os quatros canteiros, três foram de soja transgênica resistente ao herbicida, cujo princípio ativo é o glifosato, da cultivar P98R62 da empresa Pioneer e o canteiro com soja convencional foi formado por sementes da cultivar BRS 232 da EMBRAPA. Características técnicas destas cultivares são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Caracterização técnica dos cultivares de soja utilizados no estudo, conforme dados do fabricante.

Cultivar	Especificações técnicas
P98R62	Fabricante: Pioneer Sementes SA. Transgênia: Presença do gene Roundup Ready®. Resistência a insetos: Não informado pelo fabricante.
BRS 232	Fabricante: Embrapa Soja. Transgênia: Não transgênica. Resistência a insetos: Não informado pelo fabricante.

A aplicação do agrotóxico foi realizada em dois canteiros com plantas transgênicas aos 25 e 45 dias após a emergência das plântulas (Tabela 3).

Tabela 3. Formulações do herbicida, época de aplicação e doses utilizadas nos canteiros de soja transgênica. Seropédica, RJ, 2008.

Produto	Época de aplicação DAE- Dia após a emergência	Dose g/ha
Roundup Ready®	25 e 45	1200 e 1200
Roundup WG®	25 e 45	1200 e 1200

As formulações dos herbicidas aplicadas foram: Roundup Ready® e Roundup WG®, cuja especificações técnicas estão expressas na Tabela 4, conforme recomendação do fabricante. Estas duas formulações diferem pelo teor de glifosato, e principalmente pelo tipo de sal, sendo a primeira contendo Sal de Isopropilamina e o segundo Sal de Amônio. Em estudo realizado por Giolo et al. (2005), foram encontrados indícios de que o tipo de sal presente nas formulações a base de glifosato, se constitui em fator preponderante para toxicidade de uma das fases de um parasitóide. Não se sabe se em Lepidoptera isso ocorre também.

Tabela 4. Caracterização técnica dos produtos fitossanitários utilizados no estudo, conforme dados do fabricante.

Formulação	Especificações técnicas
Roundup Ready®	Ingrediente ativo (i.a): glifosato composição Química: Sal de Isopropilamina de N-(fosfonometil)glicina-glifosato) Grupo químico: Glicina substituída Equivalente do ácido ativo: 480 g/L Formulação: Concentrado solúvel Tipo de aplicação: Pós-emergente Finalidade do uso: Controle vegetação Classe toxicológica: II – Altamente tóxico Periculosidade ambiental: III – Perigoso ao meio ambiente
Roundup WG®	Ingrediente ativo (i.a): glifosato composição Química: Sal de Amônio de N-(fosfonometil)glicina-glifosato) Grupo químico: Glicina substituída Equivalente do ácido ativo: 720 g/kg Formulação: Granulado dispersível Tipo de aplicação: Pós-emergente Finalidade do uso: Controle vegetação Classe toxicológica: IV – Pouco tóxico Periculosidade ambiental: III – Perigoso ao meio ambiente

Os produtos foram diluídos nas doses descritas acima e aplicados com bomba à pressão marca Guarany (Figura 4). As condições ambientais, por ocasião da aplicação dos herbicidas são apresentados na Tabela 5.



Figura 4. Aplicação do herbicida em canteiro de soja transgênica. Seropédica, RJ, 2008.

Tabela 5. Condições ambientais verificadas por ocasião das aplicações dos herbicidas, aos 25 e 45 dias após a emergência (DAE) das plântulas de soja. Seropédica, RJ, 2008.

Fator Ambiental	25 DAE	45 DAE
Temperatura (°C)	25,6	25
Umidade (%)	63	65
Vento (m/s)	1,9	2,0
Radiação (kj/m ²)	1030	1035
Umidade do solo	úmido	úmido
1º chuva após a aplicação	0 dias	0 dias
Hora do início da aplicação	17:00	17:00
Hora do término da aplicação	17:20	17:20

Os ovos de *U. acawoios* para montagem do experimento foram providos de uma criação em borboletário, ao ar livre (Figura 5). Foram coletados 150 ovos oriundos de uma única postura para montagem de cinco tratamentos (Tabela 6) constituídos pela individualização, em placa de Petri, de 25 lagartas para cada tratamento.



Figura 5. Borboletários utilizados para criação de *Urbanus acawoios* em cativeiro. Seropédica, RJ, 2008.

Tabela 6. Constituição e nomenclatura dos tratamentos utilizados no experimento. Seropédica, RJ, 2008.

Tratamento	Nomenclatura
Soja geneticamente modificada tratada com herbicida na formulação Roundup Ready®	GM _{RR+} Roundup Ready®
Soja geneticamente modificada tratada com herbicida na formulação Roundup WG®	GM _{RR+} Roundup WG®
Soja geneticamente modificada sem aplicação de herbicida	GM _{RR}
soja convencional sem aplicação de qualquer produto	soja convencional
Folha de <i>Clitoria fairchildiana</i> (hospedeiro natural)	sombreiro

Lagartas neonatas foram individualizadas em placas de Petri (Figura 6), e o alimento era renovado diariamente, nesta oportunidade observações foram feitas no sentido de registrar os parâmetros biológicos do inseto, pela anotação em planilha, das datas de ocorrência dos mesmos.



Figura 6. Lagartas individualizadas em placas de Petri e separadas por tratamento. Seropédica, RJ, 2008.

Os parâmetros observados foram: duração dos instares larvais, duração do período de pré-pupa, pupa e longevidade do adulto. O peso das larvas foi obtido a partir do segundo ínstar, as de primeiro ínstar não tiveram seu peso registrado para que não fosse provocado estresse nas mesmas, pois nesta fase estas são sensíveis à manipulação. O peso das pré-pupas e pupas

também foi obtido utilizando balança de precisão de quatro casas decimais, assim como para o peso das larvas.

A longevidade do adulto foi obtida utilizando-se gaiolas entomológicas confeccionadas com material reciclável (Figura 7). As pupas foram acondicionadas no interior destas e as datas da emergência e morte dos adultos foram registradas em planilha, nesta fase foram alimentados com uma solução de água e mel a 10%, que foi ofertada por um algodão pendurado dentro da gaiola e substituído diariamente.



Figura 7. Gaiolas entomológicas confeccionadas com material reciclável. Seropédica, RJ, 2008.

De posse destes dados, calculou-se o período larval, pela soma da duração de todos os instares larvais, e o ciclo de vida, pela soma do período de eclosão à morte do adulto.

Os dados foram processados no programa estatístico BioEstat versão 4.0. A normalidade dos dados foi conferida pelo teste de Lillifors, e quando normais, aplicou-se o teste de Tukey a 5% de significância, do contrário utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis também a 5% de significância para análise das variâncias, e os postos médios, neste caso, comparados pelo teste de Student-Newman-Keuls. Valores absolutos, como os utilizados nos cálculos percentuais, foram comparados pelo teste de Qui-quadrado a 5% de significância.

Para ajudar na interpretação dos dados, adotou-se o Índice de Desenvolvimento (ID), sugerido por Lara (1991), que relaciona a sobrevivência de uma fase com a duração da mesma. Na avaliação aqui realizada, será relacionada à sobrevivência larval percentual com a duração, em dias, dessa mesma fase, utilizando-se a fórmula a seguir:

$$\text{ID} = \frac{\text{Sobrevivência larval (\%)}}{\text{Período larval (dias)}} \times 100$$

Segundo Lara (1991), essa abordagem ajuda a interpretar variáveis que analisadas isoladamente não fornecem dados discriminatórios entre as mesmas, já quando relacionadas através do índice, pode-se perfeitamente discriminá-las, e ajudar na interpretação dos resultados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A duração média, em dias, do primeiro instar das lagartas de *U. acawoios* que foram alimentadas com folhas de soja convencional e transgênica tratada e não tratada com glifosato, apresentou-se igual estatisticamente quando comparada entre si (Kruskal-Wallis 5%); Estas médias diferiram apenas quando foi feita a comparação com o valor médio obtido das lagartas que foram mantidas com folhas de sombreiro, sendo este valor inferior aos demais (Tabela 7). Exatamente o mesmo padrão de diferenciação estatística foi observado na duração média, em dias, do terceiro e quinto instar (Tabela 7). Pinto, (2002) registrou valores semelhantes ao observado neste trabalho, na duração do primeiro e terceiro instar de *U. acawoios*, em soja convencional, 2,88; 2,10 dias, respectivamente. Nesta mesma dieta, o valor observado no quinto instar, por Pinto (2001) foi 5,89 dias, superior ao constatado neste trabalho, para o mesmo período, em soja convencional e transgênica (Tabela 7).

Tabela 7. Duração média (\pm DP), em dias, dos cinco ínstar larvais de *Urbanus acawoios* alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro. Seropédica, RJ, 2008.

Tratamento	Ínstar				
	1°	2°	3°	4°	5°
GM _{RR} +Roundup Ready®	2,43±0,50 a	1,95±0,36 ab	2,04±0,21 a	2,64±0,60 b	4,23±0,59 a
GM _{RR} +Roundup WG®	2,54±0,50 a	1,81±0,58 b	2,00±0,43 a	3,40±0,82 a	4,37±0,61 a
GM _{RR}	2,45±0,67 a	2,55±0,99 a	1,95±0,39 a	3,05±0,62 ab	4,23±0,56 a
soja convencional	2,45±0,67 a	1,86±0,46 b	2,00±0,43 a	2,86±0,56 ab	3,95±0,72 a
sombreiro	2,00±0,00 b	1,08±0,27 c	1,45±0,77 b	2,08±0,58 c	3,39±0,72 b

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste Kruskal-Wallis (P<0,05).

No segundo instar foi registrado para as lagartas que foram alimentadas com folhas de GM_{RR}+Roundup Ready®, GM_{RR}+Roundup WG®, GM_{RR}, soja convencional e sombreiro, uma duração média, em dias, de: 1,95; 1,81; 2,55; 1,86 e 1,08, respectivamente. Nesta fase foram observadas diferenças estatísticas nas comparações: GM_{RR} x soja convencional e GM_{RR} x GM_{RR}+Roundup WG®. Também foi registrado que todas as comparações realizadas com o valor médio obtido nas avaliações feitas com as lagartas alimentadas com folhas de sombreiro, apresentaram-se diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância (Tabela 7).

As lagartas que foram alimentadas com folhas de GM_{RR}+Roundup WG® no quarto instar, apresentaram uma duração média de 3,40 dias, sendo este registro superior aos demais e diferente estatisticamente quando comparado com o valor médio observado para as lagartas que foram alimentadas com folhas de GM_{RR}+Roundup Ready®, 2,64 dias. Como registrado nos outros ínstar, a duração foi superior quando comparada com a média obtida das lagartas que foram alimentadas com folhas de sombreiro (Tabela 7).

Silva (1995) registrou valores médios da duração do segundo e quarto ínstar larvais de *U. acawoios*, alimentado com folhas de soja convencional, em temperatura ambiente e a 25°C,

obtendo valores de 3,0 e 5,0 dias; 4,0 e 5,50 dias, respectivamente. Registros esses, todos superiores aos feitos neste trabalho, em soja de qualquer genótipo e tratamento químico (Tabela 7). Já os dados obtidos por Pinto (2002), se aproximam dos registros realizados neste experimento, sendo que os valores da duração média, para este mesmo período, também em soja convencional, foram: 1,96; 3,10 dias, respectivamente.

A duração média, em dias, do período de pré-pupa de *U. acawoios* foi igual para todos os insetos independente da dieta recebida, sendo registrado um dia (Tabela 8). Concordando com Silva (1995) que observou um período de pré-pupa de um dia, para lagartas *U. acawoios* alimentadas com folhas de soja convencional, em temperatura ambiente. O mesmo autor, constatou que a 25C°, na mesma dieta, a duração média desta fase, foi para 1,57 dias.

Para o período pupal, também foi observado que não houve diferença significativa na duração média desta fase, entre os tratamentos, quando aplicado o teste de Kruskal-Wallis 5% (Tabela 8). Estes valores são inferiores aos observados por Pinto (2002) e Silva (1995) que registraram 11,07; 16,80 dias, respectivamente, ambas avaliações feitas em lagartas que foram submetidas à alimentação a base de folhas de soja convencional, em diferentes cultivares.

Tabela 8. Duração média (\pm DP), em dias, dos períodos de pré-pupa, larval e pupal, longevidade do adulto e ciclo de vida de *Urbanus acawoios*, alimentados com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro. Seropédica, RJ, 2008.

Tratamento	Pré-pupa	Fase larval	Período pupal	Longevidade do adulto	Ciclo de vida
GM _{RR} +Roundup Ready®	1,00 \pm 0,00	14,00 \pm 1,56 a	9,18 \pm 0,60 a	6,54 \pm 2,01 a	30,00 \pm 2,32 a
GM _{RR} +Roundup WG®	1,00 \pm 0,00	15,06 \pm 1,43 a	9,42 \pm 0,64 a	6,28 \pm 1,85 a	30,78 \pm 2,19 a
GM _{RR}	1,00 \pm 0,00	14,94 \pm 1,29 a	9,71 \pm 0,99 a	6,28 \pm 1,81 a	30,57 \pm 2,13 a
soja convencional	1,00 \pm 0,00	14,13 \pm 1,35 a	9,31 \pm 0,63 a	6,04 \pm 2,19 a	29,45 \pm 2,95 a
sombreiro	1,00 \pm 0,00	10,86 \pm 1,55 b	9,36 \pm 0,52 a	5,04 \pm 1,81 a	25,27 \pm 2,05 b

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste Kruskal-Wallis (P<0,05).

Na fase larval foi registrado para as lagartas que foram alimentadas com folhas GM_{RR}+Roundup Ready®, GM_{RR}+Roundup WG®, GM_{RR} e soja convencional uma duração média, em dias, de 14; 15,06; 14,94 e 14,13, respectivamente. Esses valores quando comparados pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância, apresentaram-se iguais; Já, quando comparados com a duração média da fase larval, observada nas lagartas alimentadas com folhas de sombreiro, 10,86 dias, a duração foi significativamente superior (Tabela 8). Esses valores são semelhantes ao obtido por Pinto (2002) que registrou uma fase larval média de 16 dias, em lagartas de *U. acawoios* alimentadas com folhas de soja convencional. Já Silva (1995), na mesma dieta e fase, registrou uma duração média de 20 dias, à temperatura ambiente, e 24,21 dias, à 25 C°, ambas superiores às observadas neste trabalho.

O mesmo ocorreu com o ciclo de vida de *U. acawoios*, que para as lagartas mantidas com folhas de GM_{RR}+Roundup Ready®, GM_{RR}+Roundup WG®, GM_{RR} e soja convencional foi registrado uma duração média, em dias, de 30,00; 30,78; 30,57 e 29,45, respectivamente, sendo estes valores iguais pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. No entanto, quando comparados com o ciclo de vida médio dos indivíduos, que foram alimentados na fase larval com folhas de sombreiro, 25,27 dias, foram estatisticamente superiores (Tabela 8). Pinto (2002)

observou, em soja, um ciclo de vida médio de *U. acawoios* de 37,78 dias e Silva (1995) avaliando o mesmo parâmetro e alimento, encontrou 45,80 dias, a temperatura ambiente, e 44,84 dias, a temperatura de 25C°. Ambos registros superiores aos observados neste experimento, em todas as avaliações.

O peso médio registrado nas avaliações com as lagartas de *U. acawoios* de segundo instar que foram alimentadas com folhas de sombreiro foi 0,0035g, e para as lagartas que foram alimentadas com GM_{RR}+Roundup Ready®, GM_{RR}+Roundup WG®, GM_{RR} e soja convencional foi: 0,0019; 0,0016; 0,0014 e 0,0019, respectivamente. Todas as comparações entre o grupo que foi alimentado com sombreiro e o alimentado com soja, são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de significância (Tabela 9). Silva (1995) observou que lagartas de *U. acawoios* alimentadas com folhas de soja convencional, atingiram um peso médio de 0,0018 g, semelhante aos valores observados neste trabalho, para este parâmetro em todas as dietas a base de folhas de soja.

Tabela 9. Peso médio (\pm DP), em g, de lagartas, do segundo ao quinto instar larval, de *Urbanus acawoios*, alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro. Seropédica, RJ, 2008.

Tratamento	Ínstar			
	2°	3°	4°	5°
GM _{RR} + Roundup Ready®	0,0019 \pm 0,001 b	0,0071 \pm 0,001 a	0,0290 \pm 0,009 ab	0,3164 \pm 0,068 a
GM _{RR} + Roundup WG®	0,0016 \pm 0,000 b	0,0071 \pm 0,003 a	0,0224 \pm 0,005 b	0,3316 \pm 0,032 a
GM _{RR}	0,0014 \pm 0,000 b	0,0068 \pm 0,003 a	0,0266 \pm 0,008 ab	0,3251 \pm 0,033 a
soja convencional	0,0019 \pm 0,000 b	0,0082 \pm 0,004 a	0,0345 \pm 0,009 a	0,2919 \pm 0,000 a
sombreiro	0,0035 \pm 0,001 a	0,0098 \pm 0,007 a	0,0306 \pm 0,011 a	0,3187 \pm 0,004 a

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (P < 0,05).

No terceiro e quinto instar de *U. acawoios* não ocorreu nenhuma diferença significativa entre as comparações do peso médio das lagartas, nestas fases, nem mesmo quando a comparação foi realizada com o valor médio obtido das lagartas alimentadas com sombreiro (Tabela 9). Contudo, como observado no segundo instar, a duração destas fases em sombreiro, foi significativamente inferior quando comparada com os grupos que continham soja como alimento (Tabela 7), mas neste caso não ocorreu influência no peso.

No quarto instar as lagartas de *U. acawoios*, que foram alimentadas com folhas de GM_{RR}+Roundup WG®, atingiram um peso médio de 0,0224 g, sendo significativamente inferior ao peso médio das lagartas que foram alimentadas com folhas de soja convencional e sombreiro, tendo sido registrado valores médios, em gramas, de 0,0345 e 0,0306, respectivamente (Tabela 9). Neste caso, a duração média deste instar, para o grupo de lagartas que foram alimentadas com folhas de GM_{RR}+Roundup WG®, foi superior aos demais (Tabela 7), fato o qual não indicaria uma maior ingestão de alimento, pois as lagartas desse grupo forneceram registros de menor ganho de peso nesta fase, o que pode indicar uma menor quantidade de alimento consumido. Para esta fase, Silva, (1995) registrou, em soja convencional, um peso médio para as lagartas de *U. acawoios* de 0,0252 g. Neste caso, o valor é inferior ao observado neste trabalho, em soja convencional. Porém é semelhante aos registrados em soja transgênica, tratada quimicamente ou não.

As observações realizadas nas pré-pupas e pupas procedentes de lagartas que receberam folhas de soja convencional como alimento, forneceram os menores registros de ganho de peso, sendo os valores médios de: 0,2667g e 0,2550g, respectivamente (Tabela 10). No entanto, para pré-pupa, esse valor é significativamente inferior quando comparado ao peso médio das pré-pupas providas de lagartas procedentes de alimentação a base de GM_{RR} (0,3029 g) e GM_{RR}+Roundup WG® (0,3020g) (Tabela 10). E na fase de pupa, o peso é inferior quando a comparação é realizada com o valor médio obtido das pupas oriundas de lagartas alimentadas com GM_{RR}+ Roundup WG® (0,2943 g) (Tabela 10). As demais comparações são iguais entre si.

Tabela 10. Peso médio (\pm DP), em g, de pré-pupas e pupas de *Urbanus acawoios*, providas de lagartas alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro. Seropédica, RJ, 2008.

Tratamento	Pré-pupa	Pupa	Redução (%)
GM _{RR} + Roundup Ready®	0,2945 \pm 0,207 ab	0,2824 \pm 0,023 ab	4,11
GM _{RR} + Roundup WG®	0,3020 \pm 0,032 a	0,2943 \pm 0,042 a	2,55
GM _{RR}	0,3029 \pm 0,033 a	0,2890 \pm 0,034 ab	4,59
soja convencional	0,2667 \pm 0,028 b	0,2550 \pm 0,028 b	4,39
sombreiro	0,3216 \pm 0,045 a	0,3017 \pm 0,047 a	6,33

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (P < 0,05).

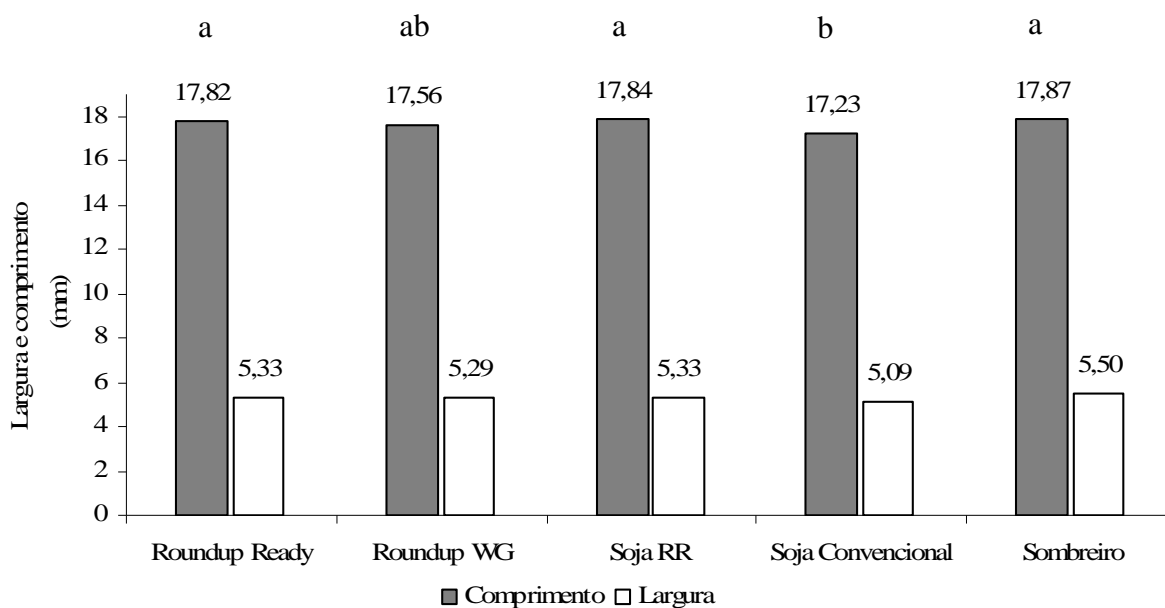
Silva (1995) e Pinto (2002) registraram valores semelhantes, aos observados neste trabalho em soja convencional, para o peso de pré-pupas e pupas de *U. acawoios*, provenientes de lagartas alimentadas com folhas de soja convencional, tendo registrado valores de: (0,2900; 0,242 g) e (0,261; 0,247 g), respectivamente.

A variação de peso entre o período de pré-pupa, onde a lagarta cessa a alimentação, havendo portanto perdas de peso, e o período de pupa, evidenciou que o tipo de alimento influencia nessa variação, sendo, portanto, que em GM_{RR}+Roundup Ready®, GM_{RR}+Roundup WG®, GM_{RR}, soja convencional e sombreiro a variação foi: 4,11%; 2,55%; 4,59; 4,39 e 6,33, respectivamente (Tabela 10). Pinto (2002), analisando o mesmo parâmetro, observou em soja convencional, uma variação de 5,81%. Valor similar aos registrados neste trabalho.

Estes resultados indicam que pode haver influência em alguns parâmetros biológicos de *U. acawoios*, em função da alimentação com soja transgênica. No entanto, Morjan e Pedigo (2002) não encontraram nenhuma influência desse complexo tecnológico (Soja RR + Herbicida), sobre o desenvolvimento de *H. scabra*. No entanto, Lacerda (2008) observou redução no peso de pupas de *A. gemmatalis*, provenientes de lagartas submetidas a uma alimentação a base de folhas de uma cultivar de soja RR tratada com glifosato.

A largura e o comprimento médio, em mm, das pupas provenientes de lagartas alimentadas com folhas de soja convencional foi 5,09 e 17,23 respectivamente, sendo estes valores inferiores a largura e comprimento das pupas originárias de todos os outros tratamentos: sombreiro (5,50; 17,87), Soja RR (5,33; 17,84), Roundup WG (5,29; 17,56) e Roundup Ready (5,33; 17,82) respectivamente (Figura 8). Embora, somente o comprimento seja significativamente menor, pelo teste de Kruskal-Wallis, quando comparado com os valores

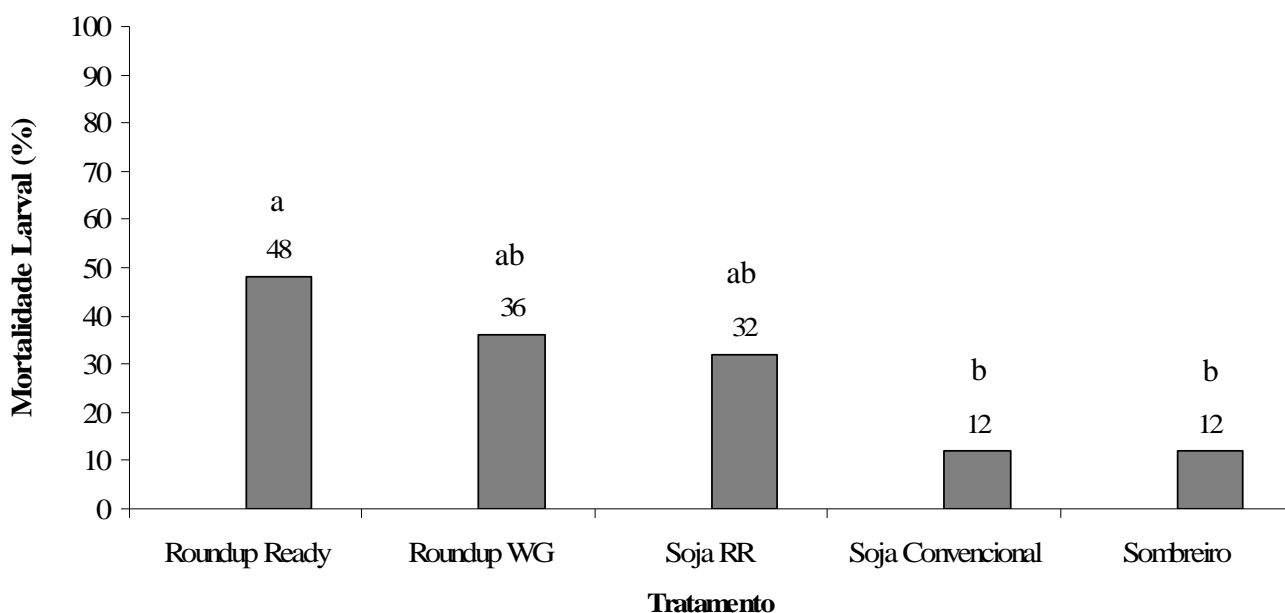
obtidos da mensuração das pupas providas de lagartas submetidas a alimentação a base de folhas de sombreiro, Soja RR e de Roundup Ready (Figura 8).



Médias seguidas de mesma letra, entre barras, não diferem estatisticamente pelo teste Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Figura 8. Comprimento médio e largura média, em mm, de pupas de *U. acawoios* providas de lagartas alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro, Seropédica, RJ, 2008.

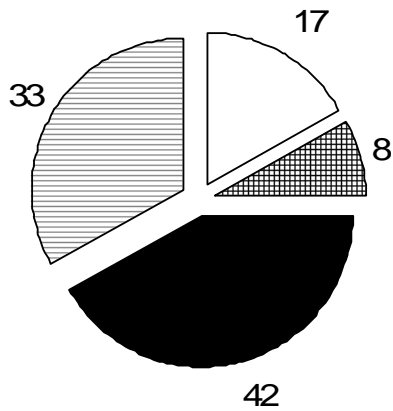
Quanto à mortalidade larval, foi constatado que as lagartas alimentadas com folhas de soja convencional e sombreiro, apresentaram taxas significativamente inferiores, 12 e 12% respectivamente, quando comparadas pelo teste de Qui-quadrado, ao valor observado nas lagartas alimentadas com folhas de Soja RR tratada com Roundup Ready, sendo este 48% (Figura 9). As demais dietas não influenciaram significativamente a mortalidade larval de *U. acawoios*.



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

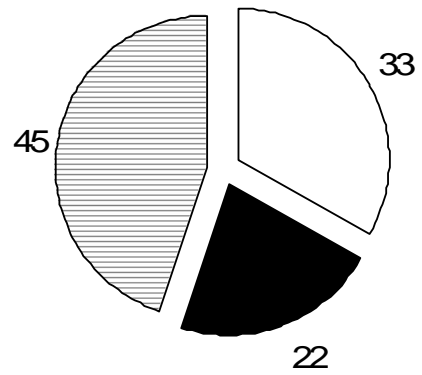
Figura 9. Mortalidade larval percentual de lagartas de *Urbanus acawoios* alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro, Seropédica, RJ, 2008.

A mortalidade larval ocorreu em percentagens diferentes ao longo dos instares (Figuras 10, 11, 12, 13, 14). Constatou-se que para as lagartas que foram alimentadas com folhas de soja transgênica tratada com Roundup Ready, os 48% de mortalidade ocorreram no primeiro, terceiro e quarto instares, e em folhas tratadas com Roundup WG (36% mortalidade), ocorreram no primeiro, quarto e quinto instares. Já em soja transgênica sem tratamento químico (32% mortalidade), esse aspecto foi observado no primeiro, segundo, quarto e quinto instares larvais (Figuras 10, 11 e 12). Nos indivíduos que receberam alimentação a base de folhas de soja convencional, os 12% de mortalidade larval ocorreram totalmente no primeiro instar (Figura 13), e para os que receberam folhas de sombreiro, os 12% de mortalidade concentrou-se no terceiro e quinto instar (Figura 14).



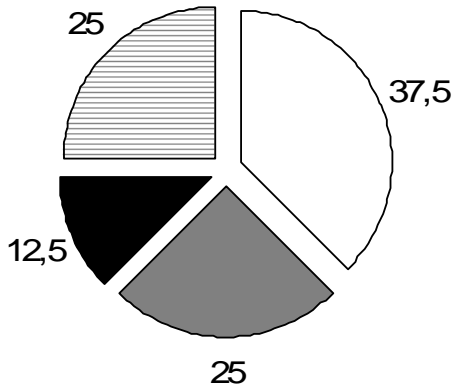
□ 1º ■ 3º ■ 4º ■ 5º

Figura 10. Percentual de mortalidade, por instar, de lagartas alimentadas com folhas soja transgênica tratadas com Roundup Ready. Seropédica, RJ, 2008.



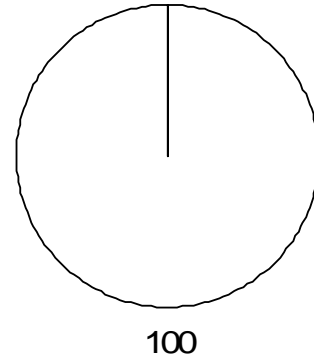
□ 1º ■ 4º ■ 5º

Figura 11. Percentual de mortalidade, por instar, de lagartas alimentadas com folhas soja transgênica tratada com Roundup WG. Seropédica, RJ, 2008.



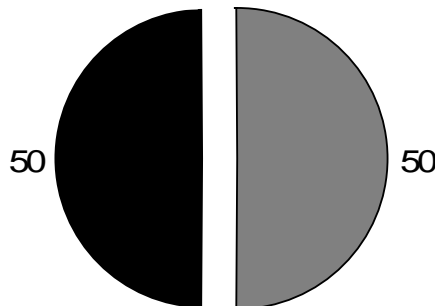
□ 1º ■ 2º ■ 4º ■ 5º

Figura 12. Percentual de mortalidade, por instar, de lagartas alimentadas com folhas de soja RR. Seropédica, RJ, 2008.



□ 1º

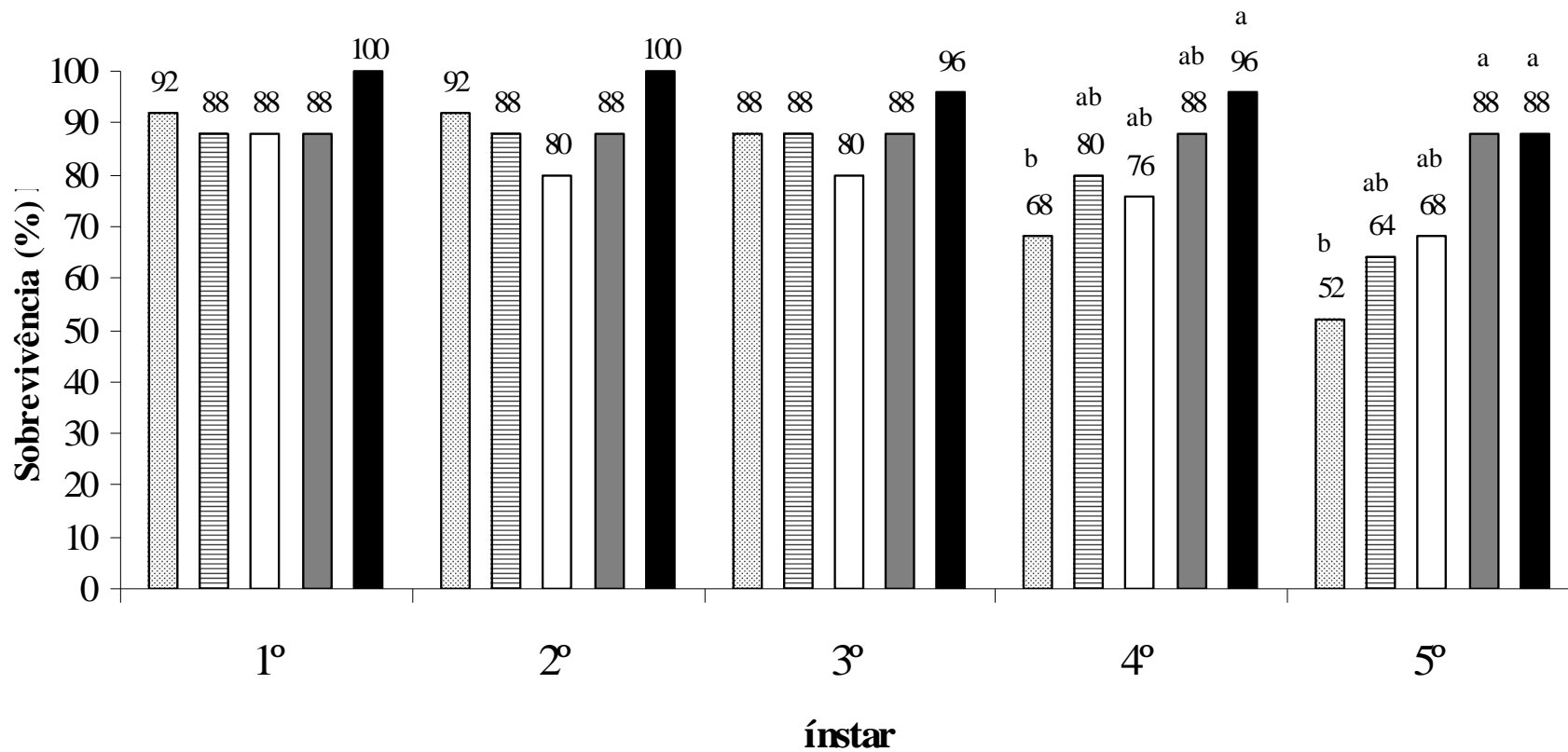
Figura 13. Percentual de mortalidade, por instar, de lagartas alimentadas com folhas de soja convencional. Seropédica, RJ, 2008.



■ 3º ■ 5º

Figura 14. Percentual de mortalidade, por instar, de lagartas alimentadas com folhas de sombreiro. Seropédica, RJ, 2008.

Além da mortalidade ter ocorrida em percentagens diferentes ao longo dos instares larvais, pode-se constatar, pela análise da sobrevivência larval acumulada, que no quarto e quinto instar, esse parâmetro ocorreu de forma significativamente diferente em algumas comparações, quando os valores foram analisados pelo teste de Qui-quadrado ($p < 0,05$). No quarto instar, a sobrevivência larval foi superior para as lagartas que foram alimentadas com folhas de sombreiro (96%), em comparação com as que foram submetidas a uma dieta de folhas de soja transgênica tratada com Roundup Ready (68%). No quinto instar a sobrevivência foi significativamente superior em sombreiro e soja convencional (88, 88 % respectivamente) quando comparada com o percentual registrado nas lagartas alimentadas com folhas de soja transgênica tratada com Roundup Ready (52%) (Figura 15). Nas demais comparações o alimento não influenciou a sobrevivência larval acumulada.



Roundup Ready
 Roundup WG
 Soja RR
 Soja Convencional
 Sombreiro

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

Figura 15. Sobrevivência percentual acumulada de lagartas de 1º à 5º ínstar de *Urbanus acawoios* alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro, Seropédica, RJ, 2008

Essas observações levam a crer que ocorreu um efeito deletério nas lagartas que foram alimentadas com folhas de soja transgênica, tratada ou não com herbicida, efeito o qual foi evidenciado pela mortalidade superior das larvas (Figura 9), comparando-se com as alimentadas com folhas de sombreiro e soja convencional.

Também se pode inferir que esse efeito deletério é expresso mais intensamente no final da fase larval, já que a constatação da influência na sobrevivência das larvas no primeiro instar (Figura 15), pode ser atribuída a adequação das larvas ao alimento, pois *U. acawoios* não tem a soja como hospedeiro típico, e nesta fase, as larvas são mais frágeis e conseqüentemente, mais susceptíveis a morrer por consumir um alimento que é menos adequado a sua dieta, no caso a soja, portanto a mortalidade constatada em soja convencional, ocorreu no primeiro instar, podendo deduzir então, que esta dieta não proporcionou efeito na mortalidade das larvas nos últimos instares, diferente da soja transgênica, tratada ou não com herbicida.

Pela análise do índice de desenvolvimento larval de *U. acawoios*, que relaciona a sobrevivência percentual larval com a duração em dias, da mesma fase, observou-se que para os indivíduos que foram submetidos a uma alimentação a base de folhas de soja convencional, registrou-se uma sobrevivência larval igual estatisticamente a dos que foram alimentados com folhas do hospedeiro típico (Figura 15), no entanto atingiram um índice significativamente inferior ao sombreiro (Tabela 11). Isso pode indicar, que até a soja convencional, genótipo que se demonstra menos resistente dentre os avaliados no grupo de soja, não é tão adequado ao desenvolvimento do inseto, quanto comparado com sombreiro.

Tabela 11. Índice de desenvolvimento médio (\pm DP) de lagartas de *U. acawoios* alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro. Seropédica, RJ, 2008.

Tratamento	Índice de desenvolvimento
GM _{RR} + Roundup Ready®	3,76 \pm 0,48 c
GM _{RR} + Roundup WG®	4,28 \pm 0,39 c
GM _{RR}	4,58 \pm 0,36 c
soja convencional	6,27 \pm 0,58 b
sombreiro	8,22 \pm 0,92 a

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Já no grupo de soja modificada geneticamente, tratada ou não com herbicida, foi observados os menores índices, e iguais estatisticamente entre si (Tabela 11), o que demonstra a influência do genótipo do vegetal transgênico sobre o desenvolvimento de *U. acawoios*. Nesse sentido pode-se inferir, pela observação do fato de que o índice observado em GM_{RR} (4,58) é estatisticamente igual ao registrado em GM_{RR}+ Roundup Ready® e GM_{RR}+ Roundup WG®, que a aplicação do glifosato, em ambas formulações, não influenciou no desenvolvimento larval do inseto, e que, talvez a resistência constatada nestes alimentos, em relação a sombreiro e soja convencional, possa estar relacionada com o genótipo e não com o produto químico.

Essa questão do genótipo pode ser abordada sobre diferentes aspectos, um deles é o concernente a transgênia propriamente dita, ou seja, a inserção do gene que confere resistência ao glifosato, e este quando expresso na planta, poderia estar conferindo alguma propriedade as cultivares, que justificasse as observações deste experimento.

Outra hipótese trata-se do fato que as cultivares, transgênica e convencional, não serem isogênicas, ou seja, não diferem apenas pela presença do gene exógeno, mas sim também, por características agronômicas obtidas por melhoramento convencional, sendo que a cultivar convencional é a BRS 232, produzida pela Embrapa e a cultivar P98R62, transgênica, é produzida pela Pioneer. Essas características agronômicas podem ser definidas, por exemplo, como resistência a patógenos, adaptação a diferentes regiões microclimáticas, épocas de semeadura e colheita etc. Detalhes destas características foram evidenciados no material e métodos.

Por outro lado, as diferenças no desenvolvimento do inseto observadas no grupo que foi alimentado com folhas de soja transgênica, tratada ou não com herbicida, em comparação com os grupos que foram mantidos com folhas de sombreiro e soja convencional, também podem ter explicações que esbarram em outras teorias, por exemplo, no estado nutricional da soja transgênica resistente a herbicida, bem como na ação do herbicida nesse complexo tecnológico, onde já existem pesquisas que avaliam essa questão com resultados concretos.

Nesse sentido, Franchini et al. (2008) analisando o estado nutricional de soja transgênica e não transgênica, concluíram que a modificação genética da soja para conferir tolerância ao glifosato, tem efeito marcante no balanço nutricional da cultura, com destaque para N, P, Ca, Mg e Mn mesmo para vegetais que não foram tratados com o herbicida.

Já, Santos et al. (2007) observaram alterações significativas no teor de nutrientes de folhas de soja transgênica, entre eles N, Ca, Mg, Fe e Cu, e intoxicação nas plantas pelo uso de diferentes formulações de herbicida a base de glifosato. Por exemplo, para o N e Ca a quantidade destes nutrientes foi significativamente inferior à observada na soja RR que não foi tratada com os pesticidas, a diferença registrada para o teor de N, foi constatada apenas nas plantas tratadas com as formulações Roundup Ready® e Zapp qi®, e para o teor do nutriente Ca, a redução notada ocorreu em todas as plantas tratadas com os pesticidas, independente da formulação. Já para Mg a quantidade deste nutriente foi significativamente superior à testemunha em todas as avaliações.

Portanto, sabe-se que o teor nutricional das plantas tem efeito sob o desenvolvimento e ocorrência dos insetos (PANIZZI e PARRA, 1991), assim, Rodriguez (1960) mencionou que diversos insetos, entre eles larvas de lepidópteros, se beneficiam da presença em excesso de N, por exemplo. Também foi mencionado por Panizzi e Parra (1991), que certas espécies de insetos apresentam taxas de crescimento, consumo, eficiência de utilização do alimento, superiores em plantas com maior teor de N. Ainda foi sugerido por Auerbach e Strong (1981) que os baixos teores de N encontrados em certas plantas, pode ser uma estratégia de defesa contra herbívora, e que a aplicação de fertilizantes, com conseqüente troca de teores nutrientes, poderia quebrar essa possível defesa. Também sobre a influência do N na ocorrência de insetos, Ventura et al. (2007) verificaram aumento do número de insetos, concomitantemente ao aumento de doses de fertilizantes a base de N, na cultura da berinjela.

Cabe ressaltar que a influência do N no desenvolvimento de insetos é algo que ainda não está totalmente elucidado, e que resultados de pesquisas que avaliam essa questão apresentam dados contraditórios, portanto, segundo Sampaio et al. (2007), o teor de N em vegetais pode correlacionar-se positiva ou negativamente com a infestação de determinadas pragas. Ao avaliar

as injúrias de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) na cultura do milho, registraram maior dano em condições de excesso e deficiência de N no solo.

Nas hipóteses aqui levantadas, cabe reiterar que diversos estudos demonstram que o balanço nutricional da soja transgênica RR é modificado, inclusive para o nutriente N, pela aplicação de diferentes formulações de herbicidas a base glifosato, bem como pela modificação genética. Logo, é pertinente considerar a influência desses aspectos no manejo integrado de pragas, bem como na influência dessa tecnologia, em interações ecológicas entre inseto e planta, e seu possível impacto no ambiente, pois neste experimento ficou evidenciado a influência dessa tecnologia em alguns aspectos biológicos de *U. acawoios*.

Com relação à viabilidade de pupas, foi observado que 100% das pupas provindas de lagartas alimentadas com folhas de soja convencional e de sombreiro apresentaram-se viáveis; já as provindas de lagartas alimentadas com GM_{RR+} Roundup Ready®, GM_{RR+} Roundup WG e GM_{RR}, registrou-se uma viabilidade pupal na ordem de: 84,6; 87,5 e 88,2%, respectivamente (Figura 16).

Isso pode indicar que a soja transgênica, tratada ou não com herbicida, influenciou na viabilidade das pupas de *U. acawoios*, e neste caso, o tipo de formulação de Roundup não teve influência marcante nesta fase (Figura 16).

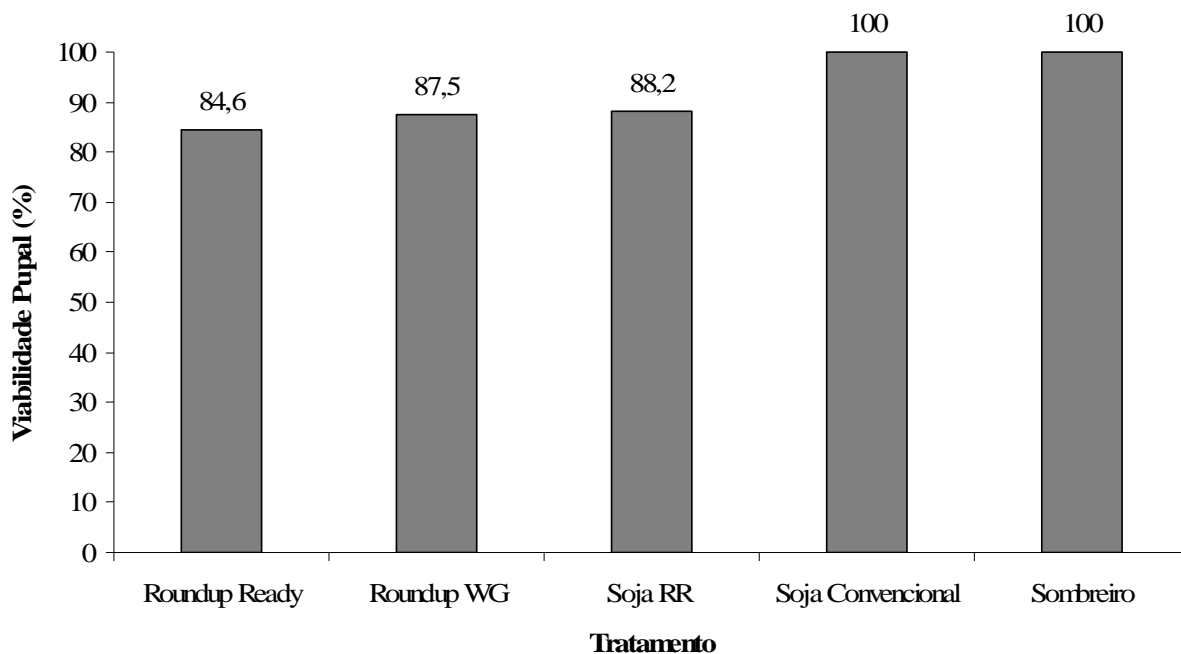
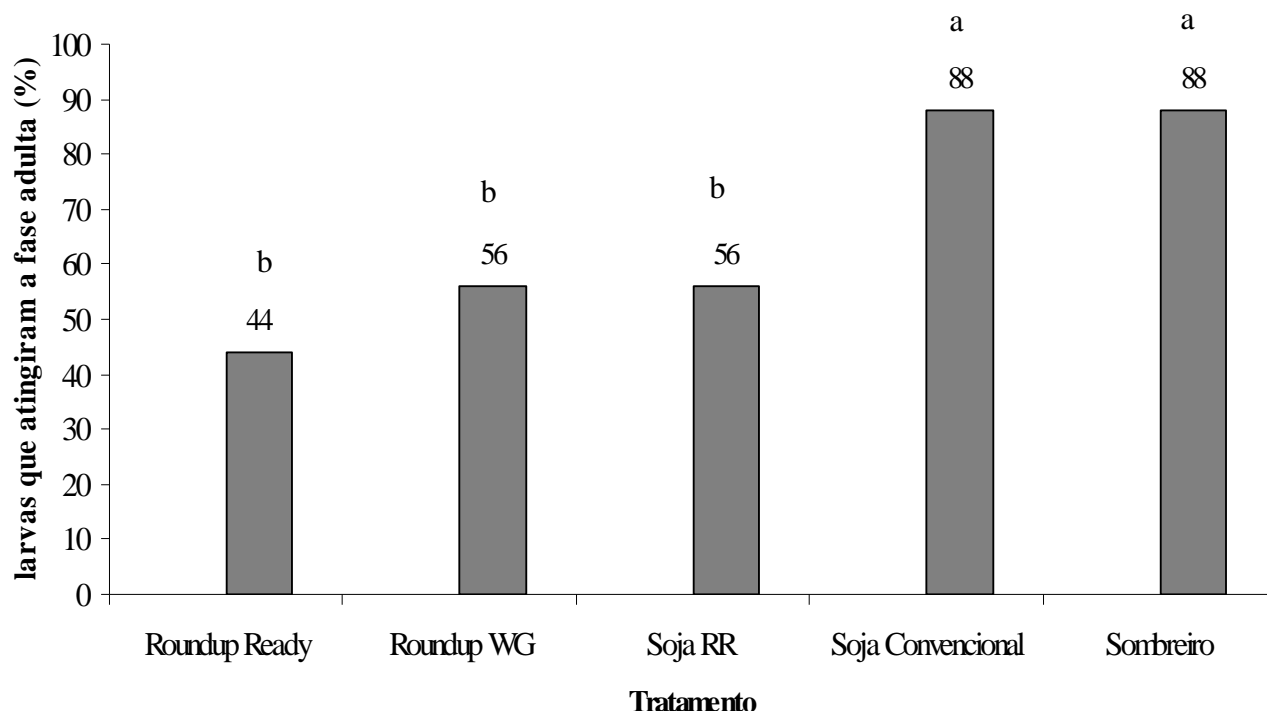


Figura 16. Viabilidade de pupas provindas de lagartas de *Urbanus acawoios* alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro, Seropédica, RJ, 2008.

Com relação ao percentual de lagartas de *U. acawoios* que atingiram a fase adulta, foi observado que os indivíduos que, receberam alimentação a base de folhas de soja convencional e sombreiro, atingiram valores significativamente superiores, 88 e 88 %, respectivamente, quando comparados pelo teste de Qui-quadrado a 5% de significância, com os valores percentuais obtidos dos indivíduos que foram alimentados com folhas de GM_{RR}+Roundup Ready[®], GM_{RR}+Roundup WG[®], GM_{RR}, sendo estes 44, 56 e 56 %, respectivamente (Figura 17). Esse registro indica que houve influência deletéria da soja transgênica sobre *U. acawoios*.



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

Figura 17. Percentual de lagartas de *Urbanus acawoios* alimentadas com folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato tratadas com duas formulações de Roundup, folhas de soja transgênica sem aplicação de herbicida, folhas de soja convencional e folhas de sombreiro que atingiram a fase adulta. Seropédica, RJ, 2008.

5. CONCLUSÕES.

- As folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato, sem tratamento químico, como alimento de larvas de *Urbanus acawoios*, influenciam na duração da fase larval, de pré-pupa, período de pupal e longevidade do adulto.
- A soja transgênica resistente a herbicida, quando tratada à campo com formulações de glifosato a base de sal de isopropilamina e sal de amônio, e suas folhas oferecidas como alimento à *Urbanus acawoios*, não influencia na duração da fase larval, de pré-pupa, período de pupal e longevidade do adulto.
- Folhas de soja transgênica resistente ao herbicida, tratadas e não tratadas com glifosato à campo, quando oferecidas a *Urbanus acawoios*, aumentam a mortalidade larval.
- As folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato, tratada e não tratada com glifosato, quando alimento de larvas, diminuem a população de *Urbanus acawoios*.
- A soja transgênica resistente a herbicida, tratada e não tratada com glifosato, diminui a viabilidade pupal de *Urbanus acawoios*, quando suas folhas são oferecidas como alimento às larvas.

- Folhas de soja transgênica resistente ao glifosato, tratada e não tratada com formulações de glifosato, quando oferecidas à *Urbanus acawoios*, reduzem o índice de desenvolvimento.

CAPÍTULO II

INFLUÊNCIA DO PÓLEN DO MILHO TRANSGÊNICO RESISTENTE A INSETOS SOBRE A TRAÇA DA CERA *Galleria mellonella* (Linnaeus 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) E OS POSSÍVEIS EFEITOS ECOLÓGICOS

RESUMO

O piralídeo *G. mellonella* é um lepidóptero associado às colméias de abelhas e as suas larvas alimentam-se de cera velha, pólen, exúvias etc. Existem opiniões contrárias quanto à sua inocuidade em relação às abelhas e, conseqüentemente à produção apícola. Alguns autores consideram-na praga de apiários, enquanto outros a classificam como um organismo importante na reciclagem de matéria orgânica dentro das colméias. Deste ponto de vista podem ser consideradas benéficas às abelhas e neste contexto a adoção de cultivos transgênicos resistentes a insetos pela expressão da proteína Cry, de *Bacillus thuringiensis*, poderá afetar as larvas de *G. mellonella*. As abelhas ao coletarem pólen e armazenando-o nas colméias podem expor esse lepidóptero à intoxicação pela proteína Cry presente neste pólen. O presente trabalho tem o objetivo de avaliar a influência do pólen do milho Bt, que expressa a proteína Cry, sobre *G. mellonella* e com isso traçar uma discussão sobre a possibilidade de este lepidóptero intoxicar-se no campo. Para avaliar esta hipótese foi realizado um ensaio biológico em que se ofertou às larvas pólen de milho Bt, milho convencional e pólen comercial. A duração da fase larval de *G. mellonella* 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 Bt, foi associado favo de *Apis mellifera*. A largura e comprimento das pupas provindas de lagartas alimentadas com cera virgem adicionada com pólen transgênico ou convencional foram significativamente inferiores quando comparados aos valores das mensurações realizadas nas pupas provindas 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: Insetos não-alvo, transgênicos, milho bt

ABSTRACT

The pyralids *G. mellonella* is a lepidopteran associated with hives of bees, their larvae feed on old wax, pollen, exuviae, etc. There are contrary opinions about its safety to bees, and honey production. Some researchers admit as being a pest of the apiary, while others classify it as an important organism in the recycling of organic matter inside the hive. This last view may be considered beneficial to bees. Within this context, the adoption of transgenic crops resistant to insects by expressing the Bt protein from *Bacillus thuringiensis*, may cause disease to the larvae of *G. mellonella*. The bees collect the pollen and store in the hives which can expose this lepidopteran to intoxication by Bt proteins present in pollen. This study aims to evaluate the influence of Bt corn pollen on *G. mellonella* and then trace a discussion about the possibility of the field condition of Lepidoptera. 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 Bt 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 Bt alone is a less suitable food for the development of *G. mellonella*, in relation to a diet consisting of pollen from various plants.

Key words: non-target insects, transgenic, Bt maize

1. 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. 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 exúvias, material presente nas colméias de abelhas.

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 e ABREU, 2009). 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 e SHIMANUKI, 1990). Na segunda visão, de acordo com Sabugosa-Madeira et al. (2007), a presença destes piralídeos 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 muito 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. Segundo Sabugosa-Madeira et al. (2007), 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. 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.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Efeitos de culturas transgênicas Bt em insetos não alvo.

Os insetos constituem uma das principais causas de danos à produção vegetal no mundo. Geralmente, o controle desses organismos tem sido feito com agroquímicos e em menor escala, pelo uso de pesticidas biológicos. As plantas transgênicas resistentes a insetos pragas têm se tornado uma alternativa ao seu combate, ao mesmo tempo que seu uso suscita discussões sobre a

pertinência da tecnologia e impacto no ambiente, bem como em organismos não alvo, entre eles os insetos.

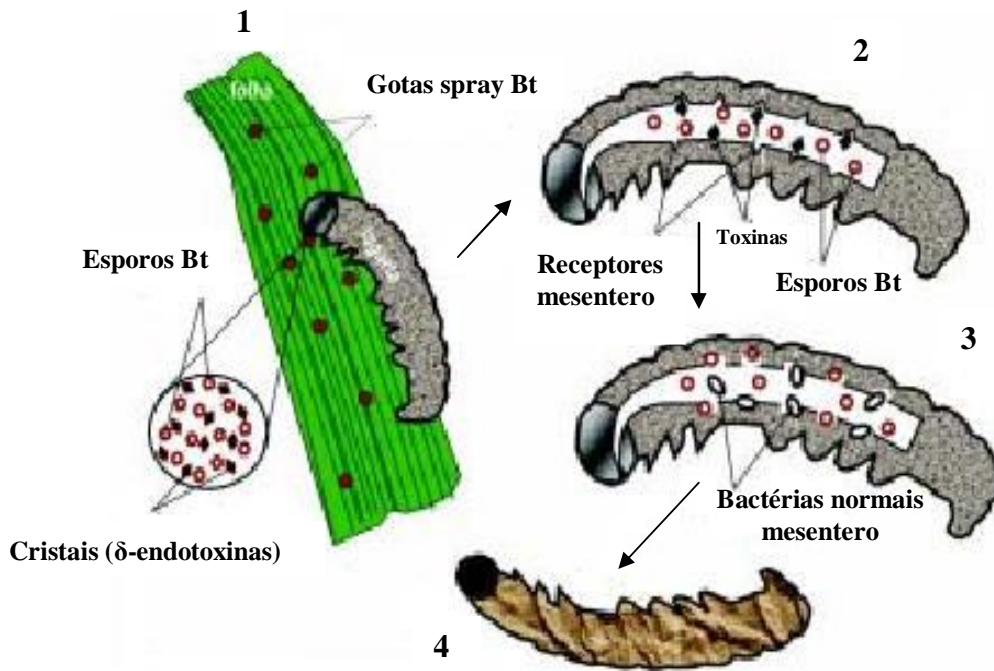
Para um entendimento efetivo da influência dessa tecnologia em insetos, é necessária a conceituação de alguns aspectos que envolvem o controle desses organismos, dentre eles os concernentes aos biopesticidas, sobretudo da utilização de microorganismos. Pode-se dizer que a descoberta da patogenicidade à insetos pela bactéria *Bacillus thuringiensis* foi uma das mais importantes contribuições ao controle biológico, e mais recentemente pode ser caracterizada como a inspiração que deu origem às plantas transgênicas resistentes a insetos.

Dentro desse contexto, no intuito da minimização dos impactos negativos derivados da ação de insetos pragas, uma alternativa à utilização sistemática de agroquímicos, é o chamado manejo integrado de pragas (MIP). Essa prática, segundo Loguercio et al. (2002), consiste na utilização inteligente das várias medidas de controle disponíveis, visando atingir eficiência econômica com consciência ecológica e social. Os mesmos autores relatam que, dentro desta medida, o controle biológico (CB) figura como importante sistema que aproveita os inimigos naturais das pragas, fungos e bactérias parasitas, e as substâncias e produtos deles derivados, compreendendo sua biologia e utilizando adequadamente os mecanismos ecológicos de interação entre eles. Nesse contexto, a utilização da bactéria de solo *B. thuringiensis*, muito conhecida pela sua forma abreviada 'Bt', surge como uma ferramenta de combate a insetos pragas, sendo uma forma de CB utilizada no manejo integrado de pragas, em consequência do potencial entomopatogênico.

Mesmo sendo estudados e utilizados como biopesticidas há mais de meio século e com claras indicações de serem menos impactantes ao meio ambiente do que os agroquímicos e não prejudiciais ao seres humanos, os produtos a base de *B. thuringiensis* nunca ocuparam um lugar de destaque no mercado de vendas de inseticidas, principalmente por problemas relacionados com a perda de estabilidade, a ausência de translocação nas plantas, limitado espectro de ação, e degradação rápida pela ação da luz ultravioleta (NAVON, 2000).

O gênero *Bacillus* possui uma fase de esporulação característica no seu desenvolvimento, na qual o esporo e cristais protéicos são simultaneamente formados. Tais cristais em Bt, também chamados de δ -endotoxinas e codificados pelos chamados genes Cry, vem sendo utilizados na formulação de sprays bioinseticidas comerciais, que fornecem níveis adequados e consistentes de CB para diversas espécies de insetos praga na agricultura (ESTRUCH et al. 1997).

Segundo Loguercio et al. (2002), uma das mais importantes características das proteínas inseticidas Cry é a sua alta especificidade em relação às espécies-alvo de insetos afetados. A especificidade dessas toxinas deve-se a uma co-evolução de proteínas receptoras de superfície no intestino médio (mesentero) dos insetos-alvo sensíveis. Esses receptores ligam-se de forma específica às δ -endotoxinas, modificando sua conformação e causando vazamento de íons e dano osmótico das células, o que conduz, conseqüentemente, à desintegração do mesentero e a morte do inseto (Figura 1).



- 1- 1 Ingestão das toxinas – Esporos de Bt.
- 2- 2 Ligação das toxinas com os receptores específicos do intestino médio.
- 3- 3 Degradação da parede do mesentério e invasão de bactérias e esporos.
- 4- 4 Morte por fome + infecção generalizada (septicemia).

Figura 1 Esquema dos efeitos das proteínas Cry no intestino médio de insetos suscetíveis (Adaptado de LOGUERCIO et al. 2002)

O espectro de atividade inseticida destas toxinas é estreito devido ao seu modo de ação ou mesmo pela fisiologia do inseto. Os sítios de ligação não só estão envolvidos na especificidade das toxinas de Bt como também representam um mecanismo de resistência dos insetos às δ-endotoxinas (FIUZA et al., 1996; de MAAGD et al., 1999).

Nesse sentido a atividade entomopatogênica dessas proteínas, das diversas linhagens de *B. thuringiensis*, pode ser conferida por diferentes modos de ação, conforme o grupo de insetos. A solubilização das proteínas ocorre a pH alcalino do trato gastro-intestinal de lepidópteros e dípteros; uma menor efetividade destas proteínas em coleópteros pode ser devido ao seu pH neutro ou pouco ácido (SCHNEPF et al., 1998). No entanto, Jouanin et al. (1998) relataram que existem proteínas também ativas a Coleoptera, sendo classificadas dentro do grupo denominado Cry III e as que são sensíveis a Lepidoptera, como Cry I. Segundo Frizzas et al. (2004), a ação é extremamente tóxica e altamente específica dependendo da proteína. De acordo com Monnerat e Bravo (2000), existem mais de 120 diferentes genes Cry que expressam proteínas com ação entomopatogênica diferenciada.

Portanto, a busca de linhagens de *B. thuringiensis* com alta atividade tóxica e diferentes especificidades a insetos é de extrema importância tanto para a produção de novos biopesticidas como também para a utilização destas linhagens como fontes doadoras de genes para a obtenção

de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos (BOBROWSKI et al., 2001 apud BOBROWSKI et al., 2003).

Genes de Bt codificadores de proteínas Cry foram isolados e introduzidos em plantas agronomicamente importantes, utilizando diferentes métodos de transformação genética como aqueles que empregam *Agrobacterium*, transformação direta de protoplastos e bombardeamento de partículas ou biobalística (PASQUALI e BODANESEZANETTINI apud BOBROWSKI et al., 2003).

Segundo Jouanin et al. (1998), as primeiras plantas transgênicas que expressaram genes Cry foram o tabaco e o tomate, obtidas em 1987. Segundo os mesmos autores, essa característica passou a ser obtida, posteriormente, em culturas de milho, arroz e algodão, para obtenção de resistência a Lepidoptera.

Em 2008, no Brasil, plantou-se 15,8 milhões de hectares de culturas transgênicas, sendo 1,3 milhões de hectares de milho transgênico resistente a insetos e 0,25 milhão de hectares de algodão com a mesma característica (JAMES, 2008). A soja transgênica, resistente ao herbicida glifosato, ocupa a maior área plantada, 14,2 milhões de hectares, face ao ano de 1998 (início de plantio), em comparação com as culturas de algodão e milho Bt, resistentes a insetos da ordem Lepidoptera, que tiveram seu início em 2005 e 2007 no Brasil, respectivamente. Até à presente data nenhuma planta transgênica resistente a insetos da ordem Coleoptera teve seu plantio aprovado no Brasil.

A adoção desta tecnologia suscitou discussões pertinentes em várias áreas da ecologia e da segurança alimentar, dentre esses, a influência em organismos não alvo é algo ainda de muita especulação. Nesse sentido, diversas pesquisas foram conduzidas a fim de tentar elucidar os efeitos desta tecnologia em insetos não alvo. Os trabalhos concentraram-se na avaliação da interação deste complexo com os insetos benéficos, bem como também, em insetos ditos 'alvo', a fim de esclarecer possíveis efeitos negativos em interações ecológicas, seja entre inseto x planta, ou mesmo entre inseto x inseto, no caso de predadores.

Os resultados ainda são contraditórios e alvo de muita polêmica. A CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança), órgão brasileiro responsável por legislar tecnicamente sobre o assunto, liberou a comercialização e o plantio de seis cultivares de milho Bt e quatro cultivares de algodão Bt, até dezembro de 2009. Todos os eventos são concernentes à resistência a insetos da ordem Lepidoptera. Em seus pareceres técnicos conclusivos, utilizados para a aprovação dos cultivares no âmbito da comercialização e plantio, nenhum efeito negativo foi relatado, do ponto de vista da interação com insetos não alvo, sendo este o posicionamento do governo brasileiro sobre o assunto até à presente data.

Por exemplo, o parecer técnico nº 1.100/2007, que autoriza o plantio e comercialização de milho provindo de linhagens portadoras do evento MON810, "milho Bt", a CTNBio, dentre inúmeras considerações, relata:

“O milho MON810 não apresentou efeito sobre a dinâmica populacional das espécies predominantes de aranhas e insetos benéficos de diferentes guildas tróficas, incluindo pragas não-alvo e insetos benéficos”

“Dentre as vantagens de utilização do gene cry em relação a outros métodos de controle de lepidópteros, estão a ausência de efeitos negativos em insetos não-alvo, mamíferos e seres humanos, a alta especificidade e eficiência contra os insetos-alvo, a degradabilidade ambiental e a segurança de manipulação e utilização” (destaque acrescido pelo autor)

De fato vários estudos avaliaram as afirmações feitas pela CTNBio, como as que foram relatadas no parecer técnico sobre o milho MON810, a exemplo, 11 estudos de campo, abordando o impacto de plantas geneticamente modificadas sobre organismos não-alvo, que foram realizados nos Estados Unidos e na Austrália e publicados, na forma de 13 artigos, na edição de Outubro de 2005 do periódico *Environmental Entomology*.

Numa compilação desses trabalhos, o CIB (Conselho de Informações sobre Biotecnologia), uma organização não governamental, divulgou um texto, escrito por Marcos Rodrigues de Faria, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde relata as principais conclusões dessas pesquisas, sendo estas expressas nos três parágrafos subseqüentes.

“Os estudos foram feitos com algodão e milho Bt, resistentes ao ataque de lagartas, e híbridos de milho resistentes ao ataque de besouros. As pesquisas com milho Bt foram conduzidas em quatro estados americanos e as com algodão foram realizados nos Estados Unidos e na Austrália. As áreas dos experimentos variaram de 0,05 - 80 hectares e, em alguns casos, envolveram avaliações de lavouras comerciais. As plantas Bt foram comparadas com plantas convencionais, que receberam ou não aplicação de inseticidas químicos. Houve um significativo acompanhamento em termos de organismos não-alvo de controle avaliados nos estudos, variando de cinco a 216 espécies distintas. Para as amostragens, foram feitas avaliações nas plantas, utilizando diferentes metodologias de coleta e observação de insetos, a exemplo de armadilhas colocadas no solo, armadilhas nas quais os insetos capturados ficam aderidos, redes para captura de insetos e panos usados entre as linhas de cultivo das plantas que facilitam a coleta de insetos ao serem sacudidas.

Nos experimentos com algodão Bt, não foram observados efeitos significativas sobre a dinâmica populacional dos organismos não alvo. As reduções nas populações desses organismos que foram observadas ocorreram como consequência da menor quantidade de lagartas (pragas), que foram eficientemente controladas pela tecnologia Bt. E, extremamente importante, foi o fato de que a capacidade de predação de pragas feitas pelos inimigos naturais avaliados não ter sido reduzida nos cultivos GM.

As conclusões dos estudos com milho Bt foram semelhantes, uma vez que a quantidade de organismos não-alvos da tecnologia, incluindo inimigos naturais de pragas que são agentes de controle biológico, não foi afetada significativamente. Segundo os autores dos trabalhos, as reduzidas alterações observadas foram relacionadas com a menor quantidade de lagartas (pragas) nas lavouras, como consequência da eficiência de controle das plantas Bt. Essa menor quantidade de pragas resulta, em muitos casos, na menor presença de seus inimigos naturais específicos. Em um dos estudos, no qual foram avaliadas mais de 200 espécies de insetos e aranhas, o único efeito indireto inesperado foi a menor ocorrência nas parcelas transgênicas de uma espécie de percevejo benéfico”.

Embora seja mencionado que uma menor quantidade de pragas fitófagas foi observada em campos de plantas Bt, e que este fato pode estar correlacionado, também, com a redução dos inimigos naturais dessas pragas. Algo curioso foi relatado por Martins et al. (2007) ao avaliarem a ocorrência da entomofauna (fitófagos e auxiliares) por três anos, em plantações de milho Bt e convencional, registraram que o número de fitófagos foi maior nas plantações Bt. O que nem

sempre ocorreu com os auxiliares, sendo mais abundantes ou menos abundantes, durante o mesmo período de avaliação. Os autores não explicaram contundentemente o ocorrido, apenas relataram que para verificar eventuais efeitos, em longo prazo, do milho Bt, em inter-relações com fitófagos, seria interessante realizar estes estudos em locais com uma maior incidência de pragas e maior riqueza de artrópodes.

Contudo, embora existam relatos sobre a não interferência dessa tecnologia em organismos não alvo, como relatado pelo CIB na compilação dos artigos, o contrário também ocorre, e dizer que existe “ausência de efeitos negativos em insetos não-alvo”, pode não ser a expressão verdadeira, como apresentada pela CTNBio, em seus pareceres técnicos sobre o assunto.

Dentro desse contexto, Yang et al. (2005) avaliaram taxas de parasitismos em ovos e lagartas de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), em cultivares de algodão Bt e convencional. Relataram que o parasitismo de ovos por *Trichogramma confusum* e de lagartas por *Camponotus chlorideae* (Uchida) e *Meteorus pulchricornis* (Wesmael), foi menor nos indivíduos provenientes do campo transgênico, em comparação com o convencional.

Ainda, Hilbeck et al. (1998), em artigo publicado também no prestigiado periódico *Environmental Entomology*, avaliaram os efeitos indiretos do milho transgênico Bt sobre o desenvolvimento e mortalidade de *Chrysoperla cornea* (Neuroptera: Chrysopidae). O experimento consistiu em alimentar larvas do predador *C. cornea* com lagartas de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) e *Spodoptera littoralis* (Boisduval), provindas de uma alimentação à base de milho Bt e convencional, e avaliar os efeitos dessa dieta em alguns parâmetros biológicos desse crisopídeo. Os autores concluíram que tinha havido interação do tipo de alimentação do hospedeiro no desenvolvimento do predador, sendo que a fase larval foi prolongada nos indivíduos alimentados com lagartas provindas de alimentação transgênica. A mortalidade larval do predador também tinha sido afetada, em função da alimentação recebida; 62% de morte em indivíduos do grupo alimentado com lagartas criadas em folhas do milho Bt, contra 37% de morte em indivíduos que receberam como alimento, lagartas sem milho transgênico em sua dieta. Os autores ainda concluíram que esses resultados, provavelmente, foram ocasionados por um efeito combinado, ou seja, pela exposição à proteína Bt e também por uma deficiência nutricional da presa doente pela ação entomopatogênica da proteína Bt.

Em trabalho semelhante, Dutton et al. (2002), também, avaliando o efeito de cultivar de milho Bt, que expressa a proteína Cry1Ab, em *C. cornea*, encontraram um aumento significativo na mortalidade e um atraso no desenvolvimento, quando os predadores foram alimentados com larvas de *S. littoralis* criadas em folhas de milho-Bt. Ainda concordando com Hilbeck et al. (1998), propuseram que a interação combinada da qualidade da presa doente e da toxina Cry¹Ab, poderá explicar os efeitos negativos observados em *C. cornea* quando alimentados com *S. littoralis*.

Já Schmidt et al. (2009) verificaram que joaninhas da espécie *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae), um dos mais importantes insetos auxiliares, foram afetadas pelo consumo, direto ou mediado através das suas presas, de toxinas Cry¹Ab, Cry³Bb sintetizadas por plantas transgênicas. Em ambas as avaliações, Cry¹Ab e Cry³Bb, foi registrado um percentual de mortalidade para *A. bipunctata*, superior ao controle, este constituído de presas alimentadas com tecidos vegetais não transgênicos. Com estes resultados os autores discutem a seletividade e a segurança ambiental destas proteínas.

Possivelmente, os insetos considerados não sensíveis, tornam-se sensíveis quando ingerem insetos fitófagos nos quais as proteínas tóxicas se tornaram ativas. Estas toxinas podem ter efeitos negativos sobre predadores e parasitoides a diversos níveis tróficos (DUTTON et al.,

2002; HARWOOD et al., 2005; YANG et al., 2005; OBRIST et al., 2006; SCHMIDT et al., 2009).

Também, ainda dentro de um enfoque onde é avaliado o efeito desta tecnologia em diversos níveis tróficos, Rosi-Marshall et al. (2007), em um estudo que pode ser considerado muito oportuno, avaliaram o efeito de restos de plantações de milho Bt como pólen, folhas, espigas etc em riachos que permeiam as plantações. Concluíram que este material era carregado para os cursos d'água, afetando, desta forma, a fauna de insetos aquáticos, entre eles *Lepidostoma liba* e *Helicopsyche borealis* (Trichoptera) que, segundo a pesquisa, é a base alimentar de muitos peixes e anfíbios. O estudo também mostrou que algumas partes do milho Bt, como folhas, espigas e pólen, podem viajar até 180 metros das áreas de origem, em tempestades, podendo afetar, a jusante das plantações e outros cursos d'água.

Dentre as controvérsias instauradas sobre a influência desta tecnologia em insetos, as vertentes de pensamentos sobre uma possível influência em abelhas, principalmente em *Apis mellifera*, é algo de muita polêmica. Nessa conjectura, no início do ano de 2009, várias reportagens sobre o repentino sumiço de abelhas nos Estados Unidos e na Europa deixaram alarmados os produtores, ambientalistas, pesquisadores e público em geral. Desde então muito se tem questionado sobre o aquecimento global e a presença dos plantios de culturas transgênicas como causas desse sumiço.

A Desordem do Colapso das Colônias (DCC), como é denominada essa questão, é caracterizada pela ausência de abelhas vivas ou mortas na colônia, mas com a presença de crias e alimento, podendo ser encontrado, em algumas, a rainha e um pequeno número de operárias. Em caso de colônias que estão iniciando a DCC, observa-se uma quantidade maior de cria do que a capacidade das operárias de cuidar das mesmas, concentração de operárias novas na população da colônia, a presença da rainha e uma relutância da colônia em consumir o alimento energético ou protéico fornecido (EMBRAPA, 2009). Mas o que os organismos geneticamente modificados podem ter haver com essa questão? Alguns pesquisadores têm levantado algumas hipóteses, baseadas em efeitos diretos e indiretos.

Embora as toxinas inseticidas Bt possam ser consideradas não nocivas para as abelhas, o pólen de plantas transgênicas é altamente tóxico para outros insetos que coabitam nas colméias, entre eles, a traça da cera *Galleria mellonella* (L.) (HANLEY et al., 2003) e muito provavelmente *Achroia grisella* (Fabricius), por ocupar o mesmo nicho ecológico e serem espécies aparentadas, Lepidoptera: Pyralidae. Nas colônias mortas ou nos favos abandonados, estas traças alimentam-se da cera velha, consumindo-a e assim, eliminando eventuais focos de infecção (MELATHOPOULOS et al., 2004). Se as abelhas nos seus favos acumularem pólen transgênico, poderá ocorrer, a intoxicação das traças da cera, provocando o desequilíbrio no ecossistema (SABUGOSA-MADEIRA et al., 2007). Nesse sentido, a provável redução da população de traças da cera nas colméias de abelhas, em consequência da colheita de pólen de culturas transgênicas, pode causar uma deficiente reciclagem e limpeza da cera velha, levando à prevalência de agentes patogênicos nocivos para as abelhas (SABUGOSA-MADEIRA e ABREU, 2009).

Ainda sobre essa questão, mas levando em consideração possíveis efeitos diretos das plantas transgênicas em *A. mellifera*, Kaatz (2005) relatou que as abelhas infectadas com um agente patogênico (*Nosema* sp.) apresentaram valores superiores de mortalidade quando na sua alimentação estava presente pólen de milho transgênico Mon 810 e Bt176. De acordo com este autor, se as abelhas sãs fossem tratadas com antibióticos, não apresentavam diferente taxa de mortalidade das expostas às toxinas do milho transgênico. Estes resultados levaram o autor a admitir a existência de uma interação da toxina e patógeno sobre o epitélio do intestino das

abelhas, tornando-as, assim, muito mais sensíveis à infecção. No entanto informou ainda, que o mecanismo dessa interação era ainda desconhecido.

Mesmo que esses fatos possam estar relacionados com a DCC, não se pode afirmar com certeza que a causa deste problema seja unicamente o plantio de transgênicos. Talvez, a sinergia destas questões aqui levantadas, com outras hipóteses igualmente pertinentes, como por exemplo, envenenamento por defensivos agrícolas, desnutrição, alto nível de consangüinidade e estresse por fatores abióticos, sejam a origem. No entanto, de acordo com Sabugosa-Madeira e Abreu (2009) o estado atual do conhecimento leva a crer que o cultivo de milho transgênico poderá induzir alterações diretas e/ou indiretas no equilíbrio ecológico existente nas colônias de abelhas *A. mellifera*.

O pólen de plantas Bt, também, tem despertado a atenção de investigadores, não só no possível impacto que ele possa vir a causar em insetos como as abelhas, que habitualmente se alimentam deste material, mas, também, em insetos que ocasionalmente o possam consumir. O celebrado caso da borboleta *Danaus plexippus* "Monarca", ilustra essa questão. Um estudo publicado em 1999, no periódico Nature, mostrou que o pólen do milho Bt cultivado comercialmente e totalmente de acordo com as regulamentações é tóxico para larvas da borboleta Monarca, inseto não alvo, sob certas condições de laboratório (LOSEY et al., 1999). Neste experimento, larvas dessa borboleta foram alimentadas com folhas de *Sonchus oleraceus* (Asteraceae) "Serralha" seu hospedeiro típico, e com pólen Bt. Quatro dias depois, 44% das larvas estavam mortas, ao passo que as que receberam pólen, provindo de planta convencional, nenhuma havia morrido.

Essa pesquisa trouxe à tona muitos debates sobre o impacto do pólen destas plantas, em insetos não alvo, sobretudo em larvas de Lepidoptera. Depois de muita polêmica, chegou-se à conclusão, como compilado por Lacey (2006), que a toxicidade observada no laboratório, segundo diversos trabalhos, era aparentemente um produto artificial da quantidade de pólen à qual as larvas tinham sido expostas, e contextualmente, isso seria irrelevante, já que nos campos de cultivo, o estágio larval desta espécie normalmente acaba antes que as plantas de milho produzam pólen.

As críticas à metodologia utilizada para avaliar a toxicidade do pólen Bt na borboleta Monarca, fizeram surgir outros estudos, com o mesmo enfoque, mas com outras espécies e com protocolos mais preditivos da realidade de campo. A exemplo, Lang e Vojtecha (2006) avaliaram a toxicidade do pólen Bt, em laboratório, à *Papilio machaon* L. (Lepidoptera, Papilionidae), borboleta conhecida como Rabo de Andorinha. No experimento, foi ofertado pólen do milho Bt, à lagartas de *P. machaon*, em concentrações obtidas de observações realizadas em campo, juntamente com discos foliares de *Pastinaca sativa* L. Constatou-se que a mortalidade larval foi superior, o consumo foliar foi menor, o peso corporal foi menor e a duração da fase larval foi superior, em relação à testemunha. Também foram observados efeitos nas pupas, mas menos acentuados que na fase larval. Como recomendação, os autores admitem que possíveis efeitos do milho Bt em borboletas européias e mariposas, devem ser avaliados de forma mais rigorosa antes do milho Bt ser cultivado em extensas áreas.

Na compilação aqui apresentada, nota-se, pela análise dos resultados e conclusões das pesquisas que, interações entre a tecnologia de plantas Bt e insetos não alvo ocorreram, e portanto, deveriam ser objeto de muita cautela, mesmo no meio científico. Logo, as entidades governamentais responsáveis por legislar sobre o assunto deveriam, também, buscar embasamento para suas decisões, em investigações que investiguem essa questão de forma efetiva. O que nem sempre acontece, haja visto o caso da CTNBio.

Nesse sentido, o fato é que as liberações dos plantios de OGMs devem ser calcadas em avaliações científicas o que, nem sempre, tem sido a regra, visto as autorizações de cultivo terem sido dadas quando a investigação era ainda escassa (comunicação pessoal: Dr. José Bernardo Madeira da Costa¹).

Portanto, é aconselhável uma política de investigação científica imparcial, que vise aclarar todas as questões aqui levantadas, e muitas outras que possam surgir no meio científico, a fim de gerar subsídios técnicos concretos, que sejam utilizados para nortear o rumo das decisões sobre essas questões.

3. 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.

3.1. Obtenção do pólen transgênico e convencional.

Tanto o pólen provindo de milho convencional, como o de milho transgênico, a colheita de panículas foi realizada no campo, em propriedades agrícolas de Portugal. No primeiro caso, a coleta procedeu-se no dia 06 de Julho de 2009, no distrito de Braga, concelho de Barcelos, freguesia de Macieira de Rates (Figura 2), na propriedade Quinta da Torre. As panículas foram coletadas da cultivar PR65 (Pioneer®), cuja a sementeira ocorreu em 12 de abril de 2009.

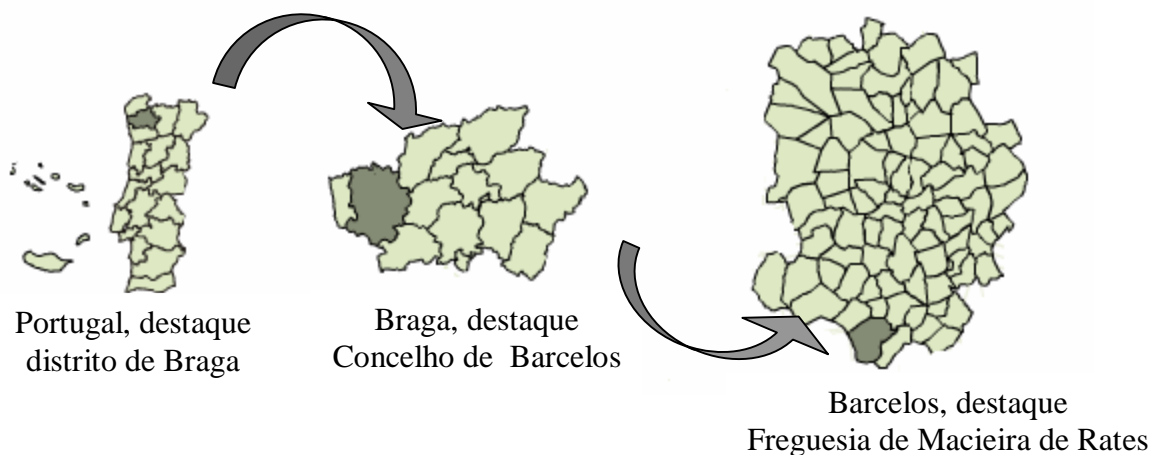


Figura 2. Localização geográfica da coleta de pólen do milho convencional em Portugal.

No segundo caso, a coleta foi realizada no dia 12 de Julho de 2009, no distrito do Porto, Concelho de Vila do Conde, freguesia de Mosteiro (Figura 3), na propriedade casa de Lourenço. As panículas foram coletadas na cultivar Mas58.YG, derivada da linhagem MON810, expressando, portanto, a proteína Cry1Ab, fabricada pela empresa Maisadour. A sementeira ocorreu em 20 de abril de 2009.

¹ Correspondência eletrônica do Agrônomo doutor em ciências agrárias pela Universidade do Porto, enviada para o Engenheiro Florestal Henrique Trevisan, doutorando, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em 10/01/2010.

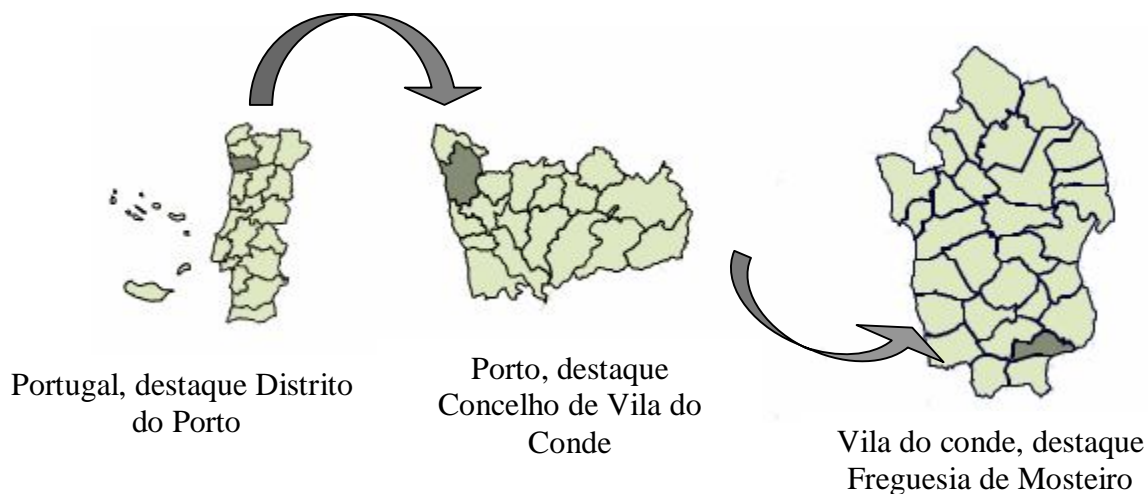


Figura 3. Localização geográfica da coleta de pólen do milho transgênico em Portugal.

3.1.1. Coleta, crivagem, secagem e armazenagem do pólen de milho.

A coleta procedeu-se em excursões nas plantações de milho, onde, através de procedimento manual, as panículas foram cortadas inteiras, com o auxílio de uma tesoura de poda (Figura 4), e posteriormente foram acondicionadas em sacos de papel, sendo em seguida, levadas ao laboratório para crivagem do pólen.



Figura 4. Coleta de panículas em plantação de Milho. Macieira de Rates, PT, 2009

No laboratório, as panículas foram acomodadas em bandejas forradas com papel tipo 'sulfite', e em seguida foram submetidas à secagem em estufa ventilada a uma temperatura de 25 °C, por um período de 2 dias.

Após secas, procedeu-se a crivagem do pólen, para isso, as panículas foram cortadas com o auxílio de uma tesoura em fragmentos de 2-5 cm. Estes, contendo as anteras e conseqüentemente o pólen, foram submetidos a crivagem, por 5 minutos em crivador, acoplados a ele peneiras, cujo a ultima malha foi de 90 micrômetros (Figura 5). O pólen se depositou em bandeja coletora, após o procedimento (Figura 6).



Figura 5. Crivagem do pólen. Porto, PT, 2009.



Figura 6. Pólen depositado na bandeja coletora após crivagem. Porto, PT, 2009.

Das bandejas coletoras, o pólen foi acondicionado em tubos plásticos de 45 ml, os quais foram conservados a -20°C , até serem utilizados na dieta das larvas de *G. mellonella*.

3.2. Obtenção da população base de *Galleria mellonella*.

Uma população base de *G. mellonella* foi obtida através de criação em laboratório, para isso foram coletadas pupas em ambiente natural, provindas de apiário localizado na vila de Mogadouro, pertencente ao distrito de Bragança, Portugal.

Estas foram acomodadas em uma caixa telada, servindo de gaiola, de forma que ao emergirem, os adultos permaneceram confinados no interior da mesma. No mesmo local foi ofertado, como sítio de oviposição, um papel dobrado em tiras paralelas, sendo uma das extremidades grampeadas, originando, desta forma, arestas onde os ovos foram depositados (Figura 7) pelas fêmeas de *G. mellonella*.



Figura 7. Ovos de *G. mellonella* ovipositados no papel, em criação de laboratório. Vairão, PT, 2009.

Os ovos foram coletados e acomodados em placas de Petri, sendo o registro da data da postura e da posterior eclosão, feita na própria placa. Como alimento das lagartas neonatas, foi utilizada cera virgem e pólen comercial da marca Serra Mel. As larvas foram alimentadas até o empupamento, dando origem a novos adultos e conseqüentemente, a uma nova geração.

3.3. Análise da ação do pólen transgênico em *Galleria mellonella*.

Para a análise da ação do pólen transgênico em *G. mellonella*, foi realizado um bioensaio, onde foi ofertado como alimento, às lagartas, diferentes substratos alimentares, cuja composição variou no tipo e quantidade de pólen, bem como na presença de matéria orgânica provinda de favo de *A. mellifera* (Tabela 2).

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

Tratamento	Composição
100% Bt	2,50g de pólen de milhoBT + 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>

Os tratamentos (100% Bt); (100% com.); (80% com. + 20% Bt); (100% conv.) e (50% Bt + 50% Conv) foram preparados com cera virgem comprada em estabelecimento comercial destinado à venda de material apícola. 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, neste substrato alimentar, (100% Bt + Favo), foi levado em consideração à presença de outros componentes na dieta de *G. mellonella*, como por exemplo, restos de mecônio, exúvias etc. Esse procedimento foi adotado, para avaliar a influência do pólen transgênico, em *G. mellonella*, tendo também em sua alimentação, componentes que naturalmente fazem parte da dieta da espécie em condições naturais.

Para a montagem deste tratamento, foi pesado 20 g de favo utilizado por *A. mellifera*, obtido em apiário, sendo esta quantidade que cada placa de Petri recebeu. Posteriormente, essas placas, devidamente forradas com papel antiaderente, foram submetidas à autoclave por 10 minutos (Figura 8), a uma temperatura de 70 °C. Esse procedimento foi adotado para obter-se uma placa de cera homogênea (Figura 9), contendo a matéria orgânica presente nas colméias, e também para eliminar ovos *G. mellonella* que eventualmente poderiam estar presente neste material.



Figura 8. Derretimento de favos utilizados por *Appis mellifera* em autoclave. Vairão, PT, 2009.



Figura 9. Favo de *Apis mellifera* derretido em autoclave. Vairão, PT, 2009.

Todos os tratamentos receberam 2,5 g de pólen, nas proporções descritas na tabela 1, juntamente com a cera ou favo. Para isso o pólen foi pesado e adicionado nas placas, já com a cera ou favo derretido, e posteriormente ofertado às lagartas.

Para a execução do delineamento experimental, não foram utilizadas lagartas neonatas. Desta forma, após coleta dos ovos no laboratório, separou-se grupos destes, para que assim que ocorresse a eclosão, larvas neonatas fossem criadas por um período nove dias, antes de serem individualizadas nas placas de Petri. Esse procedimento foi adotado porque as larvas recém eclodidas são muito sensíveis, optando-se, desta forma, por lagartas de nove dias de idade para o início das avaliações, mais resistentes, inclusive à manipulação.

Os tratamentos foram compostos por trinta lagartas cada, individualizadas nas placas de Petri, dispostas em blocos inteiramente casualizados. No total foram seis tratamentos (Tabela 2), totalizando 180 lagartas. Para simulação das condições de campo, onde as larvas ocorrem naturalmente (interior de colméias), as mesmas permaneceram em ambiente com luminosidade reduzida (Figura 10), durante o período de avaliação. Diariamente foram realizadas observações no sentido de registrar os parâmetros biológicos do inseto, pela anotação em planilha, das datas de ocorrência dos mesmos.



Figura 10. Câmara de criação das lagartas de *Galleria mellonella* em ambiente com luminosidade reduzida artificialmente. Vairão, PT, 2009.

Os parâmetros observados foram: mortalidade larval, duração do período de pré-pupa, pupa e longevidade do adulto. O peso das pupas também foi obtido utilizando balança de precisão de quatro casas decimais. Nesta espécie considerou-se o período de pré-pupa, a fase em que a lagarta permanecia em uma estrutura de fios de seda, confeccionada pela larva, e lá não se alimentava ou mesmo não se locomovia, pois as extremidades deste abrigo permaneciam vedadas.

A longevidade do adulto foi obtida utilizando-se gaiolas entomológicas confeccionadas com material reciclável, que também permaneceram em ambiente sem luminosidade (Figura 11). As pupas foram acondicionadas no interior destas e as datas da emergência e morte dos adultos foram registradas em planilha.



Figura 11. Gaiolas entomológicas para criação de adultos de *Galleria mellonella* dispostas em ambiente com luminosidade reduzida artificialmente. Vairão, PT, 2009.

De posse destes dados, calculou-se em dias, o período larval, de pré-pupa, pupa e o ciclo de vida, que é a fase compreendida da eclosão à morte do adulto.

Os dados percentuais, e os referentes a duração das fases, foram processados no programa estatístico BioEstat versão 4.0. A normalidade dos dados foi conferida pelo teste de Lillifors, e quando normais, aplicou-se o teste de Tukey a 5% de significância, do contrário utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis também a 5% de significância para análise das variâncias. Valores absolutos, como os utilizados nos cálculos percentuais, foram comparados pelo teste de Qui-quadrado a 5% de significância.

3.4. Extração e quantificação de proteínas em pólen convencional e transgênico.

3.4.1 Extração de proteínas.

Foi pesado 0,50 g de pólen de milho transgênico e convencional. Em almofariz, cada pólen foi homogeneizado utilizando-se areia de quartzo, 2% de PVP e 5 ml de PBS, sendo o procedimento realizado em gelo.

O conteúdo foi transferido para Becker de 25 ml e colocado em agitação por 2 horas, em ambiente refrigerado a 4°C. Após esse procedimento, a solução foi coada em três camadas de gaze e o conteúdo foi centrifugado a 4°C, por 45 minutos em 13.000 rpm. O sobrenadante foi filtrado com o auxílio de uma seringa e um filtro de membrana de 0,45 µm HA (Milipore), novamente o conteúdo foi centrifugado nas mesmas condições descritas acima.

3.4.2 Quantificação de proteínas.

Utilizou-se o método de quantificação espectrofotométrica de proteínas, presentes nos extratos polínicos, usando reagente colorimétrico de Coomassie. Na cubeta, usada para determinação da absorbância das amostras, adicionou-se 33 ul do extrato e 990 ul de reagente de Coomassie. Para quantificação, foi usado um controle (branco) em que o extrato foi substituído por PBS. Após 10 minutos, em obscuridade, procedeu-se à leitura dos valores de absorbância no espectrofotômetro Graphicord UV-240, a 595 nm.

3.5 Detecção do gene Cry1Ab por reação em PCR.

Para confirmação da presença do gene que expressa a proteína Cry1Ab, no pólen da cultivar transgênica, procedeu-se à análise em reação de PCR com o DNA genômico total extraído deste material. Esse mesmo processo foi feito com o DNA genômico extraído do pólen convencional, para averiguação de uma possível contaminação gênica neste material. Esse processo foi realizado conforme a norma ISO 21569, (2005), no laboratório de Bromatologia da Universidade do Porto, utilizando os parâmetros descritos a seguir:

3.5.1 Extração de DNA

O DNA genômico total do pólen foi extraído utilizando o kit Wizard ou CTAB conforme instruções do fabricante. As extrações foram realizadas em duplicata. A concentração, bem como a pureza dos extratos foram estimadas por espectrofotometria UV. Os extratos de DNA foram diluídos em concentrações apropriadas para análise por PCR. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) por 60 min a 120 V, corado com brometo de etídio (0,4 mg / mL para 5 min) em água destilada por 30 min. O gel de agarose, que mostra o resultado da amplificação, foi visualizado sob luz UV e uma imagem foi obtida com uma máquina fotográfica digital. Cada extrato foi amplificado de forma duplicada.

3.5.2 Primers e parâmetros utilizados na reação por PCR para detecção do evento MON810 (ISO 21569, 2005).

Primers utilizados para detecção de MON 810 (promotor CaMV 35S)

Forward primer

VW01: 5'-TCg AAg gAC gAA ggA CTC TAA Cg-3'.
(Acesso no GenBank® N° V00141)

Reverse primer

VW03: 5'-TCC ATC TTT ggg ACC ACT Gtc g-3'.
(Acesso no GenBank® N° V00141)

Tabela 2. Reagentes e concentrações utilizados na reação em PCR para detecção do promotor (CaMV 35S) do gene de resistência a insetos expresso no milho MON 810.

Reagente	Concentração final	Volume por amostra (µl)
Amostra de DNA	10 ng para 50 ng	2
Água		15,8
10 X pcr (sem MgCl ₂)	1x	2,5
MgCl ₂ solução, 25 mmol/L	1,5 mmol/L	1,5
solução dNTP, 10 mmol/L	0,4 µmol/L	1,0
Primer VW01, 10 µl/L	0,5 µmol/L	1
Primer VW03, 10 µl/L	0,5 µmol/L	1
Taq Polimerase, 5 IU/µL	1 IU	0,2

Tabela 3. Programa de temperaturas e tempos, utilizados no termociclador, para amplificação do promotor (CaMV 35S) do gene de resistência a insetos expresso no milho MON 810.

Desnaturação	5 min. 95 °C
Amplificação	30s/95 °C
	30s/64 °C
	30s/72 °C
Número de ciclos	40
Final	5' min./72 °C

Primers utilizados para detecção do gene da Invertase do milho.

Forward primer

IVR1-F: 5'-CCg CTg TAT CAC AAg ggC Tgg TAC C-3'
(Acesso no GenBank[®]N°U16123)

Reverse primer

IVR1-R: 5'-ggA Gcc CgT gTA gAg CAT gAC gAT C-3'
(Acesso no GenBank[®]N°U16123)

Tabela 4. Reagentes utilizados na reação em PCR para detecção do gene da invertase do milho.

Reagente	Concentração final	Volume por amostra (µl)
Amostra de DNA	10 ng para 50 ng	2
Água		14,8
10 X pcr (sem MgCl ₂)	1x	2,5
MgCl ₂ solução, 25 mmol/L	1,5 mmol/L	1,5
solução dNTP, 10 mmol/L	0,4 µmol/L	2,0
Primer IVR1-F, 10 µl/L	0,5 µmol/L	1
Primer IVR1-R, 10 µl/L	0,5 µmol/L	1
Taq Polimerase, 5 IU/µL	1 IU	0,2

Tabela 5. Programa de temperaturas e tempos, utilizados no termociclador, para amplificação do gene da invertase do milho.

Desnaturação	5 min. 95 °C
Amplificação	30s/95 °C
	1min/64 °C
	60s/72 °C
Número de ciclos	35
Final	5' min./72 °C

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1 Perfil de proteínas do milho convencional e transgênico

A quantificação de proteínas nos extratos polínicos, transgênico (Bt) e convencional (conv), revelou diferenças no padrão polipeptídico, compreendidas entre os pesos moleculares 75 a 100 kDa. Essa diferença é indicada pela seta vermelha na Figura 12. Contudo, com esse tipo de análise não se pode afirmar com segurança que essa constatação seja atribuída à presença da proteína Cry1Ab, expressa no pólen do milho transgênico avaliado neste trabalho.

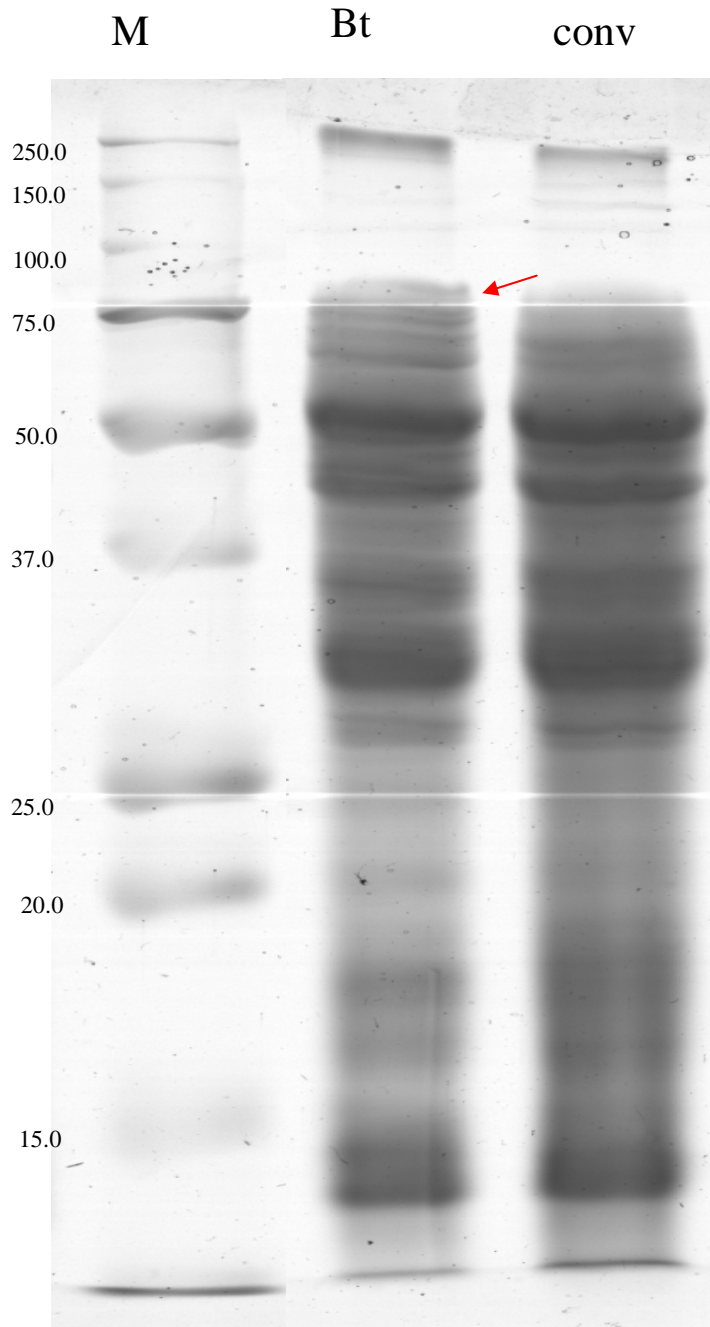
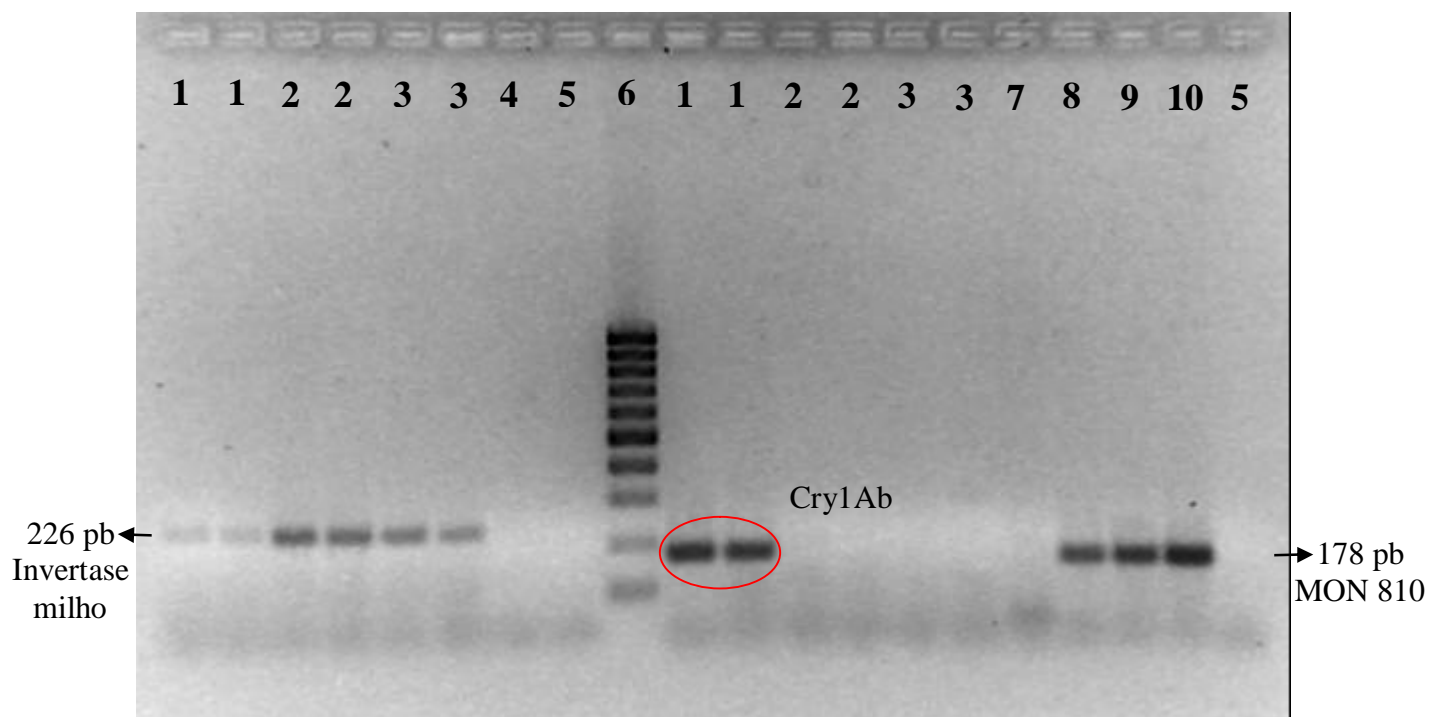


Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida dos polipeptídicos presentes nos extratos polínicos de planta de milho transgênico (Bt) e convencional (conv). M – Marcador. Porto, PT, 2009.

No entanto, as evidências aqui observadas, corroboram com os dados fornecidos pela empresa Monsanto, inventora da tecnologia de plantas transgênicas que expressam a proteína Bt. A empresa relata que a proteína nativa Cry1Ab tem peso molecular de 131 Kd, enquanto que a proteína expressa na planta pelo gene cry1Ab tem um peso molecular de 91 Kd, peso semelhante a da proteína evidenciada no gel de poliacrilamida na Figura 12 (seta).

4.2 Detecção do gene Cry1Ab, evento MON810, em pólen de milho transgênico.

A análise de eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR, obtidos com os extratos genômicos totais dos pólenes do milho transgênico e convencional, revelou a presença do gene Cry1Ab (MON 810), expresso pelo sinal positivo na posição 178 pb, para as amostras de pólen transgênico. Já nas amostras providas de pólen convencional, não foi detectada a presença do gene Cry1Ab (Figura 13).



- 1- Pólen provindo de planta geneticamente modificada,
- 2- Pólen provindo de planta não modificada geneticamente (Localidade: Macieira de Rates)
- 3- Pólen provindo de planta não modificada geneticamente (Localidade: Castelo do Neiva)
- 4- Branco de extração
- 5- Controle negativo
- 6- Marcador peso molecular
- 7- Material de referência (0% MON 810)
- 8- Material de referência (0,1 % MON 810)
- 9- Material de referência (1% MON 810)
- 10- Material de referência (5% MON 810)

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR para a detecção molecular do evento específico do milho MON810 . Porto, PT, 2009.

Iniciadores da invertase foram usados como controle interno para a amplificação de genes endógenos do milho. Desta forma, foi amplificado fragmento com 226 pb em todos os produtos de PCR, convencional e transgênico (Figura 13).

O fato de não ter sido amplificado o gene Cry1Ab para o pólen convencional, evidencia que as amostras, obtidas no campo, não estavam contaminadas bem como, pela amplificação deste gene, em amostras transgênicas, afasta a suspeita de que o material coletado poderia não ser geneticamente modificado, o que poderia comprometer ensaio biológico com *G. mellonella*.

4.3 Análise da influência do pólen Bt em *G. mellonella*

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 com apenas pólen de milho Bt (pólen Bt 100%) ou com 50% desse pólen + 50% de pólen convencional (pólen 50% Bt; 50% conv.) ou com apenas pólen de milho convencional (pólen 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 6. Duração média (\pm DP), 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. FCUP-Portugal, 2009.

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.	$55,90 \pm 16$ ab	$8,21 \pm 14$ ab	$14,62 \pm 4$ 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

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste Kruskal-Wallis ($P < 0,05$)

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 etc, 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.

Todos os alimentos utilizados que continham cera virgem e pólen comercial, proporcionaram uma duração do período larval inferior aos valores observados nos tratamentos compostos com cera virgem e pólen de milho, transgênico ou convencional (Tabela 2). Esta observação corrobora a hipótese de que unicamente o material provindo do milho, em qualquer um dos genótipos avaliados, não se trata de alimento adequado ao desenvolvimento larval de *G. mellonella*.

Dessa forma o alimento composto com 80% de pólen comercial proporcionou o registro da menor duração da fase larval de *G. mellonella*, 25,8 dias, mesmo com a presença de pequena quantidade de pólen Bt. Já os indivíduos que foram alimentados com cera virgem (100% comercial), atingiram um período larval médio de 40,20 dias, superior apenas ao valor observado em indivíduos cuja a dieta continha favo de *A. mellifera* na sua composição (Tabela 2). Assim pode-se inferir que o pólen comercial se trata de um alimento mais balanceado nutricionalmente em comparação com o pólen unicamente de milho, no que se refere a nutrição de *G. mellonella*.

Foi observado que no interior das placas de Petri as larvas construíam 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 Petri, 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 Kruskal-Wallis 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).

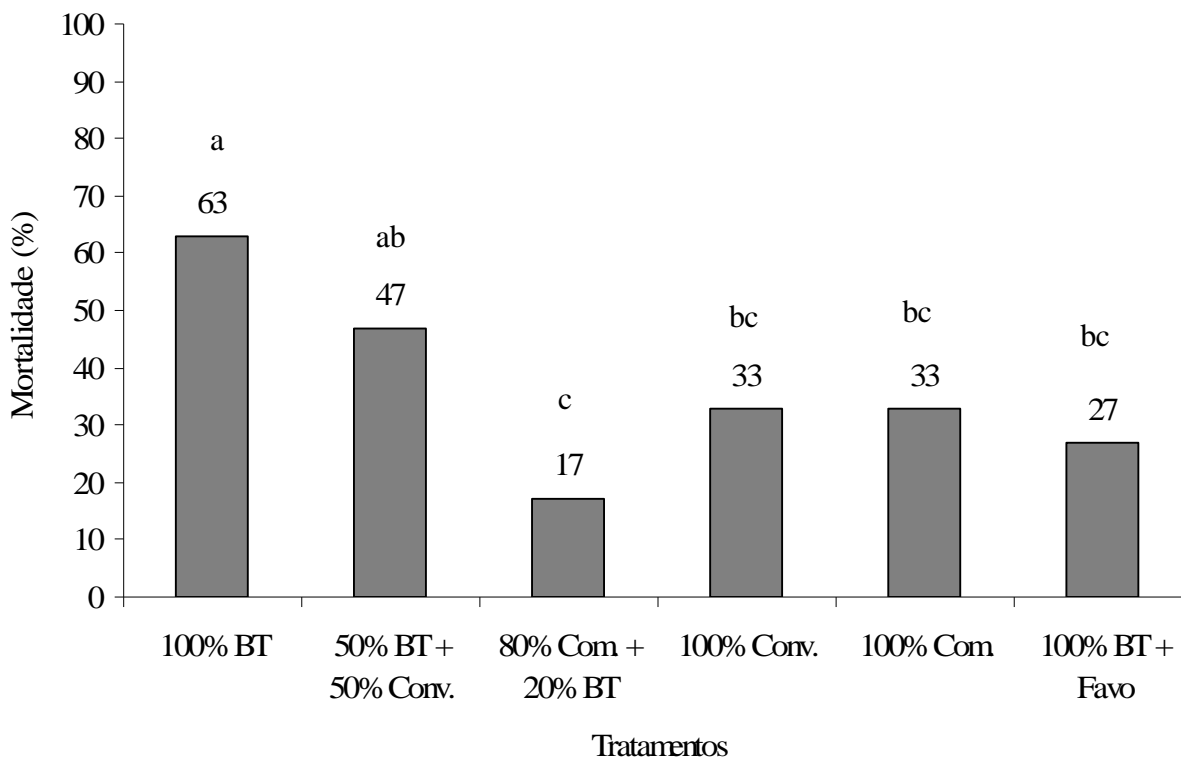
Tabela 7. Peso médio (\pm DP), em gramas, largura e comprimento médio (\pm DP), em cm, de pupas de *G. mellonella* providas de lagartas alimentadas com pólen de milho convencional (conv.), transgênico (Bt), comercial (com) em diferentes proporções. FCUP-Portugal, 2009.

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

Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (peso) e Kruskal-Wallis (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 14).



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

Figura 14. Mortalidade larval percentual de *G. mellonella* alimentadas com pólen de milho convencional (conv.), transgênico (Bt), comercial (com.) em diferentes proporções. Vairão, PT, 2009.

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 ao 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. Não se sabe 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* (Figura 15).



Figura 15. *Apis mellifera* visitando panícula de *Zea mays* (milho). Macieira de Rates, PT 2009.

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*, em Ribeirão-Preto-SP, foi 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).

Quanto à viabilidade pupal, em quase todos os alimentos que continham em sua composição pólen de milho, em qualquer genótipo e proporção, foi registrado percentuais de inviabilidade, exceto no substrato 50% Bt + 50% conv. Isso sugere, que o pólen do milho pode ter influência sobre essa fase, mesmo no alimento a base de pólen Bt + favo de *A. mellifera*, onde foi obtido o registro de menor viabilidade pupal (60%) (Figura 16). O que leva a entender que mesmo em um substrato alimentar mais rico, o pólen do milho pode influenciar na viabilidade das pupas de *G. mellonella*. O alimento composto por 100% de pólen comercial, foi alimento que propiciou pupas totalmente viáveis (Figura 16).

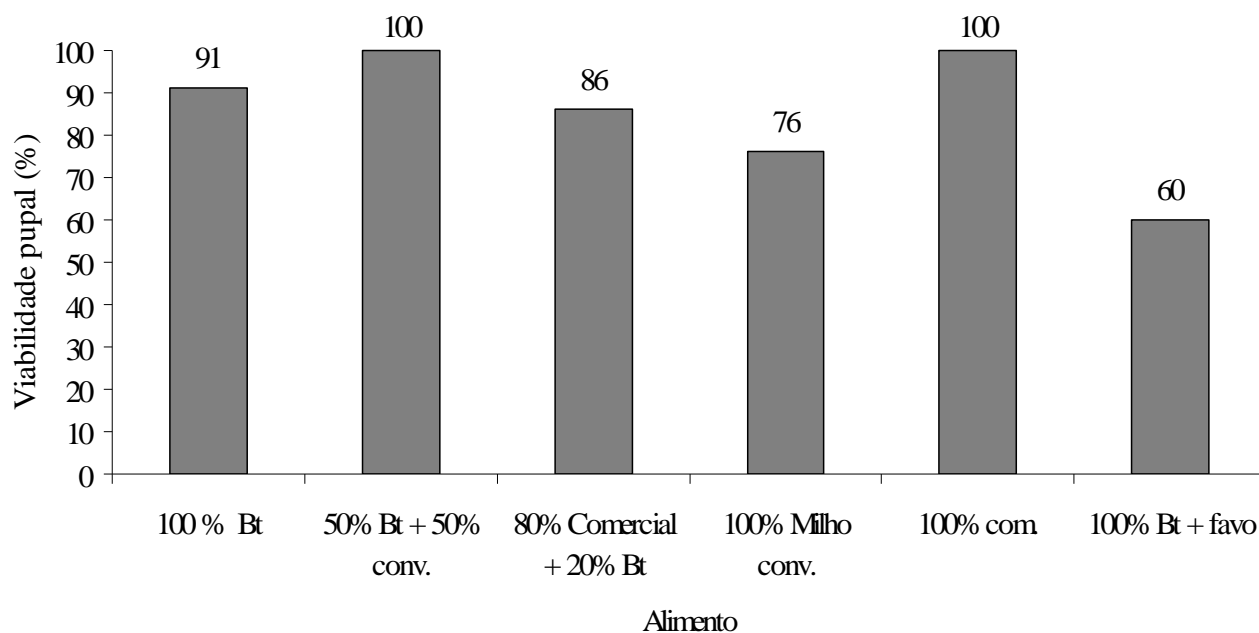


Figura 16. Viabilidade pupal de *G. mellonella* alimentada na fase larval com pólen de milho convencional (conv.), transgênico (Bt), comercial (com.) em diferentes proporções. Vairão, PT, 2009.

Quanto ao percentual de lagartas que atingiram a fase adulta, este foi menor no tratamento em que os indivíduos foram alimentados com cera virgem (100% Bt) (Figura 17), isso devido, principalmente a mortalidade larval superior, em relação aos outros alimentos.

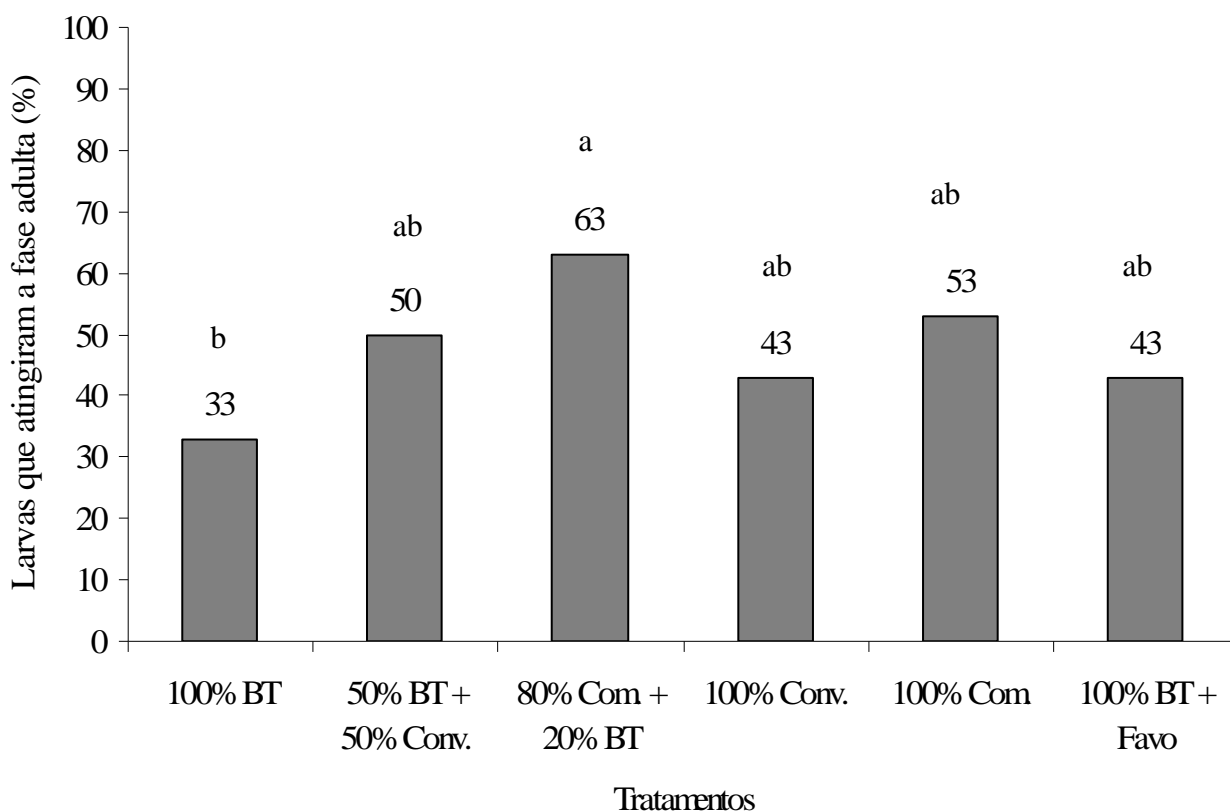


Figura 17. Percentual de larvas de *G. mellonella* que atingiram a fase adulta alimentadas com pólen de milho convencional (conv.), transgênico (Bt), comercial (com.) em diferentes proporções. Vairão, PT, 2009

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), 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, o que não foi realizado até o momento.

5. CONCLUSÕES

- O pólen do milho transgênico que expressa a proteína Cry1Ab, ocasionou mortalidade larval estatisticamente significativa em larvas de *Galleria mellonella* quando ofertado com cera virgem. No entanto quando oferecido junto com favo de *Apis mellifera* a mortalidade não foi estatisticamente significativa.
- O pólen do milho, em qualquer genótipo, como alimento retardou o desenvolvimento larval de *Galleria mellonella* e quando ofertado às larvas de *Galleria mellonella*, associado a cera virgem, originou pupas menos largas e compridas, em relação a uma mistura de pólenes variados e cera virgem.

- O favo de *Apis mellifera* adicionado ao pólen Bt, é substrato alimentar à *Galleria mellonella* que originou 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 vegetal.

2. CONCLUSÕES GERAIS

- As folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato, sem tratamento químico, como alimento de larvas de *Urbanus acawoios*, influenciam na duração da fase larval, de pré-pupa, período de pupal e longevidade do adulto.

- A soja transgênica resistente a herbicida, quando tratada à campo com formulações de glifosato a base de sal de isopropilamina e sal de amônio, e suas folhas oferecidas como alimento à *Urbanus acawoios*, não influencia na duração da fase larval, de pré-pupa, período de pupal e longevidade do adulto.

- Folhas de soja transgênica resistente ao herbicida, tratadas e não tratadas com glifosato à campo, quando oferecidas a *Urbanus acawoios*, aumentam a mortalidade larval.

- As folhas de soja transgênica resistente ao herbicida glifosato, tratada e não tratada com glifosato, quando alimento de larvas, diminuem a população de *Urbanus acawoios*.

- A soja transgênica resistente a herbicida, tratada e não tratada com glifosato, diminui a viabilidade pupal de *Urbanus acawoios*, quando suas folhas são oferecidas como alimento às larvas.

- Folhas de soja transgênica resistente ao glifosato, tratada e não tratada com formulações de glifosato, quando oferecidas à *Urbanus acawoios*, reduzem o índice de desenvolvimento.

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

- O pólen do milho, em qualquer genótipo, como alimento retardou o desenvolvimento larval de *Galleria mellonella* e quando ofertado às larvas de *Galleria mellonella*, associado a cera virgem, originou pupas menos largas e compridas, em relação a uma mistura de pólenes variados e cera virgem.

- O favo de *Apis mellifera* adicionado ao pólen Bt, é substrato alimentar à *Galleria mellonella* que originou 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 vegetal.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O efeito da alteração do balanço nutricional em soja transgênica resistente ao glifosato, evidenciado por pesquisas, pode ser fator que promova influências na relação inseto/planta, principalmente em aspectos tróficos. Sendo assim, a discussão realizada neste trabalho sinaliza hipóteses nesse sentido, no entanto carecem de pesquisas complementares para real comprovação.

Os resultados observados em laboratório sobre a influência do pólen do milho transgênico que expressa a proteína Cry1Ab sobre *Galleria mellonella*, sugerem que a afecção a campo deste piralídeo, é improvável para este evento transgênico.

Entretanto, sabe-se que *Galleria mellonella* é susceptível à Cry1f e Cry9Aa, e havendo plantas transgênicas que expressam essas proteínas, torna-se altamente relevante avaliar os parâmetros investigados neste experimento com essas outras proteínas transgênicas, bem como todas as que estão sendo veiculadas no meio ambiente, através do cultivo comercial desses vegetais. Estudos de campo para uma avaliação mais efetiva desta questão, também são sugeridos como necessários.

Ainda, todas as hipóteses levantadas neste trabalho para *Galleria mellonella*, também são factíveis de serem investigadas em *Achroia grisella*, já que ambas ocupam o mesmo nicho ecológico, e até a presente data nenhuma pesquisa sobre esse assunto foi realizada com esta espécie.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agroconsult, Resultado do Rally da Safra 2009. Disponível <<http://www.rallydasafra.com.br/rally2009/contato/resultados.pdf>> Acesso em: 11 outubro de 2009.

ANDOW, D.A.; HILBECK, A. Science-based risk assessment for nontarget effects of transgenic crops. **BioScience**, v. 54, p. 637-649, 2004.

AUERBACH, M.J.; STRONG, D.R. Nutritional ecology of *Heliconia herbivores*: experiments with plant fertilization and alternative hosts. **Ecological Monographs**, v. 51, p. 63-83, 1981.

BAGLA, P. Hardy Cotton-Munching Pests Are Latest Blow to GM Crops. **Science**. v. 327. n. 5972, p. 1439, 2010.

BATISTA, E. S. P.; REIS E. S.; MARTINS-NETO, R. G. Efeito do tempo de resfriamento de ovos de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) sobre a eclodibilidade das lagartas. IN: VIII CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL. 2007, Caxambu. **Anais...** Minas Gerais: SEB, 2007. p. 1-2.

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**. v.33, n.5, p. 843-850, 2003.

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**. 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**. v. 29, n. 1, p. 60-68. 2005.

BRONDANI, D.; GUEDESI, J. V. C.; FARIAS, J. R.; BIGOLIN, M., KARLEC, F.; LOPES, S. J. Ocorrência de insetos na parte aérea da soja em função do manejo de plantas daninhas em cultivar convencional e geneticamente modificada resistente a glyphosate. **Ciência Rural**. v.38, p.2132-2137, 2008

CARDOSO, A. C.; M.; PRATA, C. A.; PREZOTO, J. F. F. Exigências térmicas de estágios imaturos de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). **Neotropical Entomology**. v.36, n.5, p. 657-661, 2007.

CIB, "Estudos de campo avaliam o efeito de plantas transgênicas sobre organismos não-alvo" Disponível <http://www.cib.org.br/pdf/environmentalentomology_final.pdf>, Acesso em: 04 Janeiro de 2010.

CNTBio, comunicado n.º 54, de 29 de setembro de 1998, Publicado no Diário Oficial da União n.º 188 de 01 de outubro de 1998. Disponível <http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0000/326.doc>, Acesso em: 11 Dezembro de 2009.

DUTTON, A.; KLEIN, H.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. **Ecological Entomology**, v.27: 441-448, 2002.

EDWARDS, P. J.; WRATTEN, S. D. **Ecologia das interações entre insetos e plantas**. São Paulo: EDUSP- Editora da Universidade de São Paulo, 1981. 71 p.

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**. v.34, p. 247-297, 1950.

EMBRAPA, 'Desordem do colapso das colônias'. Disponível <<http://www.cpamn.embrapa.br/apicultura/desordemColapso.php>>, Acesso em 09 de janeiro de 2010.

ESTRUCH, J.J.; CAROZZI, N.B.; DESAI, N.; DUCK, N.B.; WARREN, G.W.; KOZIEL, M.G. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**. v.15, p.137-141, 1997.

FIUZA, L.M., NIELSEN-LEROUX, C.; GOZE, E.; FRUTOS, R.; CHARLES, J. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae): evidence of shared binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**. v.62, n.5, p.1544-1549, 1996.

FRANCHINI, J.C.; BABUJIA, L. C.; PEREIRA, A. S.; SOUZA, R. A.; HUNGRIA, M. Estado nutricional de soja transgênica e não-transgênica, com os respectivos manejos associados ao uso dessas cultivares. In: FERTBIO, 2008, Londrina. **Anais...** CD-ROOM.

FRIZZAS, M. R.; CUNHA, U. S.; MACEDO, L. P. M. Plantas transgênicas resistentes a insetos. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 10, n. 1, p. 13-18, 2004.

GIOLO, F.P.; GRÜTZMACHER, A.D.; PROCÓPIO, S.O.; MANZONI, C.G.; LIMA, C.A.B.; NÖRNBERG, S.D. Seletividade de formulações de glyphosate a *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Planta daninha**. v.23, n.3, p. 458-462, 2005.

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

HARWOOD, J., WALLIN, W., OBRYCKI, J. Uptake of Bt endotoxins by nontarget herbivores and higher order arthropod predators: molecular evidence from a transgenic corn agroecosystem. **Molecular Ecology**. v. 14, p. 2815-2823, 2005.

HILBECK, A.; BAUMGARTNER, M.; FRIED, P.; BIGLER, F. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **Environmental Entomology**. v. 27, p. 480-487, 1998.

HOLTZ, A. M; OLIVEIRA, H. G; PALLINI, A, Adaptação de *Thyrinteina arnobia* em novo hospedeiro e defesa induzida por herbívoros em eucalipto. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. abr. v.38, no.4, p.453-458, 2003.

ISO 21569 (2005) Foodstuffs – **Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Qualitative nucleic acid based methods**, 1st edn. International Standard ISO 21569. ISO, Geneva.

JACKSON, R. E; PITRE, H.N.(A) Influence of roundup ready soybean production system and glyphosate application on pest and beneficial insects in narrow-row soyben. **Journal of entomological Science**. v. 39, n.1, p. 62-70, 2004.

JAMES, C. Global Status of commercialized Biotech/GM Crops: 2008. **ISAAA Brief**. n. 39. p.28, 2008.

JOUANIN, L.; BONADE-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M.; Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**. v.131, p.1-11, 1998.

JUNIOR, J. L. B. S.; MALERBO-SOUZA, D. T. Frequência dos insetos na polinização e produção de algodão. **Acta Scientiarum Agronomy**. v. 26, n. 4, p. 461-465, 2004.

KAATZ, H. H. Effects of Bt maize pollen on the honeybee. Jena University, **Institute of Nutrition and Environment**. (2005). Disponível em <http://www.gmo-safety.eu/en/safety_science/68.docu.html> Acesso em 10 janeiro de 2010.

KUVSHINOV, V.; KOIVU, K.; KANERVA, A.; PEHU, E. Transgenic crop plants expressing synthetic Cry9aa gene are protected against insect damage. **Plant Science**. v.160, p. 341–353, 2001.

LACERDA, M. C. **Associação de produtos fitossanitários, cultivares transgênicas de soja tolerantes ao glyphosate e organismos não alvo**. Viçosa (s.n) 102 f. Tese (Doutorado em fitotecnia) UFV. IA, 2008.

LACEY, H. **Controvérsia Sobre os Transgênicos: Questões Científicas e Éticas**. Editora Idéias e Letras, 2006, 239 p.

LANG, A., VOJTECH, E. The effects of pollen consumption of transgenic Bt maize on the common swallowtail, *Papilio machaon* L. (Lepidoptera, Papilionidae). **Basic and Applied Ecology**. v. 7, p. 296-306, 2006.

LARA, F. M. Técnicas de pesquisa em Resistência de Plantas. In: **Princípios de Resistência de Plantas a Insetos**. 2 ed. São Paulo: Ícone, 1991. Cap. 6. p. 185-230.

- 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**. v. 62, n. 2, p. 583-586, 1996.
- LOGUERCIO, L. L.; CARNEIRO, N. P.; CARNEIRO, A. A. Milho Bt: Alternativa biotecnológica para o controle biológico de insetos-praga. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. no 24, p. 46-52, 2002.
- LOSEY, J. E. RAYOR, L. S. CARTER, M. E. Transgenic pollen harms monarch larvae. **Nature**. v. 399, p. 214, 1999.
- LOUVEAUX, J.; ALBISETTI, J. Observations préliminaires sur la récolte du pollen par les abeilles dans "les grandes landes" de la forêt Landaise. **Annales Abeille**. v.6, p.229-234, 1963.
- MAAGD, R.A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Sciences**. v.4, p.9-13, 1999.
- MACHADO, M. C. **Biologia comparada de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperiiidae) em *Clitoria fairchildiana*, *Centrosema pubescens*, *Galactia striata* (Leguminosae) e alimentação alternada**. Seropédica (s.n) 88 f. Dissertação (Mestrado em ciências ambientais e florestais) UFRRJ. IF, 2000.
- MANZONI, C. G.; GRÜTZMACHER, A.D.; GIOLO, F.P.; HARTEK, W. R.; MILLER, C. Seletividade de agrotóxicos usados na produção integrada de maçã para adultos de *Trichogramma pretiosum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 41, n. 10, p. 1461-1467, 2006.
- MARTINS, F.; VIEIRA, M. M.; LAVADINHO, A. M. P.; MENDONÇA, T. R. Efeito de milho bt sobre a entomofauna não alvo. **Revista de Ciências Agrárias**. v. 31. p. 29-33, 2007.
- 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**. v.144, p. 714-720, 2004.
- MONNERAT, R.; BRAVO, A. **Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência**. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). Controle biológico. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. v.3, cap.7, p.163-200.
- MONNIG, N.; BRADLEY, K. W. Impact of fall and early spring herbicide applications on insect populations and soil conditions in no-till soybean. **Crop Protection**. v. 26, p. 383-389, 2007.
- MORJAN, W. E.; PEDIGO, L. P. Suitability of Transgenic Glyphosate-Resistant Soybeans to Green Cloverworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of economic entomology**. vol. 95, n. 6, p. 1275-1280, 2002.
- NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection reality and prospects. **Crop Protection**. v.19, p.669- 676, 2000.

NODARI, R. O; GUERRA, M. P. Implicações dos transgênicos na sustentabilidade ambiental e agrícola. **Hist. Cienc. Saúde-Manguinhos**. v. 7 n.2, p.481-91, 2000.

NOGUEIRA, M. D; HABIB, M. E. Biologia e controle microbiano de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperidae): I. Descrição morfológica e aspectos Bioecológicos. **Acta amazônica**. v.32, n.1, p. 123-132, 2002.

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**. v. 8, n.1, p.1-6, 2006.

Notificação B/PT/09/01 para Ensaio de Plantas Superiores Geneticamente Modificadas, nos termos do Decreto-Lei n.º 72/2003. Disponível <http://www.apambiente.pt/Destaques/Documents/Notificacao_B_PT_09_01.pdf>, Acesso em: 08 outubro de 2009.

OBRIST, L., DUTTON, A., ROMEIS, J., BIGLER, F. Biological activity of Cry1Ab toxin expressed by Bt maize following ingestion by herbivorous arthropods and exposure of the predator *Chrysoperla carnea*. **BioControl**. v.51, p. 31-48, 2006.

PADGETTE, S. R. et al. New weed control opportunities: development of glyphosate tolerant soybeans. In: DUKE, S.O. (Ed.). **Herbicide resistant crops**. Boca Raton: CRC, 1995. p.54-80.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J.R.P. A ecologia nutricional e o manejo integrado de pragas. In: **Ecologia Nutricional de Insetos e Suas Implicações no Manejo de Pragas**. 1 ed. São Paulo: Manole, 1991. Cap. 9. p. 313-336.

PEREIRA, J. L; PICANÇO, M. C; SILVA, A, A; PEREIRA, R,R; COUTINHO, D,C. Impacto de glyphosate e endosulfan sobre a densidade de artrópodes do solo na cultura da soja. IN: I simpósio internacional sobre o glyphosate.2007, Botucatu. **Anais...** São Paulo: UNESP, 2007. p. 169-177.

PESSÔA, L. T. G; CARVALHO; D. D; PEREIRA Jr, N. Transgênicos e indicadores ambientais. **Engenharia ambiental**. v. 3, n.2, p. 86-106, 2006.

PINTO, J. M. **Biologia e consumo em sombreiro, *Clitoria fairchildiana*, Feijão, *Phaseolus vulgaris* e soja *Glycine max* (Leguminosae: Faboideae) por *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperidae)**. Seropédica (s.n) 63 f. Tese (Doutorado em fitotecnia) UFRRJ. IA, 2001.

RODRIGUEZ, J.G. Nutrition of the host and reaction to pests. American Association of Advanced Science. v. 61, p. 149-167, 1960.

ROMAN, E, S.; BECKIE, H.; VARGAS, L.; HALL, L.; RIZZARDI, M. A.; WOLF, T. M. **Como funcionam os herbicidas: Da biologia à aplicação**. Editora Berthier, 2007. 158 p.

ROSI-MARSHALL , E. J.; TANK J. L.; ROYER, T. V.; WHILES, M. R; EVANS-WHITE, M.; CHAMBERS, C.; GRIFFITHS, N. A.; POKELSEK, J.; STEPHEN, M. L. Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v. 104, p. 16204–16208 , 2007.

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 colméia** (S.N) 145 F. Tese (Doutorado em ciências agrárias) UP. 2008.

SABUGOSA-MADEIRA, J. B. e ABREU, I. O pólen de milho geneticamente modificado. Implicações no desequilíbrio ecológico das colméias. **Revista Real Academia Galega de Ciências.** 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.** v. 46, p. 57-58, 2007.

SAMPAIO, H. N.; BARROS, M. F. C.; OLIVEIRA, J. V.; LIMA, F. S.; PEDROSA, E. M. R. Efeito de doses de nitrogênio e potássio nas injúrias provocadas por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias.** v.2, n.3, p.219-222, 2007.

SANTOS, J.B.; FERREIRA, E.A.I; REIS, M.R.; SILVA, A.A.; FIALHO, C.M.T.; FREITA, M.A.M. Avaliação de formulações de glyphosate sobre soja Roundup Ready. **Planta daninha.** v.25, n.1, p. 165-171, 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.** v. 40, p. 124-140, 2008.

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

SCHNEPF, E, N.; CRICKMORE, J.; VAN RIE, D.; LERECLUS, J. BAUM, FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology.** v.62, n.3, p.775-806, 1998.

SCHULER, T.H. et al. Potential side effects of insect-resistant transgenic plants on arthropod natural enemies. **Trends in Biotechnology.** v.17, p.210-215, 1999.

SHANER, D.; BRIDGES, D. Inhibitors of aromatic amino acid biosynthesis (glyphosate).In: **Herbicide action course.** West Lafayette: Purdue University, 2003. p. 514-529.

SILVA, E. J. **Preferência alimentar e biologia de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperiiidae) em *Desmodium incanum*, *Galactia striata* e *Clitoria fairchildiana* (Leguminosae).** Seropédica (s.n) 62 f. Dissertação (Mestrado em ciências ambientais e florestais) UFRRJ. IF, 2003.

SILVA, L. K. F. **Aspectos biológicos de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperiiidae) em *Clitoria fairchildiana*, *Centrosema pubescens*, *Glycine max* e *Phaseolus vulgaris* (Leguminosae).** Seropédica (s.n) 103 f. Dissertação (Mestrado em ciências ambientais e florestais) UFRRJ. IF, 1995.

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.**v. 21, p. 11-81, 2004.

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.** v. 83, n. 3, p. 760-765, 1990.

VENTURA, S. R. S. **Biologia comparada de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) alimentado com folíolos de *Clitoria fairchildiana* e *Phaseolus vulgaris* (Leguminosae).** Seropédica (s.n) 50 f. Dissertação (Mestrado em ciências ambientais e florestais) UFRRJ. IF, 2001.

VENTURA, S.R.; CARVALHO, A.G.; ABOUD, A.C.S.; RIBEIRO, R. L. D. Influência das doses de nitrogênio e das coberturas vivas do solo em cultivo orgânico de berinjela, na incidência de *Corythaica cyathicollis* em diferentes períodos do dia. **Biotemas.** v. 20, n.4, p. 59-63, 2007.

VERMA, S. K. Studies on the control of greater wax moth, *Galleria mellonella* L. in *Apis cerana* F. colonies with the biological insecticide, Dipel. **Indian Bee Journal.** v. 57, n. 3, p. 121-123, 1995.

WENDT, J. G. N. **Desenvolvimento e consumo foliar de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperiiidae) em cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. (Leguminosae).** Seropédica (s.n) 47 f. Tese (Doutorado em fitotecnia) UFRRJ. IA, 2004.

WOIWOD, I. P.; SCHULER, T. H. Genetically Modified Crops and Insect Conservation. In: **Insect Conservation Biology: Proceedings of the Royal Entomological Society's 23rd Symposium.** London: CABI, 2007. Cap 17. p. 405-430.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. DE C. **Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas.** Informações agronômicas. IPNI International Plant Nutrition Institute. 2007. 32 p.

YANG, Y. Z.; YU, Y. S.; SHAO, L. R. Y. D; QIAN, K; ZALUCKI, M, P. Possible incompatibility between transgenic cottons and parasitoids. **Australian Journal Entomology.** v. 44. p. 442-445, 2005.

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**. v. 33, n.1, p. 65-70, 2004.