Iranian Journal of Plant ProtectionScience
Vol 51, No 2, Autumn and winter 2020 (181-194)
DOI: 10.22059/ijpps.2020.305899.1006947

دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۹ (۱۹۴-۱۸۱)

تأثیرات دز زیرکشندهٔ ایمیداکلوپرید بر واکنش‌پذیری زنبور عسل معمولی Apis *mellifera*

سحردلکش رودسری[۱]، سید حسین گلدانساز[۲*]، خلیل طالبی جهرمی[۳]، احمد عاشوری[۳] و چارلز ابرامسون[٤]
۱، ۲ و ۳. به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
٤. **Regents Professor**، دپارتمان روانشناسی، دانشگاه ایالتی اوکلاهما، استیل واتر، امریکا
(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۴/۳۱ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۷/۰۲)

چکیده

ایمیداکلوپرید حشره‌کشی از گروه نئونیکوتینوئیدها است که در کنترل آفات کشاورزی به‌طور گسترده استفاده می‌شود. این حشره‌کش می‌تواند علاوه بر تأثیر روی حشرات آفت، روی حشرات مفید ازجمله زنبور عسل (*Apis mellifera*) نیز تأثیر بگذارد. ازآنجایی‌که یادگیری و حافظه، نقش مهمی در رفتار و ارتباط اجتماعی زنبور عسل دارد، هدف از این پژوهش بررسی یادگیری و حافظهٔ زنبورهای عسل تیمارشده با دز زیرکشندهٔ ایمیداکلوپرید با استفاده از روش واکنش انبساط خرطوم در شرایط کنترل‌شدهٔ آزمایشگاهی بود. در این روش، زمانی که شاخک زنبور عسل با محلول ساکارز تحریک می‌شود، زنبور خرطوم خود را برای مصرف محلول ساکارز باز می‌کند. وقتی محلول ساکارز (محرک غیرشرطی) با محرک‌هایی مانند بو و رنگ (محرک شرطی) جفت شود، زنبور می‌تواند ارتباط بین دو محرک را یاد بگیرد و به یاد آورد. داده‌های به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان دادند که تیمار گوارشی زنبور عسل با این حشره‌کش بر مصرف آب، شربت غیرآلوده و واکنش‌پذیری به آب، تأثیری نگذاشت؛ اما سبب کاهش عملکرد یادگیری، حافظهٔ بویایی، بینایی و واکنش‌پذیری به غلظت‌های مختلف ساکارز شد. نتایج ما نشان می‌دهند که تغییرات ایجادشده توسط دز زیرکشندهٔ ایمیداکلوپرید روی زنبور عسل معمولی بر فعالیت واکنش‌پذیری آن‌ها اثر گذاشته که منجر به اختلال در رفتار چراگری شده و درنهایت سبب کاهش سلامت کلنی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ایمیداکلوپرید، واکنش‌پذیری، یادگیری و حافظه، زنبور عسل.

Effects of sub-lethal dose of imidacloprid on responsiveness of honey bee *Apis mellifera*

Sahar Delkash-Roudsari [1], Seyed Hossein Goldansaz [2], Khalil Telebi-Jahromi [3], Ahmad Ashouri [3], Charles I. Abramson [4]
1, 2, 3. Ph.D. Candidate of Entomology, Associate Professor and Professor, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4. Regents Professor, Department of Psychology ,Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, United States of America
(Received: July 21, 2020 - Accepted: Sept 23, 2020)

ABSTRACT

Imidacloprid is an insecticide from the group of neonicotinoids that is widely used to control agricultural pests. Furthermore, this insecticide can also affect beneficial insects such as honey bees (*Apis mellifera*). Since learning and memory play an important role in honey bee behavior and social communication, this study aimed to investigate the learning and memory of honey bees treated with a sub-lethal dose of imidacloprid using the proboscis' extension reflex method under controlled laboratory conditions. In this method, when the honey bee's antenna is stimulated with a sucrose solution, the bee extends its proboscis to consume sucrose solution. When sucrose solution (unconditioned stimulus) is paired with stimuli such as odor and color (conditioned stimulus), the bee can learn and remember the relationship between the two stimuli. Data from this study showed that the oral treatment of honey bees with this insecticide did not affect water consumption, uncontaminated syrup, and water responsiveness. But it reduced olfactory and visual learning and memory performances, and responsiveness to various sucrose concentrations. Therefore, our results show that the changes made by the sub-lethal dose of imidacloprid have affected honey bee's responsiveness, which ultimately reduced colony health.

Keywords: Imidacloprid, Responsiveness, Learning and Memory, honey bee.

* Corresponding author E-mail: goldansz@ut.ac.ir

مقدمه

زنبور عسل نقش مهمی در گرده‌افشانی گیاهان و محصولات کشاورزی دارد و از مهم‌ترین گرده‌افشان‌ها در دنیا تلقی می‌شود (Lonsdorf *et al*., 2011)؛ بنابراین جزء مهمی در امنیت غذایی و حفظ تنوع زیستی است (Bascompte *et al*., 2006; Fontaine *et al*., 2005; Klein *et al*., 2006)؛ اما طی سال‌های اخیر، تعداد کندوهای زنبورهای عسل در دنیا کاهش یافته است (Goulson *et al*., 2015). همچنین در این سال‌ها، هشدارهایی در مورد کاهش میزان گرده‌افشانی در سراسر جهان گزارش شده است (Aizen & Harder, 2009; Klein *et al*., 2006). بررسی علت‌های این مشکل از زوایای مختلف در دست بررسی است. یکی از علت‌های مطرح، کاربرد وسیع آفت‌کش‌های شیمیایی در مزارع و باغ‌ها است که می‌تواند روی حشرات مفید، ازجمله زنبور عسل اثرگذار باشد. رفتار گرده‌افشانی زنبور نیز می‌تواند توسط آفت‌کش‌ها تحت تأثیر قرار گیرد (Desneux *et al*., 2007).

برای ارزیابی اثرات آفت‌کش‌ها روی زنبور عسل، روش‌های پژوهشی مختلف مانند آزمایش‌های رفتاری، توسعه یافته‌اند (Desneux *et al*., 2007; Thompson, 2003; Pham-Delègue *et al*., 2002). یکی از مهم‌ترین آزمایش‌های رفتاری، واکنش باز شدن خرطوم[1] (PER) در زنبور عسل است که در پاسخ به تحریک شاخک‌ها با محلول ساکارز به‌عنوان پاداش اتفاق می‌افتد (Pankiw & Page, 2003). در طبیعت واکنش باز شدن خرطوم، زمانی رخ می‌دهد که شاخک زنبور عسل هنگام چرا با شهد گل تماس پیدا می‌کند. در آزمایشگاه، زمانی که شاخک‌های حشرات به‌صورت مصنوعی با محلول ساکارز تحریک شود، همان رفتار را نشان می‌دهند (Matsumoto *et al*., 2012).

در جانوران، یادگیری وابسته[2]، توسط محرک شرطی[3] و محرک غیرشرطی[4] رخ می‌دهد. محرک غیرشرطی محرکی است که به‌صورت ذاتی سبب ایجاد پاسخ می‌شود، درصورتی‌که محرک شرطی، یک محرک خنثی و بدون هیچ ارتباط با پاسخ است (Pavlov, 1927). حشرات به دلیل سامانه‌های عصبی به نسبت ساده در مقایسه با مهره‌داران، مدلی مناسب برای مطالعات یادگیری و حافظه هستند و در بین حشرات، زنبورهای عسل بیشترین توانایی یادگیری را دارند (Giurfa, 2007; Giurfa & Sandoz, 2012). زنبور عسل می‌تواند بین پاداش غذایی و محرک‌های حسی مختلف مانند محرک‌های بویایی، محرک‌های رنگی و الگوهای بصری، ارتباط و وابستگی برقرار کند (Giurfa, 2007; Menzel, 1999). واکنش باز شدن خرطوم، قسمتی از رفتار تغذیه‌ای است. زنبور عسل همچنین می‌تواند در طی فرایند شرطی شدن بین محرک شرطی مانند بو و رنگ و محرک غیرشرطی مانند ساکارز ارتباط و وابستگی برقرار کند و زمانی که فقط در معرض محرک شرطی قرار گرفت می‌تواند واکنش باز شدن خرطوم را انجام دهد (Bitterman *et al*., 1983; Frings & Frings, 1949).

اخیراً پژوهش‌ها روی آفت‌کش‌های نئونیکوتینوئیدی متمرکز شده است (Goulson, 2013). این ترکیبات به گیرنده‌های استیل کولین حشرات متصل شده و در غلظت مناسب، سبب مرگ حشره می‌شوند (Jeschke & Nauen, 2008). با وجود نگرانی در مورد اثرات مضر این ترکیبات، آن‌ها به‌طور گسترده در سراسر جهان استفاده می‌شوند (Abrol, 2013). ایمیداکلوپرید یک حشره‌کش سیستمیک و از ترکیبات نئونیکوتینوئیدی است، که بر سامانۀ عصبی مرکزی حشره اثر می‌کند (Schmuck *et al*., 2003). این آفت‌کش، دامنۀ تأثیر وسیعی دارد و با توجه به کارایی بالای آن، استفاده از آن در سراسر جهان در حال افزایش است (Medrzycki *et al*., 2003).

ایران ازنظر تولید عسل و تعداد کلنی در سطح جهانی به ترتیب رتبه چهارم و پنجم را به خود اختصاص داده است (Bee Culture, 2018). در حال حاضر به علت توسعه صنعت زنبورداری در کشور و کاربرد به نسبت گسترده آفت‌کش‌های نئونیکوتینوئیدی در مزارع و باغ‌های ایران، مطالعۀ اثر این گروه از

1. *Proboscis extension reflex* (PER)
2. Associative learning
3. Conditioned stimulus (CS)
4. Unconditioned stimulus (US)

آفت‌کش‌ها روی زنبور عسل ضرورت دارد. یکی از دلایل تلفات زنبور عسل در سال‌های اخیر در کشور، می‌تواند اثر آفت‌کش‌های شیمیایی ازجمله حشره‌کش ایمیداکلوپرید بر رفتار و زیست‌شناسی زنبور باشد. تأثیراتی که دزهای زیرکشندهٔ آفت‌کش‌ها می‌توانند در مراحل مختلف رشد و نمو زنبور عسل ایجاد کنند می‌تواند شامل زنده‌مانی لاروها، شفیره‌ها یا درصد خروج حشرات بالغ و یا حتی تغییرات رفتاری که در حشرات بالغ می‌گذارد باشد (Tavares *et al.*, 2017; Tavares *et al.*, 2015). لذا هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر دز زیرکشندهٔ ایمیداکلوپرید، بر تغییرات رفتاری و تغذیه‌ای با استفاده از واکنش باز شدن خرطوم، در زنبور عسل معمولی *A. mellifera* است.

مواد و روش‌ها

محل اجرا و مکان نمونه‌برداری

آزمایش‌ها در گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (کرج) انجام شد. کندوهای زنبور عسل *A. mellifera* پس از خریداری از یکی زنبورداران کرج در محوطهٔ دانشگاه نگهداری شدند. تغذیهٔ کندوها با محلول ساکارز هفته‌ای دوبار انجام می‌شد. نمونه‌برداری به‌صورت روزانه و هنگام صبح انجام می‌گرفت و نمونه‌ها پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه منتقل می‌شدند.

ترکیب شیمیایی

حشره‌کش ایمیداکلوپرید با فرمولاسیون SC 35% از شرکت ملی شیمی کشاورز تهیه شد و در این آزمایش استفاده شد.

آزمون‌های مرگ‌ومیر و تعیین LC_{50}

اندازه‌گیری LC_{50} با استفاده از روش Miranda *et al.* (۲۰۰۳) و Laurino *et al.* (۲۰۱۳) با کمی تغییر انجام شد. ابتدا آزمون‌های اولیه برای یافتن غلظت‌های بالا و پایین که سبب مرگ‌ومیر حدود ۱۵ تا ۸۰٪ حشرات بالغ کارگر زنبور عسل (بالای ۲۰ روز) می‌شود انجام و سپس آزمون اصلی انجام شد. آزمایش مقدماتی با تعداد ۱۰ زنبور برای تعیین محدودهٔ غلظت‌ها (۰٫۰۵، ۰٫۰۹، ۰٫۱۹، ۰٫۳۸ و ۰٫۷۶ میلی‌گرم در لیتر) و آزمایش اصلی با تعداد ۲۵ زنبور عسل انجام شدند. برای انجام آزمایش زنبورهای بالغ کارگر (سن بیشتر از ۲۰ روز) از سکوی پرواز جلوی کندو جمع‌آوری شدند. زنبورها درون ظروف پلاستیکی تهویه‌دار و در انکوباتور تاریک در دمای ۱±۳۵ درجهٔ سلسیوس و رطوبت٪ ۵±۵۰ نگهداری شدند. پس از انجام آزمایش‌های اولیه، دزهای مختلف ۰٫۰۵، ۰٫۰۹، ۰٫۱۹، ۰٫۳۸ و ۰٫۷۶ میلی‌گرم در لیتر ایمیداکلوپرید در محلول ساکارز ۵۰ درصد، آماده و از میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری به‌عنوان ظرف غذا[5] استفاده شد و برای تغذیه، در اختیار زنبورها قرار گرفت. یک ساعت بعد از تیمار، محلول ساکارز بدون حشره‌کش، جایگزین محلول ساکارز حاوی دزهای زیرکشندهٔ ایمیداکلوپرید شد و تعداد زنبورهای مرده، ۲۴ ساعت پس از شروع آزمون، ثبت گردید. از ظرف غذا حاوی محلول ساکارز ۵۰ درصد به‌عنوان شاهد استفاده شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد.

چگونگی در معرض قرار دادن زنبور برای انجام آزمون‌های رفتاری و تغذیه‌ای

آزمایش‌ها در بهار و تابستان ۱۳۹۷ روی ترکیب سنی (بالای ۲۰ روز) زنبورهای عسل کارگر که از سکوی ورودی کندو جمع‌آوری شده بودند، انجام شد. زنبورهای بالغ جمع‌آوری‌شده پس از انتقال به آزمایشگاه به ظروف پلاستیکی تهویه‌دار (۸ سانتی‌متر ارتفاع،۷ سانتی‌متر قطر) منتقل شدند. بر اساس روش EPPO ۱۷۰ (EPPO, 1992) زنبورهای جمع‌آوری‌شده برای ۲ ساعت گرسنه ماندند. سپس محلول شربت حاوی حشره‌کش (محلول ساکارز ۵۰ درصد حاوی دز زیرکشندهٔ حشره‌کش) یا شربت بدون حشره‌کش (شاهد) و آب، درون میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری به مدت ۲ ساعت در اختیار زنبورها قرار داده شد. شش

5. Feeder

تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد. هر تکرار شامل ۳۰ زنبور کارگر بود.

آزمون‌های رفتاری (واکنش‌پذیری به آب، ساکارز، محرک بویایی و نور)

دو ساعت پس‌ازآنکه زنبورها در معرض محلول حاوی حشره‌کش قرار گرفتند (توصیف‌شده در پاراگراف قبل)، روی یخ بی‌حس شده و روی سرسمپلرهای آبی‌رنگ سوار شدند. با استفاده از نوارچسب‌های پلاستیکی، سر زنبور طوری قرار گرفت که فقط شاخک و قطعات دهانی آن‌ها آزادانه حرکت کند (شکل ۱). برای ثابت نگه داشتن قسمت پایین بدن زنبور، از تکه‌ای پنبه استفاده شد. این زنبورها، ۳ تا ۴ ساعت درون انکوباتور در شرایط تاریکی کامل، دمای ۱±۳۵ درجۀ سلسیوس و رطوبت ۵±۵۰ درصد قرار داده شدند تا با شرایط جدید تطابق یابند.

شکل ۱. زنبورهای عسل محصورشده در تیپ‌های آبی‌رنگ برای انجام آزمون‌های رفتاری

Figure 1. Harnessed honey bees with plastic tape in blue tips to perform behavioral tests

واکنش‌پذیری زنبور عسل به آب و ساکارز

بعد از در معرض قرار گرفتن گوارشی (توصیف‌شده در بند ۴) آزمون واکنش باز شدن خرطوم زنبور عسل با آب انجام شد. برای انجام این آزمون، شاخک زنبور عسل، با آب تحریک شد و تعداد واکنش باز شدن خرطوم در گروه تیمار و شاهد ثبت گردید. همچنین برای آزمون واکنش باز شدن خرطوم به محلول ساکارز، شاخک زنبور با غلظت‌های ۰٫۰۳، ۰٫۱، ۱، ۳، ۱۰ و ۳۰ درصد محلول ساکارز به فاصله زمانی ۳ دقیقه‌ای تحریک شد و تعداد واکنش باز شدن خرطوم در گروه تیمار و شاهد ثبت گردید (Aliouane *et al.*, 2009).

واکنش‌پذیری زنبور عسل به بو

برای انجام این آزمایش، دز زیرکشندۀ ایمیداکلوپرید به زنبور خورانده شد (توصیف‌شده در بند ۴) و بعد از آماده شدن نمونه‌ها برای آزمایش‌های رفتاری، زنبورهایی انتخاب شدند که با تماس ساکارز ۵۰ درصد به شاخکشان، واکنش باز شدن خرطوم را نشان دادند. برای آزمایش شرطی شدن، محرک شرطی ۱۰ میکرولیتر لینالول خالص (بوی معمولی گل‌ها) روی کاغذهای صافی واتمن ریخته شد و داخل سرنگ‌های ۵ میلی‌لیتری قرار داده شد و هر زنبور به مدت ۶ ثانیه، در معرض این بو قرار گرفت. بعد از ۳ ثانیه طی دریافت بو، محلول ساکارز ۵۰ درصد با استفاده از خلال‌دندان با شاخک زنبور تماس داده شد و فوراً پس از باز شدن خرطوم، همان محلول ساکارز (قبل از اینکه دریافت بو پایان یابد) به‌عنوان پاداش به زنبور داده شد. این آزمایش ۳ بار با فاصله زمانی ۱۰ دقیقه‌ای انجام شد، پس از یک ساعت، هر زنبور در معرض محرک شرطی (بو) قرار گرفت (فاز حذف) و تعداد بازشدن‌های خرطوم در طی این آزمایش، به‌صورت بله یا خیر، ثبت شد (Al Naggar *et al.*, 2015; Aliouane *et al.*, 2009; Decourtye *et al.*, 2005).

واکنش‌پذیری زنبور عسل به رنگ

برای انجام این آزمایش زنبور از طریق گوارش در معرض حشره‌کش قرار گرفت و بعد از آماده شدن

نمونه‌ها برای آزمایش رفتاری زنبورهایی انتخاب شدند که با تماس ساکارز ۵۰ درصد، به شاخکشان، واکنش انبساط خرطوم را نشان دهند. برای آزمایش شرطی شدن، محرک شرطی لامپ LED آبی‌رنگ (شدت نور ۹۰ لوکس) بود که زنبور عسل، ترجیح خاصی به این رنگ نشان می‌دهد.

هر زنبور به مدت ۸ ثانیه در معرض نور آبی قرار گرفت و در ۴ ثانیه پایانی، محلول ساکارز ۵۰ درصد توسط خلال‌دندان با شاخک حشره تماس داده شد و بلافاصله پس از باز شدن خرطوم، همان محلول ساکارز به‌عنوان پاداش به زنبور داده شد. این آزمایش ۱۰ بار و در محیط تاریک انجام شد و فاصلهٔ بین هر آزمایش ۱۰ دقیقه بود.

سپس به‌منظور یادگیری رنگ آموخته‌شده، یک ساعت بعد از انجام آخرین آزمایش شرطی شدن، هر زنبور به مدت ۸ ثانیه در معرض محرک شرطی (رنگ) قرار گرفت و تعداد باز شدن‌های خرطوم شرطی شده طی این آزمایش ثبت شد (Dobrin & Fahrbach, 2012).

آزمون‌های تغذیه‌ای (میزان مصرف آب، شربت آلوده و غیر آلوده)

دو ساعت پس‌ازاینکه زنبور در معرض محلول ساکارز حاوی دز زیرکشندهٔ ایمیداکلوپرید (توصیف‌شده در بند ۴) قرار گرفت، محلول ساکارز غیر آلوده و آب به مدت ۲۴ ساعت در اختیار آن‌ها قرار داده شد. میزان مصرف شربت آلوده، ۲ ساعت پس از مصرف و میزان شربت غیر آلوده و آب، ۲۴ ساعت پس از مصرف، اندازه‌گیری شد (Aliouane *et al*., 2009; Ramirez-Romero *et al*., 2008).

تجزیه آماری

از نرم‌افزار Polo Plus جهت تعیین LC_{50} و حدود اطمینان استفاده شد. از آزمون‌های T و کای اسکوئر نرم‌افزار SPSS 24 در سطح ۵ درصد برای تجزیه‌وتحلیل آزمایش‌های تغذیه‌ای و رفتاری استفاده شد.

نتایج

آزمون‌های مرگ‌ومیر و تعیین LC_{50} و LC_{30}

جدول ۱ مقدار LC_{50} و LC_{30} گوارشی پس از ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد. در این آزمایش میزان دز زیرکشند برای ایمیداکلوپرید ۰/۱۶ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد که در آزمون‌های رفتاری و تغذیه‌ای استفاه شد.

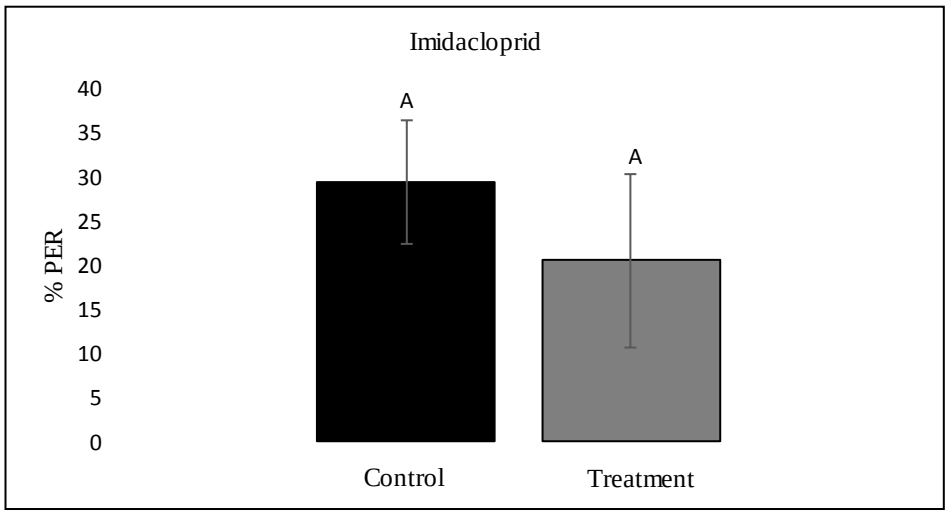
جدول ۱. تعیین LC_{50} و LC_{30} گوارشی ایمیداکلوپرید روی زنبور عسل معمولی *Apis mellifera*

Table 1. Determination of oral LC_{50} and LC_{30} of imidacloprid on honey bee, *Apis mellifera*

Exposure	Number of honey bees	LC_{50} (mg/l)	LC_{30} (mg/l)	C.I.95%	χ^2	D.F
Oral	25	0.32	-	0.444 – 0.246	8.046	13
	-	-	0.16	0.217 – 0.105		

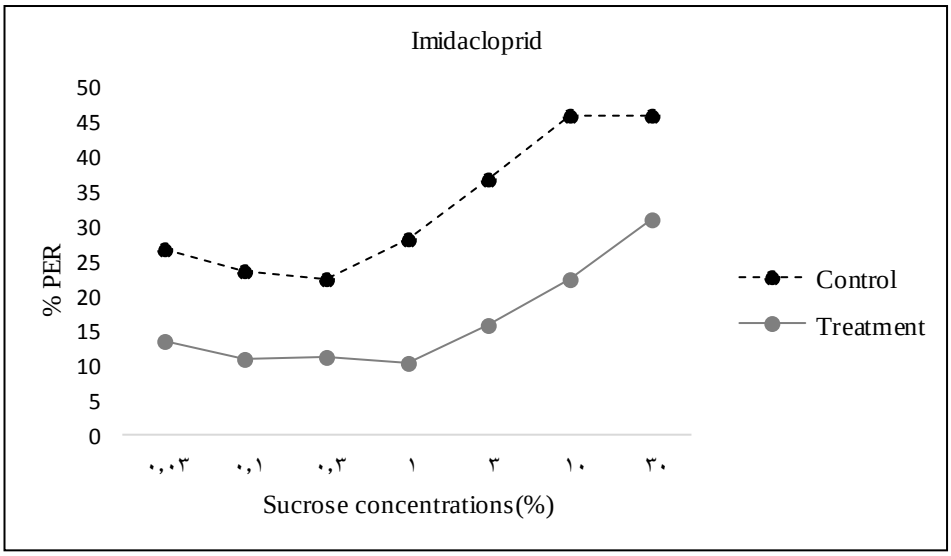
واکنش‌پذیری (PER) زنبور عسل به آب و ساکارز

در معرض قرارگیری گوارشی زنبور عسل با دز زیرکشندهٔ ایمیداکلوپرید اثری بر واکنش‌پذیری به آب در گروه تیمار و شاهد (شکل ۲ الف) نداشت؛ اما افزایش معنی‌داری در واکنش‌پذیری به غلظت‌های مختلف ساکارز در گروه تیمار و شاهد مشاهده شد (شکل ۲ ب).



شکل ۲. (الف) واکنش‌پذیری زنبورهای عسل به آب بعد از قرارگرفتن در معرض دز زیرکشندۀ ایمیداکلوپرید.

Figure 2. (A) Water responsiveness of honey bees after sub-lethal exposure to imidacloprid. Treatments with different letters are significantly different at P<0.05.



شکل ۲. (ب) واکنش‌پذیری زنبورهای عسل به غلظت‌های مختلف ساکارز بعد از قرارگرفتن در معرض دز زیرکشندۀ ایمیداکلوپرید.

Figure 2. (B) Sucrose responsiveness of honey bees after sub-lethal exposure to imidacloprid.

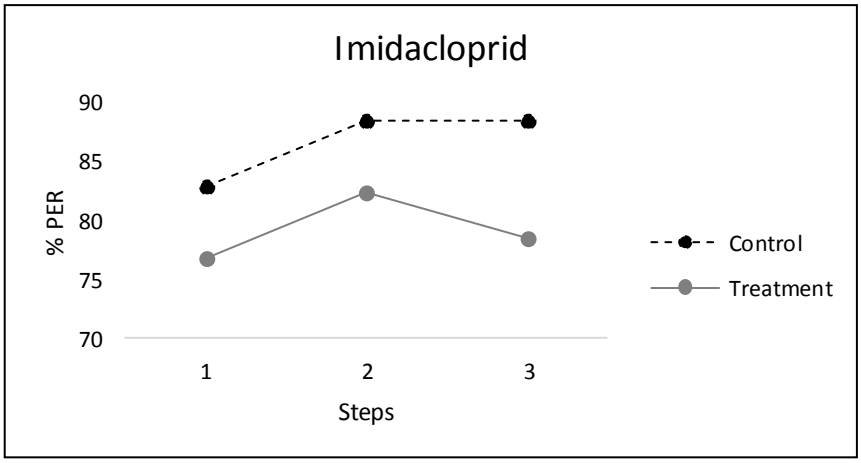
واکنش‌پذیری (PER) زنبور عسل به بو

در واکنش‌پذیری زنبور عسل به بو اختلاف معنی‌داری در گروه تیمارشده با محلول ساکارز حاوی دز زیرکشندۀ ایمیداکلوپرید (LC_{30}) و گروه شاهد در مراحل یادگیری (شکل ۳ الف) و حافظه (شکل ۳ ب) مشاهده شد. نتایج نشان دادند ایمیداکلوپرید یادگیری و حافظۀ بویایی را دچار اختلال می‌کند.

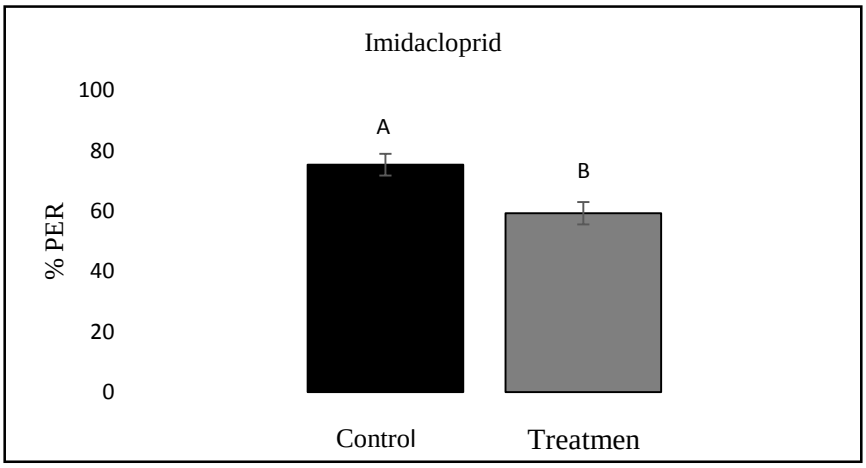
واکنش‌پذیری (PER) زنبور عسل به رنگ

در معرض قرارگیری گوارشی با محلول ساکارز حاوی دز زیرکشندۀ ایمیداکلوپرید (LC_{30}) اثرات منفی بر یادگیری بینایی زنبور عسل‌های تیمارشده و تیمارنشده در مراحل یادگیری (شکل ۴ الف) و حافظه (شکل ۴ ب) داشت.

الف.

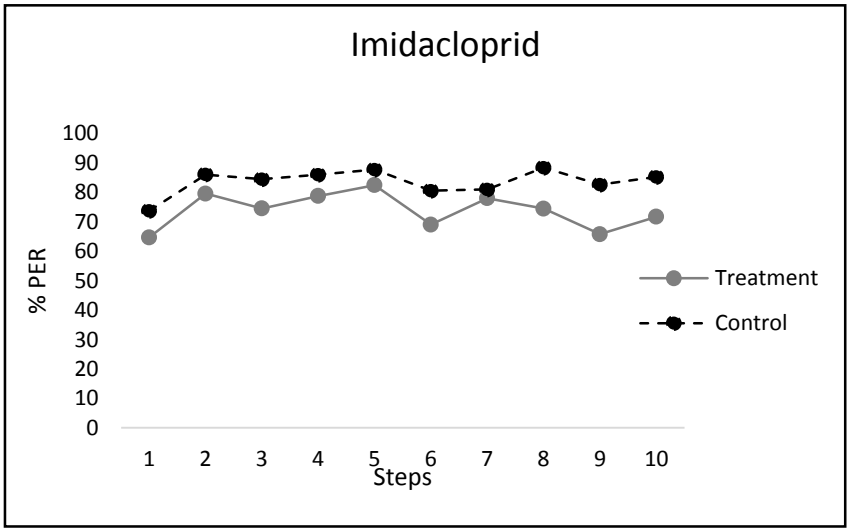


ب.

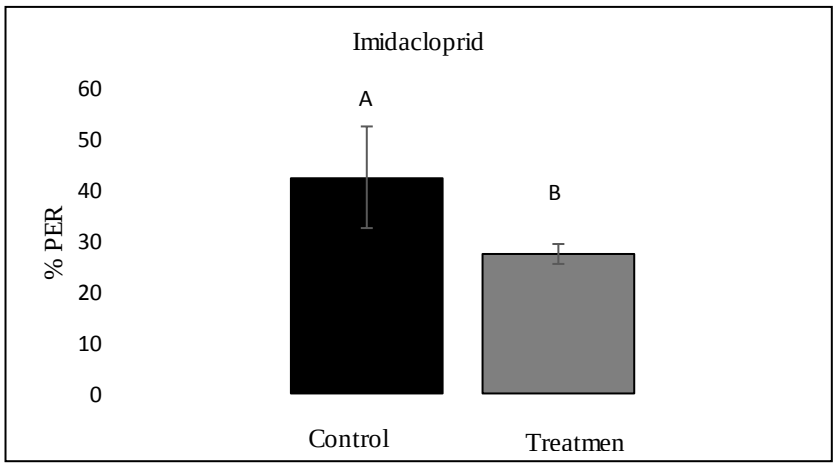


شکل ۳. عملکرد یادگیری بویایی (الف) و حافظه (ب) در زنبورهای عسل بعد از قرارگرفتن در معرض دز زیرکشندهٔ ایمیداکلوپرید. حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار $p<0.05$ هستند.

Figure 3. Olfactory learning (A) and memory (B) performance of honey bees after sub-lethal exposure to imidacloprid. Treatments with different letters are significantly different at $P<0.05$.



الف.



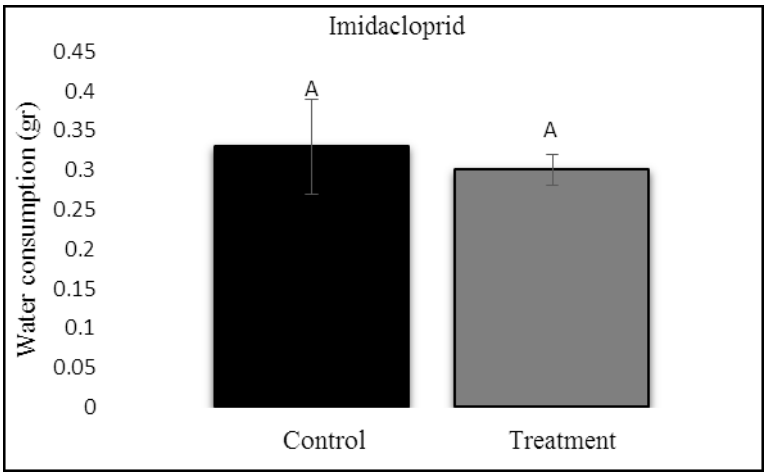
ب.

شکل ۴. عملکرد یادگیری بینایی (الف) و حافظه (ب) در زنبورهای عسل بعد از قرار گرفتن در معرض دز زیرکشندهٔ ایمیداکلوپرید. حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار p<0.05 هستند.

Figure 4. Visual learning (A) and memory (B) performance of honey bees after sub-lethal exposure to imidacloprid. Treatments with different letters are significantly different at P<0.05.

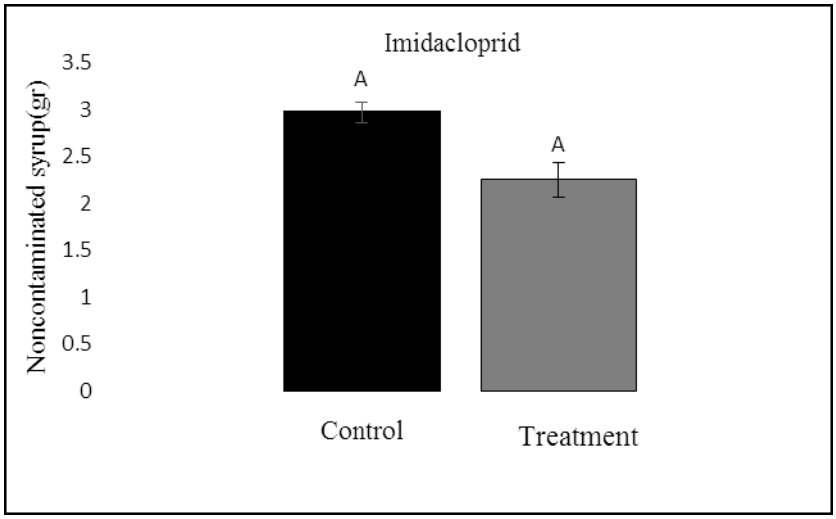
آزمون‌های تغذیه‌ای (میزان مصرف آب، شربت آلوده و غیر آلوده)

بین میزان مصرف آب (شکل ۵ الف) و شربت غیر آلوده (شکل ۵ ب) در گروه تیمار و شاهد ازلحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>0.6 و P>0.08)؛ اما بین میزان مصرف شربت آلوده (حاوی دز زیرکشندهٔ حشره‌کش) (شکل ۵ ج) در زنبورهای عسل ازلحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P>0.03). میزان مصرف شربت آلوده در گروه زنبورهای عسل تیمارشده نسبت به زنبورهای عسل تیمارنشده کاهش داشت.



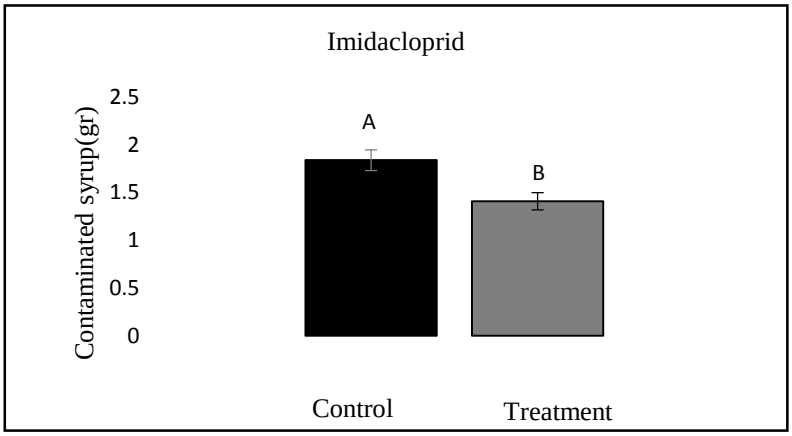
شکل ۵. (الف) مصرف آب (میانگین ± انحراف معیار) اندازه‌گیری‌شده در زنبورهای عسل تیمارشده و تیمارنشده با دز زیرکشندهٔ ایمیداکلوپرید. حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار p<0.05 هستند.

Figure 5. (A) Water consumption (Mean ± SE) measured in honey bees treated and untreated with sub-lethal dose of imidacloprid. Treatments with different letters are significantly different at P<0.05.



شکل ۵. (ب) مصرف شربت بدون حشره‌کش (میانگین ± انحراف معیار) اندازه‌گیری‌شده در زنبورهای عسل تیمارشده و تیمارنشده با دز زیرکشندهٔ ایمیداکلوپرید. حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار p<0.05 هستند.

Figure 5. (B) Consumption of non-contaminated syrup (Mean ± SE) measured in honey bees treated and untreated with sub-lethal dose of imidacloprid. Treatments with different letters are significantly different at P<0.05.



شکل ۵. (ج) مصرف شربت حاوی حشره‌کش (Mean±SE) اندازه‌گیری‌شده در زنبورهای عسل تیمارشده و تیمارنشده با دز زیرکشندهٔ ایمیداکلوپرید. حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار p<0.05 هستند.

Figure 5. (C) Consumption of contaminated syrup (Mean ± SE) measured in honey bees treated and untreated with sub-lethal dose of imidacloprid. Treatments with different letters are significantly different at P<0.05.

بحث

نگرانی فزاینده‌ای وجود دارد که آفت‌کش‌های کشاورزی، ازجمله نئونیکوتینوئیدها، باعث ایجاد تنش و مرگ‌ومیر کلنی‌های زنبور عسل می‌شوند. ازآنجاکه باقی‌مانده‌های این حشره‌کش‌ها در نمونه‌هایی از گرده، شهد، بافت گیاهان و خاک شناسایی شده است (Bonmatin *et al*., 2003; Cure *et al*., 2000; Schmuck *et al*., 2001) فرض بر این است که توانایی جستجوگری زنبور عسل به‌شدت تحت تأثیر باقی‌مانده این حشره‌کش‌ها که ممکن است از گیاهان آلوده جمع‌آوری کند قرار گرفته و کاهش یابد و به همین دلیل بقای کلنی به خطر بیافتد (Yang *et al*., 2008).

در این بررسی، دز کشندهٔ ۵۰ درصد ایمیداکلوپرید ۰/۳۲ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. بررسی‌های دیگر پژوهش‌گران نشان می‌دهند مقدار LC_{50} گوارشی ایمیداکلوپرید در زنبورهای عسل تیمارشده با این

حشره‌کش دارای مقادیر مختلفی است که این اختلافات ممکن است به علت استفاده از ماده مؤثره یا فرمولاسیون‌های متفاوت، اختلاف در کلنی زنبورهای عسل استفاده‌شده و نیز تفاوت در مرحلۀ فیزیولوژیک زنبور عسل باشد (Al Naggar *et al*., 2015; Ramirez-Romero *et al*., 2005) که باعث می‌شود حساسیت آن‌ها به ترکیبات ناگوارد متفاوت شود (Desneux *et al*., 2007; Wu *et al*., 2011).

در این پژوهش به بررسی اثر دز زیرکشندۀ حشره‌کش ایمیداکلوپرید بر برخی خصوصیات رفتاری و تغذیه‌ای حشرات کامل کارگر زنبور عسل پرداخته شد که مرتبط با رفتار چراگری زنبور عسل هستند. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند که ایمیداکلوپرید می‌تواند سبب کاهش واکنش‌پذیری زنبور عسل به محرک‌های طبیعی و مهمی مانند بو و رنگ شود.

بررسی‌های انجام‌شده توسط سایر پژوهش‌گران نشان می‌دهند که ایمیداکلوپرید می‌تواند روی یادگیری و به یادآوری اطلاعات بینایی اثرات منفی داشته باشد و در شرایط طبیعی سبب کاهش چراگری و جهت‌یابی زنبور عسل شود. (Han, Niu, Lei, Cui, & Desneux, 2010). همچنین پژوهش‌ها روی زنبور عسل نشان داده‌اند که عوامل مختلفی ازجمله آفت‌کش‌های کشاورزی می‌توانند با اختلال در رفتار چراگری زنبور عسل، شایستگی کلنی را کاهش دهند که این امر، درنهایت، سبب کاهش سلامت و جمعیت کلنی خواهد شد (Cresswell *et al*., 2012; Whitehorn *et al*., 2012). بررسی‌های دیگر نشان می‌دهند که تیمار گوارشی و تماسی دو آفت‌کش نئونیکوتینوئیدی تیامتوکسام و استامی‌پرید در زنبور عسل دارای نتایج متفاوت است. به‌این‌ترتیب که تیامتوکسام تأثیری روی مصرف آب و واکنش‌پذیری به آب در زنبورهای عسل تیمارشده نداشت ولی استامی‌پرید میزان مصرف آب را در زنبورهای تیمارشده به‌صورت گوارشی افزایش داد، اما تأثیری در واکنش‌پذیری به آب نداشت (Aliouane *et al*., 2009). همچنین در معرض قرارگیری گوارشی با تیامتوکسام واکنش‌پذیری به ساکارز را در زنبور عسل‌های تیمارشده کاهش داده اما تیمار تماسی با تیامتوکسام اثری روی واکنش‌پذیری به ساکارز نداشت (Aliouane *et al*., 2009) در همین بررسی نشان داده شد که در معرض قرارگیری گوارشی و تماسی با استامی‌پرید تأثیری بر واکنش‌پذیری ساکارز ندارد (Aliouane *et al*., 2009) تیمار گوارشی با تیامتوکسام بر عملکرد یادگیری بویایی بی‌تأثیر و تیمار تماسی، عملکرد بویایی را کاهش داد. تیمار گوارشی و تماسی با استامی‌پرید تأثیری بر عملکرد بویایی نداشت (Aliouane *et al*., 2009). دیمارز و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که تیامتوکسام در غلظت مزرعه‌ای، سبب کاهش واکنش‌پذیری زنبور عسل به ساکارز می‌شود. طبق بررسی‌های اقبال و همکاران (۲۰۱۸) تیمار گوارشی ایمیداکلوپرید در غلظت یافت‌شده در شهد و گرده، در زنبورهای عسل *Apis mellifera jemenitica* Ruttner سبب کاهش یادگیری و حافظه شده و تأثیرات منفی این حشره‌کش با بالا رفتن دز، افزایش می‌یابد. ویلیامسون و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند مصرف دز زیرکشندۀ ایمیداکلوپرید اثری روی یادگیری و حافظۀ زنبور عسل معمولی ندارد. ایری و همکاران (۲۰۱۲) هم نشان دادند دز زیرکشندۀ ایمیداکلوپرید بر واکنش‌پذیری به ساکارز اثری ندارد. بررسی‌های انجام‌شده توسط سایر پژوهش‌گران با نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه مطابقت دارد به سبب اینکه که تأثیر آفت‌کش‌های کشاورزی استفاده‌شده در زیست‌بوم‌های کشاورزی بر زنبورهای عسل متغیر است.

علل تأثیر متفاوت ایمیداکلوپرید در یک آزمایش ممکن است به روش آزمایش، تنوع در اثرات ایجادشده توسط ایمیداکلوپرید و به کلنی و مرحلۀ فیزیولوژیکی زنبور عسل مرتبط باشد (Al Naggar *et al*., 2015; Démares *et al*., 2016). دو متابولیت مهم ایمیداکلوپرید شامل الفین و ۵- هیدروکسی ایمیداکلوپرید هستند. پژوهش‌ها با استفاده از HPLC-ms/ms نشان می‌دهند که حداکثر میزان حضور این دو ترکیب، زمانی است که مولکول ایمیداکلوپرید در بدن حشره در حال کاهش است (Suchail,

Debrauwer, & Belzunces, 2004)، بنابراین می‌توان این فرضیه را در نظر گرفت که علت ایجاد تغییرات رفتاری پس از تیمار زنبور عسل در پژوهش حاضر، به علت حضور این دو متابولیت یا سایر متابولیت‌های ایمیداکلوپرید به همراه باقی‌ماندهٔ ایمیداکلوپرید در بدن زنبور عسل باشد. همچنین این فرضیه مطرح است که تفاوت در پاسخ‌های رفتاری و تغذیه‌ای متفاوت در زنبور عسل تیمارشده با یک دز مشخص از حشره‌کش، می‌تواند به سبب مسیرهای مختلف متابولیکی (Esther *et al*., 2015) حشره‌کش مورداستفاده باشد. به عبارتی طی متابولیسم و انجام واکنش‌های شیمیایی اکسیداسیون، احیا، هیدرولیز و یا مزدوج شدن مولکول حشره‌کش مورداستفاده، می‌تواند به متابولیت‌هایی تبدیل شود که به دلیل تفاوت در عملکرد زیستی نسبت به ترکیب پایه، قسمت‌های مختلفی از بخش‌های فیزیولوژیک بدن زنبور عسل را درگیر نموده و بدین‌سان سبب پاسخ‌های مختلف رفتاری شود.

همچنین می‌توان استدلال نمود که به دلیل تغییر در ساختار شیمیایی مولکول پایه پس از ورود به بدن زنبور عسل متابولیت‌هایی تولید می‌شود که میزان مختلفی از پیوند به جایگاه هدف (Belzunces, Tchamitchian, & Brunet, 2012) را از خود نشان می‌دهند. این تفاوت در میزان اتصال به جایگاه هدف، در بروز پاسخ‌های رفتاری زنبور عسل اثرگذار خواهد بود. رفتارهای متفاوت زنبور عسل به محرک‌های مختلف رفتاری، نیازمند مسیرهای مختلفی از فرایندهای بیوشیمیایی حاصل از ورود حشره‌کش به بدن زنبور عسل است. مسیرهای زیستی که در فرایند تغذیه، واکنش‌پذیری و یادگیری زنبور عسل نقش دارند شامل مسیر بیوشیمیایی نیتریک اکسید است که در حافظه و یادگیری بی‌مهرگان و مهره‌داران (Müller, 2000) نقش ایفا می‌کند و نیز مسیر تولید انرژی است که موجود زنده برای انجام تمام فعالیت‌های درون‌سلولی بدان نیاز دارد، (Agin, Chichery, & Chichery, 2001) ایمیداکلوپرید با ایجاد اختلال در این مسیرهای بیوشیمیایی سبب ایجاد پاسخ‌های رفتاری متفاوت می‌شوند.

نتیجه‌گیری کلی

زنبور عسل از گونه‌های گرده‌افشان مهم اکولوژیکی و اقتصادی در سراسر جهان است. به نظر می‌رسد آفت‌کش‌ها یکی از عوامل مهم در کاهش میزان فعلی جمعیت زنبور عسل باشند. در میان آفت‌کش‌ها، حشره‌کش‌های نئونیکوتینوئیدی مهم‌ترین عامل فشار بر زنبور عسل هستند. نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان می‌دهند، تغییرات ایجادشده توسط دز زیرکشندهٔ حشره‌کش ایمیداکلوپرید روی زنبور عسل معمولی بر فعالیت واکنش‌پذیری و چراگری زنبور عسل اثر گذاشته که درنهایت منجر به اختلال در رفتار چراگری، ذخیره‌سازی شهد و گرده و کاهش سلامتی کلنی می‌شود.

سپاسگزاری

از دکتر محمدرضا بی‌همتا برای راهنمایی‌شان در تجزیه‌وتحلیل‌های آماری تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Abrol, D. P. (2013). Safety of Bees in Relation to Pest Management. In *Asiatic Honey bee Apis cerana* (pp. 575-640): Springer.
2. Agin, V., Chichery, R., & Chichery, M.-P. (2001). Effects of learning on cytochrome oxidase activity in cuttlefish brain. *Neuroreport*, *12*(1), 113-116.
3. Aizen, M. A. & Harder, L. D. (2009). The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current Biology*, *19*(11), 915-918.
4. Al Naggar, Y., Wiseman, S., Sun, J., Cutler, G. C., Aboul-Soud, M., Naiem, E., Mona, M., Seif, A., & Giesy, J. P. (2015). Effects of environmentally-relevant mixtures of four common organophosphorus insecticides on the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, *82*, 85-91.

5. Aliouane, Y., El Hassani, A. K., Gary, V., Armengaud, C., Lambin, M. & Gauthier, M. (2009). Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry, 28*(1), 113-122.
6. Bascompte, J., Jordano, P. & Olesen, J. M. (2006). A symmetric coevolutionary networks facilitate biodiversity maintenance. *Science, 312*(5772), 431-433.
7. Bee Culture. (2018). Iran is either third, or fourth in global honey production. Maybe. *Bee Culture*.
8. Belzunces, L. P., Tchamitchian, S., & Brunet, J.-L .(۲۰۱۲) .Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie, 43*(3), 348-370.
9. Bitterman, M., Menzel, R., Fietz, A. & Schäfer, S. (1983). Classical conditioning of proboscis extension in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology, 97*(2), 107.
10. Bonmatin, J., Moineau, I., Charvet, R., Fleche, C., Colin, M. & Bengsch, E. (2003). A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Analytical Chemistry, 75*(9), 2027-2033.
11. Cresswell, J. E., Desneux, N. & van Engelsdorp, D. (2012). Dietary traces of neonicotinoid pesticides as a cause of population declines in honey bees: an evaluation by Hill's epidemiological criteria. *Pest Management Science, 68*(6), 819-827.
12. Cure, G., Schmidt, H. & Schmuck, R. (2000). Results of a comprehensive field research programme with the systemic insecticide imidacloprid (Gaucho). *IOBC WPRS Bulletin, 23*(3), 6-6.
13. Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., Cluzeau, S. & Pham-Delegue, M. (2005). Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honey bee *Apis mellifera*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 48*(2), 242-250.
14. Démares, F. J., Crous, K. L., Pirk, C. W., Nicolson, S. W & .Human, H. (2016). Sucrose sensitivity of honey bees is differently affected by dietary protein and a neonicotinoid pesticide. *PloS One, 11*(6), e0156584.
15. Desneux, N., Decourtye, A. & Delpuech, J.-M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology, 52*, 81-106.
16. Dobrin, S. E. & Fahrbach, S. E. (2012). Visual associative learning in restrained honey bees with intact antennae. *PloS One, 7*(6), e37666.
17. Eiri, D. M. & Nieh, J. C. (2012). A nicotinic acetylcholine receptor agonist affects honey bee sucrose responsiveness and decreases waggle dancing. *Journal of Experimental Biology, 215*(12), 2022-2029.
18. Esther, E., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C. W., & Nicolson, S. W. (2015). Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Scientific Reports, 5*, 11779.
19. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (1992). Guideline on test methods for evaluating the side-effects of plant protection products on honey bees. *EPPO Bulletin, 22*, 203–215.
20. Fontaine, C., Dajoz, I., Meriguet, J. & Loreau, M. (2005). Functional diversity of plant–pollinator interaction webs enhances the persistence of plant communities. *PLoS Biology, 4*(1), e1.
21. Frings, H. & Frings, M. (1949). The loci of contact chemoreceptors in insects. A review with new evidence. *American Midland Naturalist*, 602-658.
22. Giurfa, M. (2007). Behavioral and neural analysis of associative learning in the honey bee: a taste from the magic well. *Journal of Comparative Physiology A, 193*(8), 801-824.
23. Giurfa, M. & Sandoz, J.-C. (2012). Invertebrate learning and memory: fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honey bees. *Learning & Memory, 19*(2), 54-66.
24. Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology, 50*(4), 977-987.
25. Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C. & Rotheray, E. L .(۲۰۱۵) .Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science, 347*(6229), 1255957.
26. Han, P., Niu, C.-Y., Lei, C.-L., Cui, J.-J. & Desneux, N. (2010). Use of an innovative T-tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects of GM products and pesticides on learning capacity of the honey bee *Apis mellifera* L. *Ecotoxicology, 19*(8), 1612-1619.
27. Iqbal, J., Alqarni, A. & Raweh, H. (2018). Effect of sub-lethal doses of imidacloprid on learning and memory formation of indigenous Arabian bee (*Apis mellifera jemenitica Ruttner*) adult foragers. *Neotropical Entomology*, 1-8.
28. Jeschke, P. & Nauen, R. (2008). Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science* : *Formerly Pesticide Science, 64*(11), 1084-1098.

29. Klein, A. M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C. & Tscharntke, T. (2006). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 274*(1608), 303-313.
30. Laurino, D., Manino, A., Patetta, A. & Porporato, M. (2013). Toxicity of neonicotinoid insecticides on different honey bee genotypes. *Bulletin of Insectology, 66*(1), 119-126.
31. Lonsdorf, E., Ricketts, T., Kremen, C., Winfree, R., Greenleaf, S. & Williams, N. (2011). Crop pollination services. *Natural capital. Theory and practice of mapping ecosystem services. Oxford University Press, Oxford*, 168-187.
32. Matsumoto, Y., Menzel, R., Sandoz, J.-C. & Giurfa, M. (2012). Revisiting olfactory classical conditioning of the proboscis extension response in honey bees: a step toward standardized procedures. *Journal of Neuroscience Methods, 211*(1), 159-167.
33. Medrzycki, P., Montanari, R., Bortolotti, L., Sabatini, A. G., Maini, S. & Porrini, C. (2003). Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. *Bulletin of Insectology, 56*, 59-62.
34. Menzel, R. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A, 185*(4), 323-340.
35. Miranda, J. E., Navickiene, H. M. D., Nogueira-Couto, R. H., De Bortoli, S. A., Kato, M. J., da Silva Bolzani, V. & Furlan, M. (2003). Susceptibility of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to pellitorine, an amide isolated from Piper tuberculatum (Piperaceae). *Apidologie, 34*(4), 409-415.
36. Müller, U. (2000). Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honey bees. *Neuron, 27*(1), 159-168.
37. Page Jr, R., Erber, J. & Fondrk, M. (1998). The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A, 182*(4), 489-500.
38. Pankiw, T. & Page, R. (2003). Effect of pheromones, hormones, and handling on sucrose response thresholds of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A, 189*(9), 675-684.
39. Pavlov, I. (1927). *Conditioned Reflexes*.(1960 reprint). In: New York: Dover Books.
40. Pham-Delègue, M.-H., Decourtye, A., Kaiser, L. & Devillers, J. (2002). Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. *Apidologie, 33*(5), 425-432.
41. Ramirez-Romero, R., Desneux, N., Decourtye, A., Chaffiol, A. & Pham-Delègue, M. (2008). Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L.(Hymenoptera, Apidae)? *Ecotoxicology and Environmental Safety, 70*(2), 327-333.
42. Ramirez-Romero, R., Chaufaux, J., Pham-Delègue, M. (2005). Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honey bee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie. 36***,** 601-611.
43. Scheiner, R., Page, R. E. & Erber, J. (2004). Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*) .*Apidologie, 35*(2), 133-142.
44. Schmuck, R., Nauen, R. & Ebbinghaus-Kintscher, U. (2003). Effects of imidacloprid and common plant metabolites of imidacloprid in the honey bee: toxicological and biochemical considerations. *Bulletin of Insectology, 56*(1), 27-34.
45. Schmuck, R., Schöning, R., Stork, A. & Schramel, O. (2001). Risk posed to honey bees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science, 57*(3), 225-238.
46. Suchail, S., Debrauwer, L. & Belzunces, L. P. (2004). Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science, 60*(3), 291-296.
47. Tavares, D. A., Dussaubat, C., Kretzschmar, A., Carvalho, S. M., Silva-Zacarin, E. C., Malaspina, O., Geraldine, B., Brunet, J. L. & Belzunces, L. P. (2017). Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. *Environmental Pollution, 229*, 386-393.
48. Tavares, D. A., Roat, T. C., Carvalho, S. M., Silva-Zacarin, E. C. M. & Malaspina, O. (2015). In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere, 135*, 370-378.
49. Thompson, H. M. (2003). Behavioural effects of pesticides in bees–their potential for use in risk assessment. *Ecotoxicology, 12*(1-4), 317-330.
50. Whitehorn, P. R., O'connor, S., Wackers, F. L. & Goulson, D. (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 1215025.

51. Williamson, S. M., Baker, D. D. & Wright ,G. A. (2013). Acute exposure to a sublethal dose of imidacloprid and coumaphos enhances olfactory learning and memory in the honey bee *Apis mellifera*. *Invertebrate Neuroscience*, *13*(1), 63-70.
52. Wu, J. Y., Anelli, C. M. & Sheppard, W. S. (2011). Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PloS One*, *6*(2), e14720.
53. Yang, E., Chuang, Y., Chen, Y. & Chang, L. (2008). Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, *101*(6), 1743-1748.