

COMPORTAMENTO HIGIÊNICO EM COLÔNIAS DE ABELHAS AFRICANIZADAS SUBMETIDAS À INGESTÃO DE PÓLENS DE MILHO TRANSGÊNICO E CONVENCIONAL

[*Behavior hygienic in colony of bees africanized submitted to ingestion of transgenic and conventional corn pollens*]

Lucilene de Abreu^{1*}, James Arruda Salomé², Afonso Inácio Orth³

¹ Estudante de doutorado do Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais – PPGRGV – UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

² Biólogo, Dr., Profissional Autônomo SEBRAE – SC.

³ Professor Titular do Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais – PPGRGV –UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

RESUMO – Em *Apis mellifera* as próprias abelhas realizam um controle biológico da colônia contra agentes infecciosos causadores de doenças de crias, evitando assim a necessidade do uso de produtos químicos, e que a doença seja transmitida para toda a colônia. Fatores externos, como a qualidade do alimento podem influenciar a frequência do comportamento higiênico (CH). O pólen é um alimento importante para as larvas e abelhas jovens após a emergência. Enquanto são alimentados com pólen, ocorre o desenvolvimento de estruturas fisiológicas envolvidas no olfato e performances de aprendizagem, portanto, os efeitos do pólen contendo proteínas transgênicas (PTs) merecem atenção. Objetivou-se avaliar o CH em colmeias submetidas à ingestão de pólen de milho transgênico e convencional. As dietas fornecidas as abelhas constituíram-se dos tratamentos: pólen de milho convencional; pólen de milho transgênico expressando as PTs Cry1A.105 e Cry2Ab2; pólen de milho transgênico expressando as PTs Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4-EPSPS; dieta sem pólen de milho e dieta controle. Perfurou-se uma área com 100 células, e uma área vizinha foi delimitada para constituir o controle. Após 24 h foi realizada a contagem de células vazias. Os resultados demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos. Todos os tratamentos apresentaram média superior a 80% de CH. Porém, ao longo das avaliações ocorreu uma diminuição gradativa da taxa de CH para os tratamentos que continham PTs. Ainda que os dois tratamentos tenham confirmado CH, esta diminuição pode ser indicativo de efeitos subletais do pólen de milho transgênico sobre o CH das colmeias.

Palavras-Chave: *Apis mellifera*; proteínas transgênicas; limpeza das colmeias.

ABSTRACT – *Apis mellifera* in the bees themselves perform a biological control colony against infectious agents causing diseases of pups, thus avoiding the need of using chemicals, and the disease to be transmitted to the entire colony. External factors such as the quality of food can influence the frequency of hygienic behavior (CH). Pollen is an important food for the larvae and young bees after emergence. While are fed with pollen, the development occurs physiological structures involved in olfactory learning and performance, so the effects of pollen containing transgenic proteins (PTs) deserve attention. Aimed to evaluate the CH in hives who ingested transgenic and conventional maize pollen. The diets provided the bees were constituted the treatments: conventional corn pollen; GM maize pollen expressing PTs Cry1A.105 and Cry2Ab2; GM maize pollen expressing PTs Cry1A.105, Cry2Ab2 and CP4-EPSPS; diet without corn pollen and diet control. An area 100 cells are pierced, and a neighboring area was defined to be the control. After 24 h was performed empty cell count. The results demonstrated significant differences between treatments. All treatments showed average of more than 80% of CH. But along the evaluations occurred a gradual decrease in the CH rate for treatments containing PTs. Although both treatments have confirmed CH, this decrease may be indicative of sub-lethal effects of transgenic corn pollen on the CH hive.

Keywords: *Apis mellifera*; transgenic proteins; cleaning of the hives.

*Autor para correspondência: E-mail: labreu@unochapeco.edu.br

INTRODUÇÃO

Em *Apis mellifera* o comportamento higiênico é caracterizado pela identificação e remoção de crias doentes, mortas, parasitadas, danificadas ou infestadas, do interior da colmeia, sendo controlado geneticamente (Gonçalves & Gramacho, 2000; Gramacho & Gonçalves, 2000; Spivak & Reuter, 2001).

A limpeza da colmeia é realizada pelas abelhas que primeiramente detectam as células que possuem crias doentes ou mortas, efetuam o processo de desoperculação das células afetadas e na sequência removem a cria para fora da colmeia antes que o vetor alcance o estágio infeccioso, evitando que a doença seja transmitida para toda a colônia. Deste modo, as próprias abelhas realizam um controle biológico da colônia contra agentes infecciosos causadores de doenças de crias e sem a necessidade do uso de produtos químicos (Wilson-Rich et al., 2009).

O conhecimento sobre o impacto das culturas transgênicas em insetos não alvo como por exemplo, as abelhas, ainda é escasso. Os estudos revelam que a eficiência de plantas geneticamente modificadas para controlar pragas é bem conhecida; no entanto seus efeitos letais e/ou subletais sobre insetos não alvo permanecem em discussão.

Apesar da planta de milho (*Zea mays* L.) não ser considerada uma espécie melífera, pode ser utilizada pelas abelhas como fonte de pólen, especialmente em períodos do ano em que são escassas as plantas em floração, sendo considerada por essa razão um alimento estratégico (Sabugosa-Madeira et al., 2007). O milho é o terceiro cereal mais cultivado no mundo, e é matéria prima para produção de diversos produtos, especialmente na alimentação animal. Estima-se que do total da safra brasileira de milho 2013/14, a área semeada com materiais transgênicos (milhos geneticamente modificados) foi de 12,9 milhões de hectares ou 82% da área total (Céleres, 2014). Esses dados parecem ser reveladores da exposição que as abelhas estão sendo submetidas.

O pólen é um alimento importante para as larvas e abelhas jovens após a emergência. Enquanto as larvas ou jovens adultos de abelhas são alimentados com pólen, ocorre o desenvolvimento de estruturas fisiológicas envolvidas no olfato e performances de aprendizagem (Masson & Arnold (1984), Masson et al., 1993), portanto, os efeitos das proteínas transgênicas sobre estes processos merecem atenção.

Diante da problemática exposta, o presente estudo buscou avaliar o comportamento higiênico em

colônias de abelhas africanizadas submetidas à ingestão de pólen de milho transgênico e convencional.

MATERIAL E MÉTODOS

A semeadura e coleta dos grãos de pólen de plantas de milho foi alocada na Fazenda da Ressacada – área sob responsabilidade do Centro de Ciências Agrárias (CCA) pertencente a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), localizada na Ilha de Santa Catarina, Bairro da Tapera, ao Sul da Ilha com base nas coordenadas geográficas 27° 41' 06.28" S; 48°32'38.1" O, no município de Florianópolis – SC. Efetuou-se em outubro de 2012, fevereiro de 2013 e março de 2014, o preparo e semeadura da área, objetivando a coleta de grãos de pólen.

O experimento foi instalado em uma área de 800 m² (40 x 20 m), contando com 18 linhas de 40 metros, com espaçamento de 80 cm entre linhas e 20 cm entre plantas (cinco plantas por metro linear), totalizando 62.500 plantas por hectare. As sementes foram semeadas com semeadora adubadora tratorizada. A adubação foi feita com adubo químico NPK (5-20-20) no ato da semeadura. Durante o experimento, não foi utilizado qualquer tipo de manejo fitossanitário.

Utilizou-se sementes dos híbridos comerciais de milho com tecnologia VT PRO e VT PRO2 (EVENTOS MON89034; MON89034 x NK603, respectivamente), que expressam as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 (VT PRO) e Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4-EPSPS (VT PRO2), e a respectiva linha isogênica. As linhas foram integralmente consideradas como área útil para efeito de coleta dos grãos de pólen.

Quando iniciado os procedimentos de coleta de pólen, as inflorescências masculinas (pendões) foram ensacadas com sacos de papel branco encerados no lado interno, e foram fechados na base do pendão com o auxílio de arames, para assim proceder à coleta do pólen.

A cada dois dias de plantas ensacadas, realizou-se a coleta dos sacos de papel, com uso de tesoura, cortando-se a base do pendão e estes eram levados ao Laboratório de Entomologia Agrícola (CCA – UFSC). Os pendões ensacados foram submetidos a secagem em estufa, a uma temperatura de 25° C, durante um período de 2 dias.

Após secas, as panículas foram cortadas em fragmentos de até 5 cm, e depositadas em uma máquina processadora de solos, com jogo de quatro peneiras, sendo a última com malha de 90 micrômetros. Ao final o pólen depositado sob a

última peneira era coletado em tubos plásticos de 50 ml.

Buscando-se verificar a presença das proteínas no pólen e verificar se a amostra da respectiva linha isogênica estava contaminada ou não por proteína Cry foram utilizadas tiras do kit QuickStix da empresa Envirologix para detecção de proteína Cry1A.105.

Separou-se 10 g de pólen de cada amostra, sendo estas maceradas em cadinho de porcelana com auxílio de um pistilo em 100 ml de água destilada. As amostras foram agitadas em vortex por 10 segundos e deixadas em repouso por 1 min. Em seguida foi colocada uma tira por amostra de pólen, realizando a interpretação após 5 min.

Vinte núcleos com *A. Mellifera*, contendo quatro quadros, foram produzidos no município de Santo Amaro da Imperatriz – SC, por apicultores da região e transportados em dezembro de 2012 à Cidade das Abelhas, localizada em Florianópolis – SC, pertencente a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A Cidade das Abelhas está localizada no bairro denominado Saco Grande, no município de Florianópolis – SC. Posteriormente os núcleos foram transferidos para colmeias do tipo Langstroth, sendo inseridos seis favos com cera alveolada para completar os dez favos necessários. Todas as colônias possuíam rainhas emergidas em dezembro de 2012. Após um período de adaptação foram transferidas para os locais definitivos no apiário experimental para a realização dos trabalhos.

As dietas fornecidas as abelhas constituíram-se dos seguintes tratamentos: 1 – Dieta contendo pólen de milho convencional – 70% de xarope de açúcar invertido + 30% pólen de milho convencional; 2 – Dieta contendo pólen de milho transgênico (evento MON89034) – 70% de xarope de açúcar invertido + 30% de pólen de milho que expressam as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2; 3 – Dieta contendo pólen de milho transgênico (evento MON89034 x NK603) – 70% de xarope de açúcar invertido + 30% de pólen de milho que expressam as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4-EPSPS; 4 – Dieta sem pólen de milho – 60% de xarope de açúcar invertido + 20% de proteína texturizada de soja (PTS) + 20% de extrato de levedura de cerveja (ELC); 5 – Dieta Controle – sem fornecimento de alimento artificial, contando apenas com a flora apícola disponível nos arredores do apiário.

O xarope de açúcar invertido (alimentação energética) consistiu dos ingredientes: 5Kg de açúcar cristal; 1,7 L de água e 5g de ácido tartárico. Este preparado foi cozido em fogo e armazenado

em temperatura ambiente, conforme método adaptado de Lengler (2000).

Para a elaboração do tratamento dieta sem pólen de milho, adicionou-se proteína texturizada de soja (PTS) e extrato de levedura de cerveja (ELC), ao xarope invertido previamente preparado. No momento do fornecimento do tratamento adicionou-se 10 gotas de extrato de baunilha, objetivando tornar a dieta atrativa as abelhas.

Para o fornecimento de pólen as colônias, devido a não existência de protocolo experimental, trabalhou-se com base em alguns protocolos que fornecem de 1,5 a 2 mg de pólen para cada larva (Hanley *et al.*, 2003; Hendriksma *et al.*, 2011). Como o alimento não foi fornecido diretamente às larvas, mas coletado pelas abelhas operárias, o estudo foi realizado com a dosagem de 2 mg de pólen por célula de cria. Sabendo-se que cada favo possui 7200 células, determinou-se a quantidade de pólen a ser fornecido por favo através do cálculo: Quantidade de pólen = 7200 (células) x 1 (favo de cria aberta) x 2 (mg de pólen), resultando em 14,40 g de pólen por favo colocado na colmeia.

Devido à inexistência de protocolos para fornecimento de dietas transgênicas em colônias de abelhas, elaborou-se e foi aplicado a seguinte metodologia para fornecimento dos tratamentos as abelhas: I – Seleção de favos com células bem construídas. Estes favos foram armazenados em ambiente refrigerado. Retirados e mantidos em temperatura ambiente vinte e quatro horas antes do momento da utilização; II – Seleção de uma colmeia populosa, com pelo menos sete favos cobertos com abelhas operárias e em bom estado sanitário (Brodschneider & Crailsheim, 2010), sendo esta denominada de “Colônia Provedora”. Durante a condução do experimento utilizou-se cinco colônias provedoras. Estas receberam durante todo o tempo de condução do experimento alimentação *ad libitum* de xarope de açúcar invertido em alimentador de cobertura; III – Abertura da colônia provedora e retirada de favos da área central, para assim, abrir espaço no centro da área de cria. Após esta abertura de espaço, se introduz dois favos com células de cera alveolada selecionados anteriormente. Anota-se a data do procedimento, e calcula-se três dias para que a abelha rainha realize as posturas nestes favos; IV – Após a postura da rainha (quarto dia) procede-se a abertura da colônia provedora e se retira os dois favos com postura, que irão conter ovos de 1, 2 e 3 dias, e larvas de 1 dia; V – Os favos retirados da colônia provedora são colocados em uma nova colônia, denominada “Colônia Receptora”, com as seguintes características: populosa, com pelo menos seis favos cobertos e em bom estado sanitário. Estes favos são colocados no centro da área de cria. Cada

tratamento foi fornecido as abelhas em uma colônia receptora, portanto, foram usadas cinco colônias receptoras até o final da condução do experimento. Acoplada a entrada da colônia receptora foi colocado um coletor de pólen a fim de garantir que as abelhas colem apenas o alimento fornecido, impedindo assim a entrada de pólen externo. Após nove dias da introdução dos favos provenientes das colônias provedoras, retira-se o coletor de pólen das colônias receptoras (com exceção do tratamento denominado dieta controle que não recebe o coletor de pólen), voltando ao uso quando da colocação de novos favos; VI - Os tratamentos fornecidos as abelhas nas colônias receptoras são depositados em alimentador interno, localizado dentro dos ninhos (alimentador Dolittle em plástico injetado), no momento em que recebem os favos provenientes da colônia provedora; VII – Após treze dias, a colônia receptora é aberta e retirado um dos quadros de cria operculada de operárias em fase de pupa de olho rosa.

A avaliação foi realizada conforme metodologia descrita por Newton & Ostasiewski (1986), testado e modificado por Gramacho & Gonçalves (1994). Perfurou-se com o auxílio de um alfinete entomológico número dois, uma área com 100 células (área A). O alfinete entomológico foi introduzido no centro dos opérculos em uma profundidade que permitisse atingir a cria. Uma área vizinha à tratada, contendo cerca de 100 células, foi delimitada para constituir o controle (área B). Cada área foi demarcada utilizando-se uma folha de transparência, em que também foi registrado o número de células operculadas e desoperculadas parcialmente. Após a perfuração, o quadro foi devolvido para a colméia de onde foi retirado e, após 24 h, foi realizada a contagem de células vazias tanto na área A como na B (controle).

A atividade de fornecimento dos tratamentos testados e a determinação do comportamento higiênico aconteceu no período de 18 de outubro de 2013 a 12 de julho de 2014, permitindo a realização de dez avaliações para cada tratamento testado.

Para a determinação do comportamento higiênico entre os diferentes tratamentos testados, foi aplicada a fórmula estabelecida por Gramacho & Gonçalves (1994).

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, como os dados encontrados não apresentaram distribuição normal realizou-se a aplicação do teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Os resultados estatísticos foram avaliados através do software estatístico BioEstat 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso das tiras de detecção da proteína Cry1A.105 confirmou a presença no pólen de milho dos eventos testados, quais sejam: híbridos comerciais de milho com tecnologia VT PRO e VT PRO2 (EVENTOS MON89034; MON89034 x NK603, respectivamente), que expressam as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 (VT PRO) e Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4-EPSPS (VT PRO2). A linha isogênica apresentou resultado negativo, demonstrando que não ocorreram misturas de pólen durante a coleta e/ou processamento das amostras. Estes resultados garantiram confiabilidade nas dietas fornecidas as abelhas.

Conforme se percebe na Tabela 1 todos os tratamentos testados apresentaram média superior a 80% de comportamento higiênico. Os resultados encontrados para comportamento higiênico demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos testados (Kruskal-Wallis, $\alpha = 5\%$).

Tabela 1. Médias de comportamento higiênico (%) de *A. mellifera* submetidas a diferentes dietas. Florianópolis – SC.

| Tratamentos | % CH Média e DP |
|---|------------------------|
| Florada disponível | 94.123 a \pm 0.4837 |
| Proteína texturizada de soja + Extrato de levedura de cerveja | 93.865 a \pm 0.4344 |
| Pólen milho convencional | 93.736 ab \pm 0.1763 |
| Pólen milho evento MON89034 | 89.406 bc \pm 2.6939 |
| Pólen milho evento MON89034 x NK603 | 89.188 c \pm 2.8229 |

Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa segundo o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Todos os tratamentos testados apresentaram média superior a 80% de comportamento higiênico, demonstrando que as colônias submetidas aos tratamentos com diferentes dietas podem ser consideradas higiênicas. Gramacho & Goncalves (1997), citam que colmeias que possuem comportamento higiênico acima de 80% podem ser consideradas higiênicas.

Avaliando-se a percentagem de comportamento higiênico apresentados pelos tratamentos onde se utilizou pólen de milho transgênico (Pólen de milho evento MON89034 e Pólen de milho evento MON89034 x NK603) percebe-se que por ocasião da primeira avaliação encontrou-se os maiores valores de CH para os dois tratamentos, 94,56% e 94,6%, respectivamente (Tabela 2). Porém, ao longo das avaliações observa-se uma diminuição gradativa da taxa de comportamento higiênico para

estes tratamentos. Ainda que os dois tratamentos tenham confirmado CH, verifica-se em termos percentuais uma diminuição de 7,3 % e 7,23% para os tratamentos pólen de milho evento MON89034 e pólen de milho evento MON89034 x NK603, respectivamente, quando comparados a primeira e a última avaliação. No caso do tratamento com pólen de milho não transgênico, ou seja, a linhagem isogênica, não se verifica esta variação nas taxas de CH. Bizzocchi, 2014, encontrou resultados semelhantes trabalhando com fornecimento de dietas a base de pólen de milho *Bt* com proteínas Cry 1F. Segundo o autor, apesar de todas as colônias serem classificadas como higiênicas, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, e as colônias alimentadas com pólen de milho *Bt* manifestaram a menor taxa de CH após o final do fornecimento de alimento proteico artificial.

Tabela 2. Comportamento Higiênico (%) de *A. mellifera* submetidas a diferentes dietas, durante os períodos de outubro de 2013 a julho de 2014. Florianópolis – SC.

| Tratamentos | Períodos de Avaliação | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 2013 | | | | | 2014 | | | | |
| | out | nov | dez | jan | fev | mar | abr | mai | jun | jul |
| Pólen milho convencional | 94.2 | 93.8 | 93.6 | 93.7 | 93.7 | 93.7 | 93.6 | 93.7 | 93.6 | 93.6 |
| Pólen milho evento MON89034 | 94.5 | 92.4 | 92.2 | 88.7 | 88.5 | 88.7 | 87.3 | 87.4 | 87.6 | 86.4 |
| Pólen milho evento MON89034xNK603 | 94.6 | 92.7 | 92.2 | 87.3 | 87.7 | 87.5 | 87.2 | 87.5 | 87.5 | 87.3 |
| PTS + ELC* | 94.6 | 93.5 | 93.5 | 94.7 | 93.8 | 93.6 | 93.7 | 93.6 | 93.7 | 93.7 |
| Florada disponível | 94.5 | 94.4 | 94.4 | 93.8 | 94.8 | 94.7 | 93.7 | 93.6 | 93.5 | 93.7 |

*PTS + ELC – Proteína texturizada de soja mais extrato de levedura de cerveja.

Esta informação pode ser indicativo de efeitos subletais do pólen de milho transgênico sobre o comportamento higiênico das colônias. Assumindo-se que a composição centesimal dos eventos geneticamente modificados testados no experimento eram equivalentes a da linha isogênica, pode-se aventar a hipótese de que efeitos subletais causados pela ação tóxica das proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e CP4-EPSPS sobre as abelhas foram responsáveis pelas menores taxas de comportamento higiênico, quando comparado aos tratamentos que não possuíam estas proteínas. Também no parecer técnico de liberação do milho MON 89034 (CTNBio, Parecer 2052/2009) não foram encontradas informações se foram realizados experimentos que comprovem que estas proteínas Cry (Cry1A.105, Cry2Ab2) e CP4-EPSPS não provocam impactos sobre a sanidade de *A. mellifera*.

Os resultados alcançados neste trabalho podem contribuir para elucidação dos riscos dos OGM's sobre insetos não alvos, pois como verificado por Kaiser *et al.* (2001); Prasifka *et al.*, (2007); Ludy & Lang (2006); Lang & Vojtech (2006); poucos estudos têm investigado os efeitos subletais de

proteína *Bt* sobre os mesmos. Os efeitos subletais da proteína Cry podem em longo prazo prejudicar a sanidade das colônias já que envolvem a redução do CH, mecanismo importante de defesa das abelhas contra pragas e doenças, que quando reduzido torna as abelhas mais vulneráveis ao ataque destas, podendo levar as abelhas a morte.

CONCLUSÕES

Todas as colônias avaliadas apresentaram média superior a 80% de comportamento higiênico, demonstrando que as colônias submetidas aos tratamentos com diferentes dietas podem ser consideradas higiênicas;

As dietas fornecedoras de pólen de milho expressando as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1A.105, Cry2Ab2, CP4-EPSPS, causaram uma diminuição gradativa da taxa de comportamento higiênico ao longo do período avaliado;

Os resultados encontrados para as dietas contendo PTs podem ser indicativos de efeitos subletais do pólen de milho transgênico sobre o comportamento higiênico das colônias.

REFERÊNCIAS

- Bizzocchi, L. 2014. Avaliação dos impactos do pólen de milho geneticamente modificado (*Bt*) sobre colônias de *Apis mellifera* L. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 65p.
- Brodtschneider, R.; Crailsheim, K. 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41: 278–294.
- Céleres. 2014. [2º acompanhamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2013/14](http://celeres.com.br/wordpress/wpcontent/uploads/2013/12/IB13021.pdf). Available at: <http://celeres.com.br/wordpress/wpcontent/uploads/2013/12/IB13021.pdf>. Accessed on Jan 14, 2014
- CTNBio. 2009. Parecer Técnico nº 2052/2009. <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/full/14254.html>. Accessed on Jan 25, 2014.
- Gonçalves, L. S.; Gramacho, K. P. 2000. Comportamento higiênico de abelhas *Apis mellifera*: crias de operárias versus crias de zangão. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 4., 2000, Ribeirão Preto. Anais... Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, p. 66-70.
- Gramacho, K. P.; Gonçalves, L. S. 2000. Fatores que interferem nas atividades de abelhas *Apis mellifera* relacionadas ao comportamento higiênico. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 4., 2000, Ribeirão Preto. Anais... Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, p. 58-65.
- Hanley, A., Huang, Z., Pett, W. 2003. Effects of dietary transgenic *Bt* corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. *J. Apicult. Res.*, 42, 77-81.
- Hendriksma, H. P.; Hartel, S.; Steffan-Dewenter. 2011. Testing pollen of single and stacked insect-resistant *Bt* maize on in vitro reared honey bee larvae. *Plos One* v. 6 (12).
- Kaiser, L., Pham-Delegue, M.H., Ramirez-Romero, R.. 2001. *Bt* corn and insect helpers. *Biofutur* 207, 30–33.
- Lang, A., Vojtech, E. 2006. The effects of pollen consumption of transgenic *Bt* maize on the common swallowtail, *Papilio machaon* L. (Lepidoptera, Papilionidae). *Basic Appl. Ecol.* 7, 296–306.
- Lengler, S. 2000. Alimentação artificial de abelhas. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 13. 2000, Florianópolis. Anais... Florianópolis: UFSC.
- Ludy, C., Lang, A. 2006. *Bt* maize pollen exposure and impact on the garden spider, *Araneus diadematus*. *Entomol. Exp. Appl.* 118, 145–156.
- Masson, C.; Arnold, G. 1984. Ontogeny, maturation and plasticity of the olfactory system in the worker bee. *J. Insect Physiol.* 30, 7–14.
- Masson, C.; Pham-Delegue, M.H.; Fonta, C.; Gascuel, J.; Arnold, G.; Nicolas, G.; Kerszberg, M. 1993. Recent advances in the concept of adaptation to natural odor signals in the honeybee, *Apis mellifera* L. *Apidologie* 24, 169–194.
- Newton, D. C.; Ostasiewski, Jr., N. J. 1986. A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Am. Bee J.*, v. 126, n. 4, p. 278-281.
- Prasifka, P.L., Hellmich, R.L., Prasifka, J.R., Lewis, L.C. 2007. Effects of Cry1Ab-expressing corn anthers on the movement of monarch butterfly larvae. *Environ. Entomol.* 36, 228–233.
- Sabugosa-Madeira, J. B., Abreu, I., Ribeiro, H., Cunha, M. 2007. *Bt* transgenic maize pollen and the silent poisoning of the hive. *J. Apicult. Research*, 46, 57-58.
- Spivak, M.; Reuter, G. S. 2001. *Varroa jacobsoni* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. *Journal of Economic Entomology*, Lanham, v. 94, n. 1, p. 326-331,
- Wilson-Rich, N.; Spivak, M.; Fefferman, N.H.; Starks, P.T. 2009. Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annual Review of Entomology*, v.54, p. 405–23.