اثرات نئونیکوتینوئیدها در اختلال زمستان گذرانی و زوال کلنی های زنبورعسل

شهرام دادگستر

پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

دریافت: اسفند ۱۳۹۴؛ پذیرش: فروردین ۱۳۹۵
پست الکترونیک نویسنده پاسخگو: sh_dadgostar@ut.ac.ir

چکیده

پدیده فروپاشی کلنی های زنبور عسل (CCD) که در سال ۱۳۸۳-۱۳۸۴ اتفاق افتاد، همچنان در بیشتر نقاط دنیا مورد بحث است. در این پژوهش به اثرات زیر کشنده نئونیکوتینویید ها از جمله ایمیداکلوپرید و کلوتیانیدین بر کلنی‌های سالم زمستانگذرانی کرده می‌پردازیم که پس از آن دچار زوال شده اند. ما هر دو گروه زنبورهای شاهد و آلوده به نئونیکوتینویید را در تابستان و پاییز بطور یکسان مورد مراقبت قرار دادیم و تا پایان فصل زمستان ضعف یا مرگ و میر حاد در هیچ کدام از دو گروه مشاهده نکردیم. زنبورهای شش عدد از دوازده کلنی تیمارشده با نئونیکوتینویید، کندوی خود را ترک کردند، و درنهایت با علائمی مشابه زوال کلنی از بین رفتند. اما مشاهدات ما در کندوهای شاهد برعکس کندوهای تیمار شده بود و زنبورها به جای ترک کلنی ، جمعیت خود را به سرعت با زنبورهای تازه بالغ بازسازی کردند. فقط یکی از شش کلنی شاهد به دلیل آلودگی به نوزما از بین رفت. مشاهدات این مطالعه می تواند به چگونگی اثر دزهای زیرکشنده نئونیکوتینوییدها د در ناپدید شدن زنبورها از کندو، کمک کند.

واژه‌های کلیدی: پدیده زوال کلنی، CCD، زنبورعسل، نئونیکوتینویید، ایمیداکلوپرید، کلوتیانیدین

مقدمه

از زمان ظهور این پدیده (زوال کلنی) در سال۱۳۸۳-۱۳۸۴، کاهش قابل توجه کلنی های زنبور عسل (*Apis mellifera L.*) که از نشانه های پدیده زوال کلنی (CCD) می باشد، موجب ناتوانی ما در شناسایی و ریشه کنی علت این پدیده شده است[۱،۲،۳]. در این زمان پیشنهاداتی مبنی بر چندعاملی بودن علت این پدیده نظیر آلودگی به پاتوژن ها، روش های زنبورداری (مثل سوء تغذیه) و آفت کش ها بطور کلی مطرح شد[۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳]. این دیدگاه علایم مختلف مرگ و میر را نادیده گرفت و به بخشی از ترک کلنی بعلت بیماری یا زوال کلنی پرداخت. بهرحال امروزه دانشمندان ارتباطی بین آفت کشهای سیستمیک نئونیکوتینویید و زوال کلنی یافتند که قابل ملاحظه است[۱۴،۱۵،۱۶،۱۷،۱۸] و منجر به ایجاد روش کنترل منظمی شده است[۱۸]. در این پژوهش به ادامه مطالعات قبلی[۱۶] و بررسی اثرات زیرکشنده ایمیداکلوپرید و کلوتیانیدین و تاثیر آن بر زنبورهای سالم زمستان گذران می پردازیم که دچار زوال کلنی شده اند.

مواد و روش‌ها

برای اندازه گیری میزان دز زیرکشنده نئونیکوتینویید در کلنی های سالم، ما با بکاربردن طرح اسپلیت- پلات استفاده کردیم که در آن به زنبورهای عسل مقدار مشخصی نئونیکوتینویید خورانده شده و بطور آزادانه در طبیعت رها شدند. سپس میزان

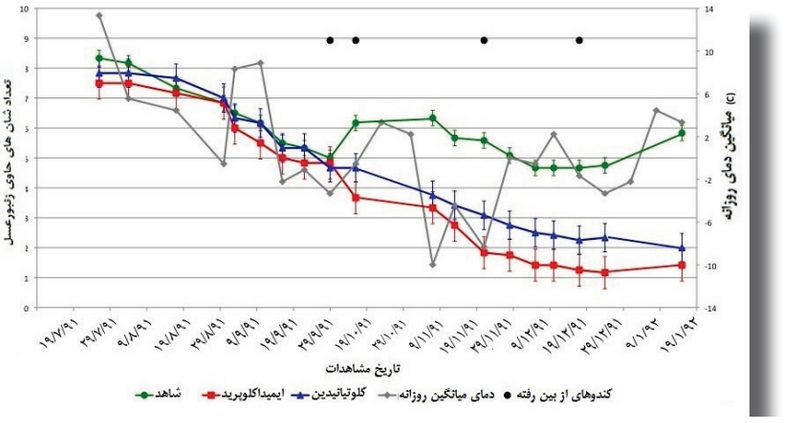
رشد جمعیت کلنی و میزان مرگ و میر یا ضعف زنبوران کارگر در چند نسل را مورد ارزیابی قرار دادیم. استفاده و مدیریت هجده کلنی(از نوع لانگستروت با ده قاب) مورد استفاده در سه زنبورستان در مرکز ماساچوست، همانند پژوهش قبلی بود[۱۶]. در هر زنبورستان، شش کلنی زنبور را به دو گروه تقسیم کردیم که هر گروه با آب و شکر یا شربت ذرت با فروکتوز بالا(HFCS) تغذیه شدند. هر گروه تغذیه شده با آب و شکر شامل دو کلنی تیمار شده با نئونیکوتینویید و یک کلنی بدون تیمار بعنوان شاهد بود. ما شکر را از خواربارفروشی محلی و شربت فروکتوز را از کارخانه نوشابه سازی خریداری کردیم. هر دو شربت آب و شکر و فروکتوز، قبل از انجام آزمایش آنالیز شد و مقدار غیرقابل تشخیص نئو نیکوتینویید در آن یافت شد[۱۹]. آزمایش در دوازدهم تیر ۱۳۹۱ شروع شد و مقدار ۲۵۸ میکروگرم ایمیداکلوپرید یا کلوتیانیدین در ۱/۹ لیتر شربت آب و شکر یا فروکتوز حل شده و بطور مرتب برای سیزده هفته پی در پی تا ۲۷ شهریور۱۳۹۱، کلنی‌ها بوسیله آن تیمار می شدند. جمعیت هر کلنی در بهار و تابستان حدودا ۵۰۰۰۰ زنبورعسل می باشد که ما مقدار ۰/۷۴ نانوگرم/زنبور/روز در مدت سیزده هفته، ایمیداکلوپرید یا کلوتیانیدین در کندو تیمار کردیم. این دز خیلی کمتر از LD۵۰ ثبت شده ۳/۴ و ۱۱۸/۷ نانوگرم/زنبور برای به ترتیب کلوتیانیدین و ایمیداکلوپرید می باشد[۲۰]. کلنی‌های شاهد در دوره آزمایش با شربتهای فاقد نئونیکوتینویید تیمار شدند. شربتها در دوره سیزده هفته ای آزمایش بطور کامل توسط زنبورها مصرف می شدند. از ۹ بهمن تا ۸ مهر ۱۳۹۱، تعداد شفیره های بالغ شده را طبق روش اندازه گیری نوزادان که قبلا توصیف کرده بودیم [۱۶]، ارزیابی کردیم. بطور کلی ۲۰ قاب در هر کندو برای اندازه گیری حجره های شفیرگی در بسته، مورد استفاده قرار گرفت. نوزادان، با تقسیم کردن دو طرف شان به ۳۲ قسمت (که هر قسمت شامل ۱۰۰ سلول بود) انتخاب شدند. تمام ۲۰ قاب در هر کندو بوسیله روش مشاهده مستقیم سلول های در بسته شمارش و ارزیابی شد. تمام کلنی ها با نوارهای کنه کش فوری، در ۲۳ مرداد ۱۳۹۱ برای کنترل کنه واروا، تیمار شدند و از دهم مهر تا ۲۵ آبان ۱۳۹۱ با نوارهای آپیستان، تیمار ادامه یافت. تعداد کنه های واروا قبل و بعد از تیمار با کنه کش ها به روش شستشو با الکل شمارش شد. علاوه بر این کلنی ها با فوماژیلین (۹/۱ گرم در ۷/۶ لیتر شربت شکر یا فروکتوز) برای کنترل *Nosema apis* و *N. cerana* در یکم مهر ۱۳۹۱، تیمار شدند. دریچه کندو را قبل از شروع زمستانگذرانی، تنگ تر کردیم.

تمام کلنی ها در اول هر هفته مورد بررسی قرار می گرفتند. تغییرات بر اساس خوشه های زنبورعسل تشکیل شده بالای قابها به مدت ۱۰ ثانیه مشاهده و اندازه گیری شد. از آبان۱۳۹۱، کندوها با ترکیب کریستال های فروکتوز یا گرانول های ساکارز که بصورت خمیر در آمده اند، تغذیه شد. غذا روی صفحه مومی بالای قاب ها قرار داده می شد. داده ها بوسیله نرم افزار SPSS (ورژن ۲۰) آنالیز شد.

ما تغییرات هر دو گروه کلنی های شاهد و تیمار شده با نئونیکوتینویید را مشاهده کردیم و تا رسیدن فصل زمستان ضعف یا مرگ و میر حادی در هیچ کدام از دو گروه مشاهده نکردیم. علاوه بر این، نه مکانهایی که کندوها در آنجا قرار داده شده بود و نه نوع تغذیه (شربت ذرت با فروکتوز در مقابل شربت شکر) ارتباط معنی داری با کاهش جمعیت نوزادان و ایجاد CCD برقرار نکرد (ANOVA یک طرفه). همچنین داده ها از سه زنبورستان با دو نوع تغذیه جمع آوری و آنالیز شد. وقتی که دمای هوا در اواخر مهر ۱۳۹۱ رو به کاهش گذاشت، ما مشاهده کردیم اندازه خوشه های زنبورعسل در کلنی های شاهد و تیمار شده با نئونیکوتینویید کاهش می یابد. درحالیکه این کاهش در خرداد ۱۳۹۲ در کلنی های شاهد از بین رفت، همچنان در کلنی های تیمارشده با نئونیکوتینویید ها کاهش جمعیت ادامه داشت (شکل ۱). همانطور که

در جدول ۱ مشاهده می شود، اختلاف معنی داری بین قاب های حاوی زنبور در تاریخ ۱۳۹۱/۸/۶ تا ۱۳۹۱/۱۰/۹ دیده نشد اما از تاریخ ۱۳۹۲/۱۰/۱۶ تا تاریخ ۱۳۹۲/۱/۱۵ اختلاف معنی دار دیده شد (ANOVA یک طرفه) (P<۰.۰۰۰۱). در پایان آزمایش در ۱۳۹۲/۱/۱۵ تعداد ۵/۳، ۲ و ۲/۹ قاب از زنبورها به ترتیب در کندوهای شاهد، ایمیداکلوپرید و کلوتیانیدین وجود داشت. کاهش اندازه خوشه ها در گروه نئونیکوتینویید منجر به از دست رفتن ۶ کلنی از ۱۲ کلنی (۵۰ درصد) تیمار شده گردید که به CCD نسبت داده می شود؛ در حالیکه تنها یکی از ۶ کلنی کنترل با علائمی که به نوزما شبیه بود، از بین رفت. البته در این پژوهش، آزمایشی برای تایید قطعی وجود نوزما انجام نگرفت. علایم شبیه نوزما در کلنی های تیمار شده، دیده نشد. در ادامه آزمایش ما در اوایل فروردین ۱۳۹۲، مشاهده کردیم زنبورهای تیمار شده با نئونیکوتینویید، در طول زمستان کلنی را ترک کردند. بهرحال ما شرایط متفاوتی در کلنی های شاهد دیدیم بطوری که نه تنها کلنی را ترک نکردند بلکه جمعیت زنبورهای خود را بسرعت افزایش دادند. خوشه های تشکیل شده در شش کلنی باقیمانده تیمار شده با نئونیکوتینویید اندازه ای کوچک داشتند و بدون ملکه یا زنبوران تازه متولد شده بودند.

اختلاف معنی داری بین میزان آلودگی به کنه واروا در کلنی های شاهد و تیمارشده با نئونیکوتینویید مشاهده نگردید. میانگین کنه های ریخته شده در میانه مرداد ۱۳۹۱ در هردو گروه کلنی های شاهد و تیمار شده حدود ۱۰-۱۲ کنه به ازای ۱۵۰ زنبور بود (جدول ۱). بعد از تیمار شدن کلنی ها با نوارهای کنه کش تعداد کنه های ریخته شده به ازای ۱۵۰ زنبور با رسیدن فصل زمستان، از ۱۰-۱۲ کنه به ۱-۲ کنه در کلنی های شاهد و نئونیکوتینویید،کاهش یافت (آزمون T دوسویه،P<۰.۰۰۰۱). ما همچنین یافتیم که نئونیک‌وتینویید ها بر پرورش نوزادان در فصل تابستان و پاییز اثری ندارد (شکل ۲). حجره های سر بسته شمارش شده در کلنی های شاهد و تیمارشده بطور هماهنگ و معنی داری از جولای تا شهریور ۱۳۹۱ کاهش یافتند (معیار پیرسون، p<۰.۰۰۰۱). این کاهش (شیب ۰/۶۲) قبلا هم گزارش شده بود[۱۶] و به آلودگی شهد در فصل تابستان در انگلیس مرتبط است و ارتباطی با آلودگی به نئونیکوتینویید ها ندارد.



شکل ۱- میانگین تعداد شان حاوی زنبورعسل در شاهد و تیمارهای ایمیداکلوپرید و کلوتیانیدین و ارتباط آنها با میانگین دمای روزانه (اطلاعات دما از ایستگاه محلی فرودگاه ورسستر از مهر ۱۳۹۱ تا فروردین ۱۳۹۲)

بحث

نتایج حاصل از این آزمایش نه تنها یافته‌های مطالعات قبل روی ایمیداکلوپرید تکرار کرد و به کلوتیانیدین هم تعمیم داد، بلکه نتایج قبل مبنی بر ارتباط بروز CCD با اثرات زیرکشنده نئونیکوتینویید‌ها را هم تقویت کرد[۱۶]. زنده ماندن پنج کلنی از ۶ کلنی شاهد در تمام زنبورستان ها و از بین رفتن تقریبا نصف کلنی های تیمار شده با نئونیکوتینویید،

جدول ۱- اطلاعات صحرایی از کندوهای شاهد و تیمار شده با ایمیداکلوپرید و کلوتیانیدین با تغذیه آب و شکر یا (HFCS) از اردیبهشت ۱۳۹۱ تا فروردین ۱۳۹۲

تیمار	کلوتیانیدین		ایمیداکلوپرید		شاهد	
	HFCS	ساکارز	HFCS	ساکارز	HFCS	ساکارز
کندو زنبورعسل	۳	۳	۳	۳	۳	۳
میانگین شان ها با زنبور عسل (انحراف معیار) از ۱۳۹۱/۸/۶تا ۱۳۹۱/۱۰/۹	(۲) ۶/۳	(۲) ۶/۶	(۳) ۶/۳	(۳) ۶	(۲) ۶/۸	(۲) ۶/۳
میانگین شان ها با زنبورعسل (انحراف معیار) از ۱۳۹۱/۱۰/۱۶ تا ۱۳۹۲/۱/۱۵	(۲) ۲/۹	(۲) ۲/۹	(۲) ۲/۲	(۲) ۱/۸	(۳) ۴/۹	(۱) ۵/۸
کلنی از بین رفته (درصد)	۱ (۳۳/۳)	۱ (۳۳/۳)	۲ (۶۶/۷)	۲ (۶۶/۷)	۱ (۳۳/۳)	۰ (۰)
تاریخ مشاهده کلنی از بین رفته	۲۰۱۲/۱۲/۲۹	۲۰۱۳/۱/۵	۲۰۱۳/۱/۵ ۲۰۱۳/۳/۷	۲۰۱۳/۱/۵ ۲۰۱۳/۲/۹	۲۰۱۳/۳/۷	
میانگین کنه واروا شمارش شده						
(قبل از تیمار انحراف معیار)	(۴)a ۹	(۲)a ۱۲	(۳)a ۱۰	(۲)a ۱۱	(۳)a ۱۱	(۶)a ۱۰
بعد از تیمار(انحراف معیار)	(۱)b ۱	(۱)b ۱	(۱)b ۲	(۱)b ۱	(۱)b ۱	(۲)b ۲
اطلاعات دوره ای (C)						
کندو زنبورعسل	۶		۶		۶	
میانگین شان ها با زنبور عسل (انحراف معیار) از ۱۳۹۱/۸/۶ تا ۱۳۹۲/۱/۱۵	(۲)d ۶/۵		(۳)d ۶/۱		(۲)d ۶/۶	
میانگین شان ها با زنبورعسل	(۲)e ۲/۹		(۲)e ۲		(۲)e ۵/۳	

a : کنه واروا شمارش شده در کندوهای شاهد و تیمار شده اختلاف معنی داری قبل از استفاده از نوار کنه کش، با یکدیگر نداشتند (ANOVA یک طرفه)

b : کنه واروا شمارش شده در تیمارهای تغذیه شده با شکر و فروکتوز اختلاف معنی دار باهم داشتند. (ANOVA یک طرفه)

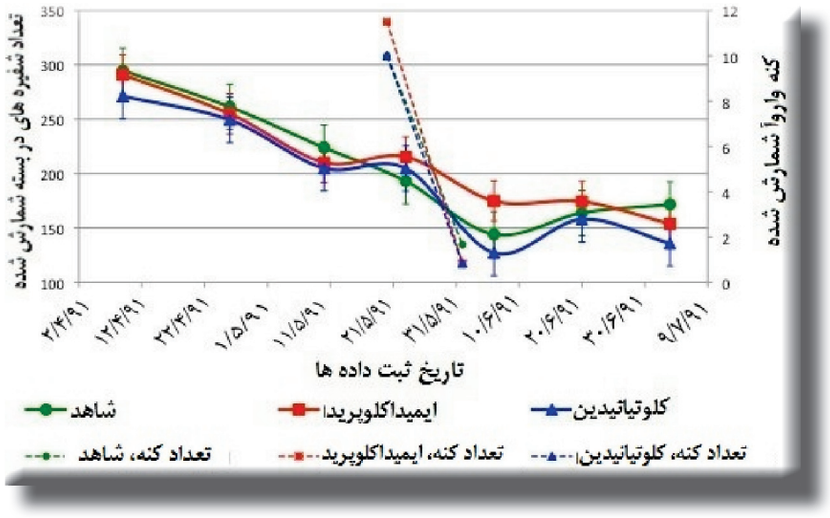
c : اطلاعات جمع آوری شده از کلنی های تغذیه ای با دو نوع قند در تیمارها و شاهد

d : تعداد شانهای حاوی زنبور اختلاف معنی داری در شاهد و تیمارها در این دوره زمانی نشان نداد (ANOVA یک طرفه)

e : تعداد شانهای حاوی زنبورعسل، اختلاف معنی داری بین شاهد و تیمارها در این دوره زمانی نشان دادند (ANOVA یک طرفه)

f : کنه واروا شمارش شده، اختلاف معنی داری در قبل و بعد از استفاده از نوار کنه کش در تیمارها و شاهد داشت (آزمون t)

گواه این مطلب است. مشاهده کاهش درجه حرارت در زمستان و افزایش شدت CCD در کلنی های آلوده به نئونیکوتینوییید نشان می‌دهد، CCD معمولا در فصل زمستان اتفاق می افتد. اثر زیرکشنده نئونیکوتینوییدها باید در چند زمستان قابل توجه باشد و نباید بطور قطعی بعنوان علت CCD ارزیابی شود. مطالعات قبلی مرگ و میر ۱۰۰ درصدی در کلنی های آلوده به ایمیداکلوپرید با ۰/۱ نانوگرم/زنبور/روز یعنی یک هفتم دز استفاده شده در این مطالعه را نشان داد[۱۶]. ما در این پژوهش یافتیم، قرار گرفتن زنبورعسل در معرض دز زیرکشنده نئونیکوتینوییید منجر به کاهش مقاومت سیستم ایمنی بدن زنبور به دیگر پاتوژن ها نمی شود. این یافته با چندین گزارش اخیر که آلودگی به نئونیکوتینوییدها، افزایش مرگ و میر بعلت زوال کلنی که در نتیجه ضعف سیستم ایمنی نسبت به سایر پاتوژن ها نظیر نوزما میشود، در تناقض بود[۶،۷،۱۲،۲۱]. میزان آلودگی برابر به کنه واروا در دو گروه کلنی شاهد و تیمار شده در این مطالعه، با یافته هایی که بیان میدارد میزان آلودگی به پاتوژن ها در کلنی های آلوده به CCD بیشتر است، مغایرت داشت[۶،۷،۱۲]. علاوه بر این، آنالیز مجدد اطلاعات بدست آمده از بانک RNA جمع آوری شده از کلنی های آلوده به CCD در گذشته، ارتباط بین پاتوژن ها و بروز CCD را رد کرد[۲۲].



شکل ۲- میانگین تعداد حجره های دربسته شمارش شده در شاهد و تیمار ایمیداکلوپرید و کلوتیانیدین (از ۱۳۹۱/۴/۹ تا ۱۳۹۱/۷/۳)؛ و میانگین کنه های شمارش شده قبل و بعد از استفاده از نوار کنه کش در تاریخ ۱۳۹۱/۵/۲۳

لازم است تاکید شود، آلودگی های پاتوژنی معمولی و شدید که در کلنی زنبورعسل یافت می شود، منجر به مرگ کلنی می گردد و این درحالیست که آزمایشات پس از مرگ کلنی‌های آلوده به پاتوژن بطور گسترده با تلفات حاصل از CCD متفاوت است [۱۶،۲۳]. یکی از علایمی که به CCD نسبت داده می شود تعداد زنبورهای مرده داخل کلنی است که تا قبل از زمستانگذرانی بعنوان تعداد کل زنبورها، گزارش نشده بودند (شکل ۳). برعکس وقتی زنبورها به دلیل پاتوژن از بین رفتند، مانند تنها کلنی شاهد در این مطالعه، هزاران زنبور مرده داخل کندو یافت شد (شکل ۴). نبود زنبورهای آلوده به نئونیکوتینوییید در کلنی های تیمار شده قابل توجه بوده و از علایم CCD می باشد. دو سوال مهم همچنان باقیست تا بتوان پازل CCD را حل کرد. اول اینکه چرا کلنی های تیمار شده با نئونیکوتینوییید توانایی افزایش جمعیت خود را در پایان زمستان، وقتی که دمای هوا رو به افزایش است، از دست می دهند؟ با توجه به اینکه کلنی های شاهد و تیمار شده تا قبل از زمستان توانایی پرورش نوزادان جدید را داشتند (شکل ۱)، عدم توانایی گروه تیمار شده با نئونیکوتینوییدها در ادامه دادن پرورش نوزادان بعد از زمستان و شروع بهار، ارتباط اثر زیرکشندگی نئونیکوتینوییید

شکل ۳- تصویر صفحه کف یکی از کلنی های تیمار شده با نئونیکوتینویید در یازدهم اسفند ۱۳۹۱، محدوده تعداد زنبورهای مرده در ۶ کلنی دچار CCD بین ۲۰۰- ۶۰۰ زنبور می باشد.

شکل ۴- تصویر صفحه کف تنها کلنی از بین رفته شاهد در تاریخ یازدهم اسفند ۱۳۹۱

با CCD را تقویت می کند. این درحالیست که خوشه های کوچکتر زنبور در کلنی های تیمار شده با نئونیکوتینویید در زمستان احتمالا برای ادامه پرورش نوزادان جدید در فصل گرم، ناتوان تر است. ما یافتیم که شدت CCD با میزان دمای زمستان می تواند تعدیل یابد. زمستان سرد و طولانی ماساچوست در سال ۱۳۸۹-۱۳۹۰ منجر به مرگ و میر حدود ۹۴ درصد کلنی ها بعلت CCD شد[۱۶]، درحالیکه این میزان در سال ۱۳۹۱-۱۳۹۲ حدود ۵۰ درصد بود. نا هماهنگی در میانگین دما منجر شد حدود ۶۳ روز از ۹۱ روز زمستان سال ۱۳۸۹-۱۳۹۰ سردتر از ۱۳۹۱-۱۳۹۲ باشد. میانگین دما در ماههای زمستان ۱۳۸۹-۱۳۹۰ حدود ۳/۸- درجه سلسیوس و تقریبا ۲/۷۸ درجه سلسیوس کمتر از زمستان ۱۳۹۱-۱۳۹۲ بود.

دومین و شاید مهمترین سوال اینکه، چرا زنبورهای عسل تیمار شده با نئونیکوتینویید در زمستان ناپدید می شوند؟ این موضوع مهم و پیچیده ای است، چرا که معمولا زنبورعسل کندوی خود را در زمستان ترک نمی کند. مشاهدات انجام شده بیان می کند احتمالا اختلالات عصبی مثل حافظه، ادراک و رفتار که اثرات مزمن و زیرکشنده نئونیکوتینویید ها می باشد، باعث این موضوع می شود. اگرچه عدم توانایی تولید نوزادان جدید و ناپدید شدن زنبوران کارگر در کلنی های تیمار شده با نئونیکوتینویید با مکانیسم های کاملا مختلف اتفاق می افتد، پیشنهاد شده است این اتفاقات بطور سری وار و پیوسته در بروز پدیده زوال کلنی نقش دارند. یافته های این مطالعه می تواند به فهمیدن علت اینکه چه اختلالاتی برای کلنی های زنبور عسل آلوده به نئونیکوتینویید در مدت زمستان و بعد از آن ایجاد میشود، منجر گردد.

میتوان نتیجه گیری کرد که وقتی زنبورهای عسل به مدت ۱۳ هفته از تیر تا شهریور ۱۳۹۱ در معرض دز ۰/۷۳ نانوگرم/زنبور/روز ایمیداکلوپرید و کلوتیانیدین قرار گرفتند، شش عدد از دوازده کلنی آلوده به نئونیکوتینویید از بین رفتند و تمام این علایم با نشانه های CCD در زمستان مطابقت داشت. کلنی های زنده مانده شاهد و نبود علام CCD در تنها کلنی از بین رفته شاهد نه تنها این نتیجه گیری را تکمیل کرد بلکه این نظریه را حمایت کرد که اثرات زیر کشنده نئونیکوتینویید باعث ضعف سیستم ایمنی بدن زنبورها نسبت به پاتوژن ها نمی شود. مکانیسم هایی که بعلت دز زیرکشنده نئونیکوتینویید ها باعث ناپدید شدن و ترک کندو توسط زنبورها می شود نیاز به بررسی بیشتر دارد.

منابع

1- Vanengelsdrop D., Hayes J., Underwood R. M., Pettis J. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008.- PLoS ONE. 2008. 3 (12): e4071.

2- THE NEW YORK TIMES. Mystery malady kills more bees, heightening worry on farms.- [online] URL: http://www.nytimes.com/2013/03/29/science/earth/soaring-beedeaths-in-2012-sound-alarm-on malady.html?pagewanted=all&_r=0. [last accessed on March 28, 2013].

3- BBC NEWS, Bee deaths: EU to ban neonicotinoid pesticides.- [online] URL: http://www.bbc.co.uk/news/worldeurope- 22335520. [Last accessed on April 29, 2013].

4- Cox-fosterD. L., Conlans S., Holmes E. C., Palacios G., Evans J. D., Moran N. A., Quan P. L., Briese T., Horning M., Geiser D. M., Martionson V., Vanengelsdrop D., Kalkstein A. L., Drysdale A., Hui J., Zhai J., Cui L., Hutchison S. K., Simons J. F., Egholm M., Pettis J. S., Lipkin W. I. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder.- Science, 2007. 318: 283-287.

5- Blanchard P., Schurr F., Celle O., Cougoule N., Drajnudle P., Thiery R., Faucon J. P., Rriere M., First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (Apis mellifera).- Journal of Invertebrate Pathology, 2008. 99: 348-350.

6- Vanengelsdrop D., Evans J. D., Sagerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B. K., Frazier M., Frazier J., Coxfoster D. L., Chen Y., Underwood R., Tarpy D. R., Pettis J. S., Colony collapse disorder: a descriptive study.- PLoS ONE, 2009. 4 (8): e6481.

7- Alaux C., Brunet J. L., Dussaubat C., Mondet F., Tchamitchan S., Cousin M., Brillard J., Baldy A., Belzunces L. P., Le conte Y., Interactions between Nosema microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (Apis mellifera).- Environmental Microbiology, 2010. 12: 774-782.

8- Higes M., Martin-hernandez R., Botias C., Bailon E. G., Gonzales-porto A., Barrios L., Del nozal M. J., Bernal J. L., Jimenez J. J., Palencia P. G., Meana A., How natural infection by Nosema ceranae causes honeybee colony collapse.- Environmental Microbiology, 2008. 10: 2659-2669.

9- De Miranda J. R., Cordoni G., Budge G., The acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex.- Journal of Invertebrate Pathology, 2010. 103 (supplement): S30-S47.

10- Williams G. R., Tarpy D. R., Vanengelsdrop D., Chauzat M. P., Cox-fosterD. L., Delaplane K. S., Neumann P., Pettis J. S., Rogers R. E. L., Shutler D., Colony collapse disorder in context.- Bioessays, 2010. 32: 845-846.

11- Di prisco G., Pennacchio F., Caprio E., Boncristiani H. F. JR, Evans J. D., Chen Y., Varroa destructor is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, Apis mellifera.- Journal of Genetic Virology, 2011. 92 (1): 151-155.

12- Vidau C., Diogon M., Aufauvre J., Fontbonne R., Vigues B., BrunetJ. L., Texier C., Biron D. G., Blot N., Alaouni H. E., Belzunces L. P., Delabac F., Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by Nosema ceranae.- PLoS ONE, 2011. 6 (6) :e21550.

13- Maini S., Medrzycky P., Porrini C., The puzzle of honey bee losses: a brief review.- Bulletin of Insectology, 2010. 63 (1): 153-160.

15- Pajera L., Colazzo M., Perez- parada A., Niell S., Carrasco- letelier L., Bseil N., Cesio M. V., Heinzen H., Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay.- International Journal of Environmental Research and Public Health, 2011. 8: 3844-3858.

16- Lu C., Warchol K. M., Callahan R. A., In situ replication of honeybee colony collapse disorder.- Bulletin of Insectology, 2012. 65 (1): 99-106.

[16] Farooqi T., A potential link among biogenic amines based pesticides, learning and memory, and colony collapse-disorder: a unique hypothesis.- Neurochemistry International, 2013. 62 (1): 122-136.

17- Matsumo T., Reduction in homing flights in the honey bee Apis Mellifera after a sublethal dose of neonicotinoid insectcides.- Bulletin of Insectology, 2013. 66 (1): 1-9.

18- Erickson B. E., Europe bans three neonicotinoids.- Chemical Engineering News, 2012. 91 (18): 11.

19- Chen M., Lin T., Collins E. M., Lu C., Simultaneous determination of residues in pollen and high fructose corn syrup from eight neonicotinoid insecticides by liquid chromatography- tandem mass spectrometry.- Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. 405 (28): 9251-9264.

20- Laurino D., Manino A., Patetta A., Porporato M., - Toxicity of neonicotinoid insecticides on different honey bee genotypes.- Bulletin of Insectology, 2013. 66 (1): 119-126.

21- Pettis J. S., Vanengelsdrop D., Johnson J., Dively G., Pesticide exposure in honey bee results in increased levels of

the gut pathogen Nosema.- Naturwissenschaften, 2012. 99: 153-158.
22- Tokarz R., Firth C., Street C., Cox-foster D. L., Lipkin W. I., Lack of evidence for an association between irido virus and colony collapse disorder.- PLoS ONE, 2011. 6 (6): e21844.
23- Aanderson D., East I. J., The latest buzz about colony collapse disorder.- Science, 2008. 319 (5864): 724-725.