

**Área: Biologia, Fisiologia e Comportamento****PLANTAS TRANSGÊNICAS ALTERAM O COMPORTAMENTO DAS ABELHAS?**

**Maria Augusta Pereira Lima (UFV); Carmen Sílvia Soares Pires (Embrapa/ Cenargen); Lucio Antonio de Oliveira Campos (UFV)**

**Resumo**

O desenvolvimento de técnicas de engenharia genética oferece oportunidade para a criação de plantas resistentes a insetos devido à inserção e expressão, naqueles organismos, de genes responsáveis pela síntese de proteínas entomopatogênicas (Jouanian et al., 1998). Recentemente, interesses científicos e comerciais têm sido focados, principalmente, em genes que codificam proteínas tóxicas derivadas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) ou inibidores de protease (IPs) derivados de diversas fontes (Malone et al., 2001). A liberação em escala comercial de culturas Bt ocorreu pela primeira vez em 1996, nos Estados Unidos (Bates et al., 2005). A resistência de plantas a insetos, baseada nas toxinas Bt, é a segunda característica (depois da tolerância a herbicidas) mais utilizada em culturas geneticamente modificadas (O'Callaghan et al., 2005). Desde então, o rápido crescimento do cultivo em várias regiões do mundo tem provocado intensos debates sobre a biossegurança alimentar e ambiental dessas plantas. Dentre os riscos ambientais, destacam-se o fluxo gênico de cultivos GM para variedades convencionais, selvagens ou para espécies filogeneticamente próximas; o desenvolvimento de resistência em insetos alvo, impactos sobre a dinâmica das populações associadas à cultura e efeitos diretos ou indiretos sobre espécies não-alvo (Hunter, 2000; Caprio, 2001; Dale et al., 2002; Naranjo et al., 2005; O'Callaghan et al., 2005). Outra modificação que confere às culturas resistência a insetos consiste na expressão, em plantas GM, de inibidores de protease (IPs). Essas moléculas interferem no metabolismo larval, podendo ocasionar a morte dos insetos imaturos (Jouanian et al., 1998). Os inibidores de protease, assim como as toxinas Bt, atuam no intestino dos insetos suscetíveis, porém com diferente modo de ação. Enquanto a intoxicação por proteínas Bt ocorre após a ligação da toxina a receptores intestinais, culminando em lise das células epiteliais (Gill et al., 1992), os IPs bloqueiam a ação das proteases intestinais, ocasionando a morte dos indivíduos por deficiência nutricional de proteínas (Jongsma & Bolter, 1997; Carlini & Grossi-de-Sá, 2002; Haq et al., 2004). Para que a utilização de plantas GM seja bem sucedida no manejo integrado de pragas, ela deve substituir, completa ou parcialmente, o uso de inseticidas na produção agrícola, ocasionando aumento na produtividade e melhoria na preservação dos ecossistemas (Sharma et al., 2004). De acordo com o Protocolo de Cartagena, a realização de análises de risco deve fornecer informações científicas para avaliação dos possíveis efeitos adversos dos organismos geneticamente modificados sobre o ambiente e saúde humana (Jank & Gaugitsch, 2001). Dessa forma, análises de riscos ambientais devem ser realizadas com os objetivos de se conhecer, minimizar e manejar prováveis riscos causados por essas plantas aos ecossistemas. Em virtude da importância das abelhas, devido ao serviço de polinização, na manutenção dos agroecossistemas e dos principais biomas terrestres, a biossegurança de plantas GM deve ser testada nesses animais antes da liberação comercial dos cultivares. Alterações no comportamento das abelhas relacionadas ao cultivo de plantas GM estão entre os efeitos subletais que devem ser avaliados, apresentando particular importância devido à possibilidade de interferirem negativamente na polinização. Aqui se apresenta uma breve revisão dos estudos realizados, até o momento, sobre possíveis efeitos de plantas geneticamente modificadas no comportamento das abelhas. Hipóteses, ainda não testadas, sobre alterações etológicas associadas ao contato com toxinas transgênicas são também abordadas. Plantas transgênicas e o comportamento das abelhas A exposição, direta ou indireta, de abelhas às entomotoxinas produzidas por plantas GM pode, potencialmente, prejudicar esses insetos alterando, inclusive, o comportamento. Efeitos diretos, como mortalidade, podem surgir após a ingestão de proteínas inseticidas expressas pelas plantas. Os efeitos indiretos podem ser consequência de alterações no fenótipo da planta em consequência da introdução do transgene (Malone & Pham-Delègue, 2001; Arpaia et al., 2006). A introdução de um transgene pode resultar em alterações fenotípicas que podem afetar diretamente o forrageamento das abelhas, tais como mudanças na produção de voláteis pelas flores e na disponibilidade de recursos (Malone et al., 1999; 2001; Arpaia et al., 2006). Os semioquímicos sintetizados pelas plantas têm um papel essencial na ecologia das abelhas, permitindo que elas escolham as flores onde coletarão recursos (Girard et al., 1998). Assim, se realmente ocorrerem alterações nesses voláteis, podemos pressupor que aconteçam modificações no comportamento de forrageamento das operárias como, por exemplo, na orientação e atratividade desses indivíduos. Nesse caso, as toxinas Bt poderiam prejudicar (ou até mesmo beneficiar) o desenvolvimento das colônias localizadas próximas às culturas transgênicas. Em abelhas sociais, o forrageamento está associado às habilidades de aprendizado, memória, orientação individual e comunicação social (Michener, 1974). A intensidade e a qualidade dos voláteis produzidos pelas flores afetam a habilidade das abelhas em identificar odores florais (Wright et al., 2002). Portanto, para se avaliar se plantas transgênicas são mais ou menos atrativas às abelhas do que variedades convencionais, os comportamentos prévios ao forrageamento e durante a fase de alimentação devem ser estudados (Arpaia et al., 2006). Neste sentido, estudos em laboratório e em condições de campo devem ser realizados de forma complementar. Pesquisas em condições controladas de laboratório são importantes porque permitem avaliações mais precisas dos efeitos isolados das entomotoxinas sobre o comportamento. Por outro lado, avaliações em casas de vegetação ou campo aberto devem ser conduzidas com o objetivo de se observar a ocorrência de prováveis alterações em condições mais realistas. Vários trabalhos foram desenvolvidos para testar a biossegurança de plantas GM, ou de produtos sintetizados por estas variedades, em abelhas (revisado por Malone & Pham-Delègue, 2001; O'Callaghan et al., 2005 e Duan et al., 2008). A maioria destes estudos foi realizada com *Apis mellifera*, utilizando geralmente a mortalidade como principal parâmetro para análise da toxicidade. Alguns estudos etológicos, entretanto, foram conduzidos para avaliar o consumo de alimento, as estratégias de forrageamento, o comportamento de voo, a

capacidade de aprendizado, o polietismo etário e a capacidade das operárias de discriminarem entre diferentes compostos adicionados à dieta (Picard-Nizou et al., 1997; Girard et al., 1998; Malone et al., 1999; Pham-Delègue et al., 2000; Malone et al., 2001; Morandin & Winston, 2003; Malone et al., 2004; Dechaume-Moncharmont et al., 2005; Arpaia et al. 2004; Ramirez-Romero et al., 2005; Rose et al., 2007; Babendreier et al., 2008). De uma maneira geral, concluiu-se que os inibidores de protease têm efeitos negativos sobre o comportamento das abelhas, ao contrário das toxinas Bt. Diversos trabalhos, realizados com *Apis mellifera*, demonstraram que a ingestão de diferentes toxinas Bt (Cry1Ab, Cry1Ba e Cry1Ac) não altera a atividade forrageadora (Morandin & Winston, 2003; Rose et al., 2007; Babendreier et al., 2008), o período de ocorrência do primeiro vôo das campeiras (Malone et al., 2001), a taxa de consumo de alimento (Malone et al., 1999; Ramirez-Romero et al., 2005; Babendreier et al., 2008) e a capacidade de aprendizado (Ramirez-Romero et al., 2005). Em um dos estudos foi verificada redução no ritmo da atividade forrageadora dessa espécie durante e após o tratamento com a toxina Bt Cry1Ab (Ramirez-Romero et al., 2005). Porém, neste trabalho, as alterações no forrageamento não foram relacionadas com o comportamento de repelência, mas com efeitos fisiológicos ocasionados pela ingestão da toxina (Ramirez-Romero et al., 2005). Em abelhas do gênero *Bombus*, os testes sobre efeitos da ingestão de toxinas Bt no comportamento obtiveram resultados semelhantes aos estudos com *A. mellifera*. Campeiras de *B. occidentalis* tratadas com pólen misturado à toxina Cry1Ac, não apresentaram alterações no ritmo de atividade forrageadora e no número de visitas às flores (Morandin & Winston, 2003). Estes resultados, entretanto, não excluem a possibilidade de modificações etológicas das abelhas em condição de campo, devido a prováveis alterações fenotípicas nas plantas. Forrageiras de *B. terrestris* preferiram coletar em inflorescências de canola convencional do que na variedade GM, que sintetiza a toxina Cry1Ac (Arpaia et al., 2004). Por outro lado, Babendreier et al. (2008) concluíram que abelhas dessa espécie não discriminam entre alimentadores contendo solução de sacarose pura e adicionada com Cry1Ab, pois não houveram diferenças significativas entre o número e a duração das visitas das operárias nos dois tratamentos. Da mesma forma que os testes desenvolvidos com Bt, a maioria dos trabalhos que testou a toxicidade dos inibidores de protease sobre o comportamento das abelhas foi realizada com *A. mellifera*. Nesta espécie, demonstrou-se que alguns inibidores prejudicam a memória olfativa das campeiras, diminuindo a capacidade de forrageamento (Picard-Nizou et al., 1997; Pham-Delègue et al., 2000). Outra modificação no forrageamento foi descrita por Malone et al. (2001), que comprovaram que abelhas que se alimentam de inibidores de protease começam a voar mais precocemente do que indivíduos que não ingeriram essas substâncias. Girard et al. (1998), entretanto, não observaram diferenças entre a memória olfativa das abelhas melíferas tratadas com os inibidores cistatina, orizacistatina e com o inibidor de protease da soja (BBI) e das não-tratadas. Estes resultados talvez possam ser explicados pela menor concentração do inibidor usada por Girard et al. (1998). A adição de inibidor de protease ao pólen não modificou a taxa de consumo de alimento de operárias recém-emergidas (Malone et al., 1999). Dechaume-Moncharmont et al. (2005) demonstraram que a ingestão do inibidor “Bowman-Birk inhibitor”, na concentração semelhante à expressa em plantas GM, não modifica a atividade forrageadora de *A. mellifera*. Outras plantas GM, ou proteínas produzidas por elas, também foram testadas em abelhas. Proteínas expressas por culturas resistentes a fungos diminuíram a memória olfativa das operárias de *A. mellifera* (Picard-Nizou et al., 1997). Por outro lado, proteínas inseticidas que inibem a assimilação de vitaminas não afetaram a taxa de consumo de alimentos de operárias dessa espécie (Malone et al. 2002; Malone et al. 2004). Observou-se também que abelhas silvestres são menos abundantes em culturas de canola resistente ao glifosato do que em plantios orgânicos e convencionais, ocasionando um déficit na polinização e uma baixa produção de sementes de canola. Estes resultados indicam um possível efeito indireto do sistema de cultivo utilizando plantas GM resistentes ao glifosato, que pode estar associado à redução da atratividade das abelhas para os campos de canola GM. Considerações finais Os resultados descritos na literatura demonstram que os efeitos de plantas GM no comportamento das abelhas dependem do transgene inserido e da espécie de abelha. De um modo geral, em *Apis mellifera*, a ingestão de proteínas Bt não altera o comportamento de forrageamento. Porém, os inibidores de protease podem afetar diversos comportamentos das abelhas devido à ingestão dessas substâncias. Alguns estudos já comprovaram a ocorrência de algumas dessas alterações etológicas (Picard-Nizou et al., 1997; Pham-Delègue et al., 2000; Malone et al., 2001). Contudo, estes trabalhos foram desenvolvidos somente com operárias e avaliaram principalmente o comportamento de forrageamento. A grande maioria dos trabalhos foi conduzida com *A. mellifera* e abelhas do gênero *Bombus*. Porém, no Brasil, a utilização de abelhas silvestres como alternativa para a realização desse tipo de estudo não deve ser descartada, especialmente em virtude da abundância e riqueza de espécies na região Neotropical. Pesquisas com abelhas nativas do Brasil tornam-se particularmente importantes devido ao recente aumento da área cultivada com cultivos GM no país, que atualmente é o terceiro maior produtor mundial de plantas transgênicas. Não há, entretanto, estudos realizados até o momento sobre efeitos dessas plantas sobre o comportamento de espécies nativas do Brasil. Em abelhas sociais, esses trabalhos devem incluir: 1) verificação da atividade forrageadora por meio do número de indivíduos que saem e retornam às colônias; 2) observação do padrão e orientação do vôo; 3) análise do comportamento de dança (ou outra forma de comunicação) no interior das colônias; 4) estudo da memória olfativa associada ao forrageamento (Pham-Delègue et al., 2002). Além disso, não podemos descartar a hipótese de que essas toxinas interfiram direta ou indiretamente no comportamento de rainhas e zangões, e atos comportamentais relacionados ao comportamento reprodutivo, como comportamento de oviposição e de acasalamento também devem ser avaliados. Referências bibliográficas Arpaia S, Clemente A, Leo GMD, Fiore MC. Pollinator abundance and foraging behaviour on Bt-expressing transgenic canola plants. In: First European Conference of Apidology, 126. 2004. Arpaia, S; Imperatriz-Fonseca, VL; Pires, CSS; Silveira, FS. Non-target and biodiversity impacts on pollinators and flower visiting insects. In: Hilbeck, A., Andow, D., Fontes, E. (eds). Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms: Methodologies for Assessing Bt cotton in Brazil. Cambridge, CABI Publishing, p.155-174. 2006. Babendreier D, Reichhart B, Romeis J, Bigler F. Impact of insecticidal proteins expressed in transgenic plants on bumblebee microcolonies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 126, 148–157, 2008. Bates SL, Zhao JH, Roush RT, Shelton AM. Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nature* 23, 57-62. 2005. Caprio MA. Source-sink dynamics between transgenic and non-transgenic habitats and their role in the evolution or resistance. *Journal of Economic Entomology* 94, 698-705. 2001. Carlini CR, Grossi-de-Sá MF. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potencialiteis as bioinsecticides. *Toxicon* 40, 1539. 2002. content/sci\_tech/prod\_safety/bollgard/es.pdf. 2002. (Consultado em 15/08/2005). Dale PJ, Clarke B, Fontes EMG. Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nature Biotechnology* 20, 567-843. 2002. Dechaume-Moncharmond FX, Azzouz H, Pons O, Pham-Delègue MH. Soybean proteinase inhibitor and the foraging strategy of free flying honeybees. *Apidologie* 36, 421-430.

2005. Duan JJ, Marvier M, Huesing J, Dively G, Huang ZY. A meta-analysis of effects of Bt crops on honey bees (Hymenoptera: Apidae). PLoS ONE 3: e1415. doi:10.1371/journal.pone.0001415 (2008) Gill SS, Cowles EA, Pietrantonio PV. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annual Review of Entomology 37, 615-636. 1992. Girard C, Picard-Nizou AL, Grallien E, Zacommer B, Jouanin L, Pham-Delegue MH. Effects of protease inhibitor ingestion on survival, learning abilities and digestive proteinases of the honeybee. Transgenic Research 7, 239-246. 1998. Haq SK, Atif SM, Khan RH. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. Archives of Biochemistry and Biophysics 431, 145-159. 2004. Hunter MD. Between hyperbole and hysteria. Entomological issues and the deployment of transgenic plants. Agricultural and Forest Entomology 2, 84. 2000. Jank B, Gaugitsch H. Decision making under the Cartagena Protocol on Biosafety. Trends in Biotechnology 19, 194-197. 2001. Jongsma MA, Bolter C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. Journal of Insect Physiology 43, 885-895. 1997. Jouanin L, Bonadé-Bottino M, Girard C, Morrot G, Giband M. Transgenic plants for insect resistance. Plant Science 131, 1-11. 1998. Malone LA, Burgess EPJ, Gatehouse HS, Voisey CR, Tregidga EL, Philip BA. Effects of ingestion of a *Bacillus thuringiensis* toxin and a trypsin inhibitor on honey bee flight activity and longevity. Apidologie 32, 57-68. 2001. Malone LA, Burgess EPJ, Gatehouse HS, Voisey CR, Tregidga EL, Philip BA. Effects of ingestion of a *Bacillus thuringiensis* toxin and a trypsin inhibitor on honey bee flight activity and longevity. Apidologie 32, 57-68. 2001. Malone LA, Burgess EPJ, Stefanovic D. Effects of a *Bacillus thuringiensis* toxin, two *Bacillus thuringiensis* biopesticide formulations, and a soybean trypsin inhibitor on honey bee (*Apis mellifera* L.) survival and food consumption. Apidologie 30, 465-473. 1999. Malone LA, Pham-Delègue M-H. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees. Apidologie 32, 287-304. 2001. Michener, CD. The social behavior of the bees: a comparative study. Harvard University Press, Massachusetts, 404p. 1974. Morandin LA, Winston M. Effects of novel pesticides on bumble bee (Hymenoptera: Apidae) colony health and foraging ability. Environmental Entomology 32, 555-563. 2003. Naranjo SE, Head G, Dively GP. Field studies assessing arthropod nontarget effects in Bt transgenic crops: introduction. Journal of Entomological Science 34, 1178-1180. 2005. OCallaghan M, Glare TR, Burgess EPJ, Malone LA. Effects of plants genetically modified for insect resistance on nontarget organisms. Annual Review of Entomology 50, 292. 2005. Pham-Delègue M-H, Girard C, Le Métayer M, Picard-Nizou AL, Hennequet C, Pons O, Jouanin L. Long-term effects of soybean protease inhibitors on digestive enzymes, survival and learning abilities of honeybees. Entomologia Experimentalis et Applicata 95, 21-29. 2000. Pham-Delègue, M.H.; Decourtye, A.; Kaiser, L. & Devillers, J. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. Apidologie 33, 425-432. 2002. Picard-Nizou AL, Grison R, Olsen L, Pioche C, Arnold G, Pham-Delegue MH. Impact of proteins used in plant genetic engineering: toxicity and behavioural study in the honeybee. Journal of Economic Entomology 90, 1710-1716. 1997. Ramirez-Romero R, Chauvaux J, Pham-Delègue M-H. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. Apidologie 36, 601-611. 2005. Rose R, Dively GP, Pettis J. Effects of Bt corn pollen on honey bees: emphasis on protocol development. Apidologie 38, 1-11. 2007. Sharma HC, Sharma KK, Crouch JH. Genetic transformation of crops for insect resistance: potential and limitations. Critical Reviews in Plant Sciences 23, 47-72. 2004. Wright GA, Lutmerding A, Dudareva N, Smith BH. Intensity and the ratios of compounds in the scent of snapdragon flowers affect scent discrimination by honeybees (*Apis mellifera*). Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology 191, 97-196. 2005.

## **Palavras-chave:**