

亚致死浓度噻虫嗪对西方蜜蜂免疫 相关基因表达的影响^{*}

施腾飞^{1,2**} 王宇飞¹ Sawyer Burton³ 齐磊² 余林生^{2***}

(1. 安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036;

3. 安徽农业大学国际教育学院, 合肥 230036)

摘要 【目的】新烟碱类农药是目前全球应用最广泛的一类农药, 大量研究表明亚致死量新烟碱类农药能够影响蜜蜂的采集、学习和记忆等行为。本文主要探究亚致死浓度新烟碱类农药噻虫嗪对西方蜜蜂 5 种免疫相关基因: Abaecin 类抗菌肽 (ABA)、Hymenoptaecin 类抗菌肽 (HYM)、防御素 (Defensin, DEF)、葡萄糖脱氢酶 (Glucose dehydrogenase, GLD) 和溶解酵素 (Lysozyme, LYS) 表达及蜜蜂个体生存的影响。【方法】(1) 通过饲喂管法确定噻虫嗪对蜜蜂的经口急性毒性; (2) 对蜜蜂长期 (10 d) 饲喂亚致死浓度 (100、10、2.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 噻虫嗪, 然后运用荧光定量 PCR 技术检测了蜜蜂免疫相关基因的表达变化, 并统计各组蜜蜂的存活率。【结果】(1) 噻虫嗪对蜜蜂经口半数致死浓度 $\text{LC}_{50} = 692 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; (2) 亚致死浓度噻虫嗪对 ABA、DEF 和 LYS 表达没有显著影响; 但能够极显著的降低 HYM 表达水平 ($P < 0.01$); 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 噻虫嗪处理能显著增加蜜蜂 GLD 表达 ($P < 0.05$)。【结论】研究表明亚致死浓度噻虫嗪能够抑制蜜蜂免疫相关基因 HYM 表达, 这对于从分子水平上探究新烟碱类农药对蜜蜂健康和生存的影响具有一定的生物学意义。

关键词 西方蜜蜂, 噻虫嗪, 免疫相关基因, 存活率

Sublethal effects of thiamethoxam on immune related gene expression in honey bees (*Apis mellifera* L.)

SHI Teng-Fei^{1,2**} WANG Yu-Fei¹ Sawyer Burton³ QI Lei² YU Lin-Sheng^{2***}

(1. College of Plant Protection; Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China; 2. College of Animal Science & Technology, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China; 3. College of International Education, Anhui Agriculture University, Hefei 230036, China)

Abstract [Objectives] Neonicotinoid pesticides are now the most widely used pesticides in the world. Studies indicate that sublethal doses of these pesticides affect the foraging, learning, and memory, of honey bees. This study investigated the sublethal effects of thiamethoxam on immune related gene expression in honey bees (*Apis mellifera* L.). [Methods] (1) The LC_{50} of thiamethoxam to honey bees was determined using the “oral-feeding tube” method; (2) The expression levels of 5 immune related genes: Abaecin (ABA), Hymenoptaecin (HYM), Defensin (DEF), Glucose dehydrogenase (GLD), and Lysozyme (LYS), and the survival of honey bees, were measured after bees had been fed sublethal concentrations (100, 10 and 2.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) of thiamethoxam over ten days. [Results] (1) the LC_{50} value of thiamethoxam was 692 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; (2) There were no significant differences in the expression levels of ABA, DEF and LYS relative to the control, but expression levels of HYM were significantly ($P < 0.01$), and strongly, inhibited by sublethal concentrations of thiamethoxam, and GLD was significantly ($P < 0.05$) up-regulated by 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ thiamethoxam. [Conclusion] The results suggest that sublethal concentrations of thiamethoxam can suppress HYM expression. These results are important for exploring the effects of neonicotinoid pesticides

*资助项目 Supported projects: 国家蜂产业技术体系建设专项 (CARS-45-KXJ9)

**第一作者 First author, E-mail: stf0623@163.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: yulinsheng@ahau.edu.cn

收稿日期 Received: 2016-11-12, 接受日期 Accepted: 2017-05-10

on honeybee survival and health at the molecular level.

Key words *Apis mellifera*, thiamethoxam, immune related gene, survival

蜜蜂是最重要的经济授粉昆虫(Klein *et al.*, 2007), 近年蜜蜂种群骤减引起全球的关注, 如欧洲蜜蜂饲养量比 1985 年下降了 1/4, 而 2005 年北美洲蜜蜂饲养量比 1947 年更是减少了一半还要多(Goulson *et al.*, 2015)。然而引起蜂群数量减少的具体因素现在还不明了, 这给养蜂人和蜂业科学家带来了巨大的挑战。大量研究表明这种现象可能是受到病虫害、农药、蜂螨、环境污染等因素的综合影响(Potts *et al.*, 2010), 其中, 农药特别是新烟碱类农药被认为是可能引起蜂群数量下降的重要因素之一(Farooqui, 2013; Van der Sluijs *et al.*, 2013)。

新烟碱类农药作为一种烟碱型乙酰胆碱受体(Nicotinic acetylcholine receptor, NACHR)激动剂, 它能够通过与烟碱型的乙酰胆碱受体结合, 使害虫异常兴奋, 全身痉挛麻痹而死(Matsuda *et al.*, 2001)。虽然多数新烟碱类农药对蜜蜂是剧毒的(Laurino *et al.*, 2011; Henry *et al.*, 2015), 但是鲜有关于田间新烟碱类农药引起蜜蜂急性致死的报道, 不过其对蜜蜂的亚致死效应是不容小觑的。亚致死剂量的噻虫嗪、吡虫啉和噻虫胺能够引起蜜蜂运动和飞行麻痹现象(Charreton *et al.*, 2015), 并且影响蜜蜂的学习记忆能力以及嗅觉功能(Alkassab and Kirchner, 2016; Démares *et al.*, 2016)。而且田间实验表明新烟碱类农药能够损害工蜂采集蜂的定位飞行和采集能力(Yang *et al.*, 2008; Tison *et al.*, 2016)。

此外, 研究显示长期接触亚致死剂量的新烟碱类农药能够使蜂群感染病虫害和病毒的几率增加(Alaux *et al.*, 2010; Vidau *et al.*, 2011; James and Xu, 2012; Pettis *et al.*, 2012; Alburaki *et al.*, 2015), 这些都会大大的降低了蜂群的存活几率, 这表明亚致死量新烟碱类农药可能是通过降低蜜蜂自身免疫力增加其感染病虫害的几率而间接的损害蜜蜂的健康。在本研究

中, 我们主要探究了: 亚致死浓度噻虫嗪对西方蜜蜂个体存活率的影响; 亚致死浓度噻虫嗪对西方蜜蜂 5 种免疫相关基因: Abaecin 类抗菌肽(ABA)、Hymenoptaecin 类抗菌肽(HYM)、防御素(Defensin, DEF)、葡萄糖脱氢酶 Glucose dehydrogenase (GLD) 和溶解酵素(Lysozyme, LYS)表达的影响。这对于进一步探究新烟碱类农药损害蜜蜂健康的分子机制有着重要的生物学意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

RNAiso Plus、PrimeScript®RT reagent Kit (Perfect Real Time)、SYBR® Premix ExTaq™ (TilRNaseH plus)均购于 TaKaRa 宝生物公司; 原药噻虫嗪(分析纯)购于北京百灵威科技有限公司; 荧光定量 PCR 仪为 ABI StepOnePlus™ Real-Time PCR System; NanoDrop2000 分光光度计。

1.2 蜜蜂

在实验前的 2~3 个月对蜂群进行治螨处理, 然后从西方蜜蜂蜂群中提出 1 张工蜂封盖子巢脾(采自安徽农业大学蜂业研究所种蜂场)至恒温恒湿培养箱里培养 12 h (35℃, RH 40%, 黑暗), 然后收集 12 h 内羽化的蜜蜂于蜂笼中, 每笼 60 头蜜蜂。

1.3 急性毒性

噻虫嗪粉剂(纯度>98%)溶于丙酮中制成母液, 分装后保存在 -20℃ 条件下备用。根据预实验结果, 将噻虫嗪母液溶于 50%糖水中配制成 5 个系列浓度(1.5、1、0.75、0.4、0.3 mg·kg⁻¹), 丙酮终体积比为 0.03%。把等体积丙酮溶于 50%糖水中作为丙酮对照组, 本实验设置了 6 个处理组, 每组 60 头蜜蜂。用足量正常 50%糖水和花

粉对各组蜜蜂正常饲喂 7 d, 到第 8 天首先将所有组蜜蜂置于 12.5 °C 环境中饥饿 2 h; 然后转移至 30 °C 环境中恢复 0.5 h, 清理死亡和状态不佳的蜜蜂, 记录各组蜜蜂剩余数; 最后运用饲喂管法对每组蜜蜂分别饲喂足量相对应被污染的 50%糖水, 自由进食 2 h 后将污染的糖水取出, 并更换成正常的 50%糖水。定时观察蜜蜂状态并统计各处理组 48 h 后的死亡数。

1.4 亚致死浓度处理

研究表明噻虫嗪在在花蜜和花粉中的残留量分别为 $0.5\sim 11.0\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $1.0\sim 95.2\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Dively and Kamel, 2012; Krupke *et al.*, 2012; Stoner and Eitzer, 2012; Pilling *et al.*, 2013), Dively 和 Kamel (2012) 的调查发现噻虫嗪在植物叶和花中的残留量更高达 $140\sim 175\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 根据以上田间调查结果, 我们选择 100、10、2.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 作为本实验中噻虫嗪的亚致死浓度。本研究选择的亚致死剂量 100、10、2.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 均远小于毒力实验得出的噻虫嗪半致死浓度 $\text{LC}_{50} = 692\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 是合理的。噻虫嗪粉剂 (分析纯) 溶于丙酮中制成母液, 分装后保存在 $-20\ ^\circ\text{C}$ 条件下备用。然后每次现取适量母液溶于 50%的糖水中使噻虫嗪浓度分别为 100、10、2.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (丙酮体积比为 0.03%), 把等体积丙酮溶于 50%糖水中作为丙酮对照组 (CK)。本实验共设置 4 个处理组: 100、10、2.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 噻虫嗪组以及丙酮对照组, 每个处理组设置 3 个重复。前 3 d 噻虫嗪组和对照组都运用饲喂管法饲喂足量正常的 50%糖水和花粉, 让蜜蜂适应培养条件。从第 4 天开始, 100、10、2.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以及对照组分别饲喂足量相对应被污染的 50%糖水和花粉。每天定时对糖水和花粉进行更换, 并观察记录各组蜜蜂的状态, 到第 14 天统计各组蜜蜂死亡数并对所有蜜蜂进行收样, 保存在液氮中备用。开始饲喂农药时每组蜜蜂数量记为 N , 收样时每组蜜蜂存活数记为 N_x , 则蜜蜂存活率为 $y = N_x/N \times 100\%$ 。

1.5 引物的设计和合成

本实验所用基因的正向和反向引物由上海

生工生物有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 目的基因和内参基因的正向和反向引物
Table 1 The forward and reverse primer of genes

基因 Genes	序列 Sequence	参考文献 References
ABA	F: TGTCGGCCTTCTCTTCATGG	Yang and Cox-Foster, 2005
	R: TGACCTCCAGCTTTACCCAAA	
HYM	F: ATATCCCGACTCGTTTCCGA	
	R: TCCCAAACCTCGAATCCTGCA	
DEF	F: TGTCGGCCTTCTCTTCATGG	
	R: TGACCTCCAGCTTTACCCAAA	
GLD	F: CTGCACAACCACGTCTCGTT	
	R: ACCGCCGAAGAAGATTTGG	
LYS	F: ACACGGTTGGTCACTGGTCC	
	R: GTCCACGCTTTGAATCCCT	
β -actin	F: TGCCAACACTGTCCTTTCTG	
	R: AGAATTGACCCACCAATCCA	

1.6 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链合成

将 10 头蜜蜂放入液氮进行研磨至粉末, 再按照 RNAiso Plus 的说明提取总 RNA, 并对提取的总 RNA 浓度进行测定。对总 RNA 进行稀释, 使最终的浓度为 500 ng/ μL 。反转录体系为 10 μL 体系: 5 $\times$ Prime Script[®] Buffer (for Real Time) 2 μL ; Prime Script[®] RT Enzyme Mix 1 0.5 μL ; OligodT Primer (50 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL ; Random 6 mers (100 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL ; Total RNA 1 μL ; RNase Free H₂O 5.5 μL 。反转录反应条件: 37 $^\circ\text{C}$ 15 min (反转录反应), 85 $^\circ\text{C}$ 5 s (反转录酶的失活反应)。

1.7 荧光定量 PCR

本实验采用 Ct 值比较法进行基因相对定量, 20 μL 反应体系: SYBR[®] Primix Ex Taq[™] 10 μL ; PCR Forward Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL ; PCR Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL ; ROX Referece Dye 0.4 μL ; DNA 模板 2.0 μL ; dH₂O (灭菌蒸馏水) 6.8 μL ; 共计 20.0 μL 。以上步骤均在冰上操作。每个样品设置 3 个重复, 相应的

基因设置阴性参照。反应条件为：预变性反应：95℃ 30 s；PCR 反应：95℃ 5 s，60℃ 30 s，40 个循环；溶解曲线：95℃ 15 s，60℃ 1 min。本反应以 β -actin 作为内参基因，每个样本重复 4 次，并用 RNase Free dH₂O 代替 cDNA 模板作为阴性对照，以反应体系全部为 RNase Free dH₂O 作为空白对照。

1.8 数据分析

运用 SPSS 软件中的概率单位 (Probit) 回归计算噻虫嗪对蜜蜂的半数致死浓度 (LC₅₀) 及 95% 置信区间；运用 SPSS Statistics 单因素方差分析 (ANOVA) 对各组蜜蜂存活率和基因表达差异进行分析，并运用 Duncan's 进行显著性差异检验；文中的图形则都运用 GraphPad Prism 5 软件制作。

2 结果与分析

2.1 急性毒性

2.1.1 蜜蜂状态 噻虫嗪处理组蜜蜂前期均表现为激烈挣扎、兴奋等中毒症状，后期表现为活动力减弱或仰躺、抽搐、行动缓慢、反应迟钝等中毒症状，死亡蜜蜂身体蜷缩，高浓度处理组表现尤为明显。对照组则未表现出上述症状。

2.1.2 噻虫嗪对蜜蜂的毒力测定 根据毒力测定结果，运用 SPSS 软件中的概率单位 (Probit) 回归计算建立了噻虫嗪对蜜蜂 48 h 后的经口毒力回归方程 (表 2)。

2.2 亚致死效应

2.2.1 蜜蜂状态 亚致死浓度噻虫嗪处理后的前 4 d，各噻虫嗪处理组和对照组蜜蜂状态都比较安静，聚团现象较明显，只有少许几头蜜蜂在蜂笼中乱爬。100 μg·kg⁻¹ 和 10 μg·kg⁻¹ 组蜜蜂分

别在处理后的第 5 天和第 8 天变得异常兴奋，在蜂笼中乱爬乱飞乱撞，而 2.2 μg·kg⁻¹ 组和对照组蜜蜂在处理的 10 d 内总体都比较安静，只有少数几头蜜蜂表现出急躁的状态。

2.2.2 蜜蜂存活率 蜜蜂在恒温恒湿培养 3 d 后，第 4 天开始饲喂农药前统计并记录各组蜜蜂数量记为 N ，收样时各组存活的蜜蜂数记为 N_x ，则各组蜜蜂存活率则为： $y = N_x/N \times 100\%$ 。100 μg·kg⁻¹ 处理组蜜蜂存活率极显著低于其他组蜜蜂 ($P < 0.01$)，其存活率为对照组的 0.88 倍；而 10 μg·kg⁻¹ 和 2.2 μg·kg⁻¹ 处理组蜜蜂存活率与对照组没有明显的差异 (图 1)。

2.2.3 蜜蜂免疫相关基因表达变化 本研究以 β -actin 为内参基因，以丙酮组蜜蜂作为对照组，运用荧光定量 PCR 技术检测了受不同亚致死浓度 100、10、2.2 μg·kg⁻¹ 噻虫嗪长期胁迫后蜜蜂体内 5 种免疫相关基因 (*ABA*、*HYM*、*DEF*、*LYS* 和 *GLD*) 的表达变化。

100、10、2.2 μg·kg⁻¹ 处理组蜜蜂体内 *HYM* 的表达水平极显著的低于对照组蜜蜂 ($P < 0.01$)，其表达量分别为对照组的 0.416 倍、0.624 倍和 0.590 倍 (图 2)。GLD 在 100 μg·kg⁻¹ 和 10 μg·kg⁻¹ 处理组蜜蜂体内表达量较高，且在 100 μg·kg⁻¹ 组中的表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$)，为对照组的 1.308 倍，而 GLD 在 10 μg·kg⁻¹ 和 2.2 μg·kg⁻¹ 组蜜蜂体内表达水平与对照组差异不显著 (图 2)。其他 3 种免疫相关基因 *ABA*、*DEF* 和 *LYS* 在 3 个噻虫嗪处理组蜜蜂体内表达水平与对照组相比均没有显著差异 (图 2)。

3 讨论

噻虫嗪是第二代新烟碱类农药，也是当前世

表 2 噻虫嗪对蜜蜂的经口性毒性
Table 2 LC₅₀ value of thiamethoxam to *Apis mellifera* by oral-feeding

农药 Pesticide	时间 (h) Time (h)	毒力回归方程 Regression equation	LC ₅₀ (95% 置信区间) 95% CL (μg·kg ⁻¹)
噻虫嗪 Thiamethoxam	48	$y = -2.756 + 0.04x$	692 (643-743)

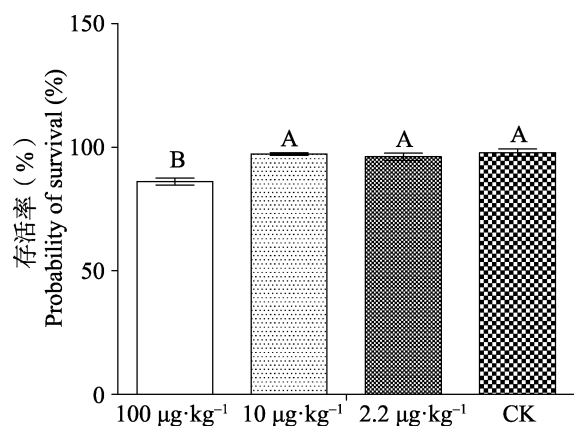


图1 各组蜜蜂的存活率(%)

Fig. 1 Probability of survival of *Apis mellifera* in different groups

图中数据为平均值±标准误；柱上标有不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)，不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$) (Duncan's 新复极差检验)。下同。

Data are mean ± SE. Histograms with different lowercase letters indicate significant difference at the 0.05 level, different capital letters indicate extremely significant difference at the 0.01 level by Duncan's multiple range test. The same below.

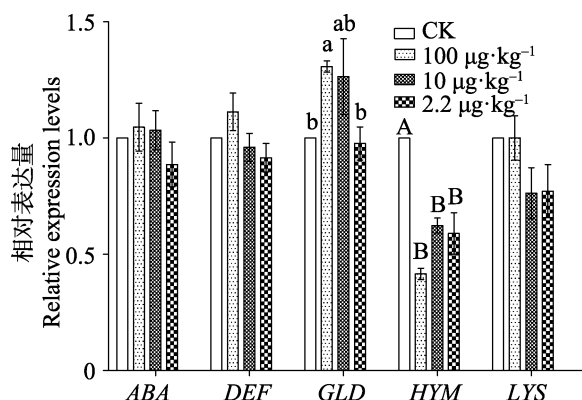


图2 ABA、HYM、DEF、LYS 和 GLD 在各组蜜蜂体内表达水平

Fig. 2 The expression levels of ABA, HYM, DEF, LYS and GLD in *Apis mellifera* of different groups

界销售量最大的新烟碱类农药之一，其作为一种烟碱型乙酰胆碱受体 (Nicotinic acetylcholine receptor, NACHR) 激动剂，它能够通过与昆虫烟碱型乙酰胆碱受体结合，使害虫异常兴奋，全身痉挛麻痹而死 (Matsuda *et al.*, 2001; Belzunces *et al.*, 2012)。本研究急性毒性结果也显示高浓度噻虫嗪处理组蜜蜂前期均表现为激

烈挣扎、兴奋等中毒症状，后期表现为活动力减弱或仰躺、抽搐、行动缓慢、反应迟钝等中毒症状，随后蜜蜂死亡。而亚致死效应实验结果显示 100 µg·kg⁻¹ 和 10 µg·kg⁻¹ 分别处理 5 d 和 8 d 后蜜蜂才异常兴奋焦躁，乱飞乱撞；而 2.2 µg·kg⁻¹ 处理对蜜蜂状态没有太大影响，这说明亚致死浓度噻虫嗪对蜜蜂状态影响可能是一个累积的过程，本实验中蜜蜂只进行了 10 d 的亚致死浓度噻虫嗪处理，如果增加处理的天数，2.2 µg·kg⁻¹ 组蜜蜂可能也会变得兴奋焦躁。不过只有 100 µg·kg⁻¹ 噻虫嗪处理会降低蜜蜂的存活率，而 10 µg·kg⁻¹ 和 2.2 µg·kg⁻¹ 噻虫嗪处理对蜜蜂个体生存影响不大。

蜜蜂抗菌肽属于先天体液免疫，体液内有 4 大基因家族：Apidaecin (Casteels *et al.*, 1989)、ABA (Casteels *et al.*, 1990)、HYM (Casteels *et al.*, 1993) 和 DEF (Casteels and Tempst, 1994)。Apidaecin 和 HYM 能够有效抑制革兰氏阴性菌，并且 HYM 能够有效抑制对 Apidaecin 产生抗性的菌类 (Casteels *et al.*, 1989, 1993; Chan *et al.*, 2009)。ABA 具有光谱的抗菌能力 (Evans, 2004; Randolt *et al.*, 2008)，不过其抗菌活性比 Apidaecin 要弱很多 (Casteels *et al.*, 1990)。蜜蜂 DEF 具有两个基因型：DEF-1 和 DEF-2 (Evans *et al.*, 2006)，血淋巴中的 DEF-1 对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌和真菌具有高效的抑制作用 (Aronstein and Salivar, 2005; Richard *et al.*, 2012)；DEF-2 则主要对革兰氏阴性菌脂多糖起作用 (Richard *et al.*, 2008)。本研究结果表明亚致死浓度噻虫嗪处理噻虫嗪对蜜蜂体内 ABA 和 DEF 表达量影响不大，但能够极显著的降低 HYM 的表达水平。

动物体内的 LYS 能够水解细菌的细胞壁 (Callewaert and Michiels, 2010) 并能够促进其他抗菌肽的合成 (Imler and Bulet, 2005)，在蜜蜂的细胞免疫中发挥着重要的作用。本研究结果显示受到 10 µg·kg⁻¹ 和 2.2 µg·kg⁻¹ 噻虫嗪胁迫后，蜜蜂体内 LYS 表达水平有下降的趋势，但与对照组差异不显著。昆虫 GLD 是重要免疫相关

酶,它属于 Glucose-methanol-choline (GMC) 型氧化还原酶,具有时间和特异性限制,参与昆虫的细胞免疫过程 (Whetten *et al.*, 1988; Cox-Foster *et al.*, 1990)。GLD 被认为在自由基以及酚氧化酶产生的醌类物质杀死病原菌的包膜反应中发挥着重要的作用 (Cox-Foster and Stehr, 1994)。本研究结果显示 $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 噻虫嗪处理能够显著增加蜜蜂体内 GLD 表达水平,而 $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $2.2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 噻虫嗪对 GLD 表达没有明显影响,这表明蜜蜂在受到较高亚致死浓度噻虫嗪胁迫时, GLD 可能具有一定的防御作用。

综上,亚致死浓度噻虫嗪处理能够极显著的抑制蜜蜂体内免疫相关基因 HYM 的表达,这表明亚致死浓度噻虫嗪可能通过降低蜜蜂免疫力从而影响蜜蜂个体生存和健康,这对于进一步从分子水平上探究新烟碱类农药对蜜蜂生存的影响具有重要的生物学意义。蜜蜂在受到较高亚致死浓度噻虫嗪胁迫时, GLD 可能发挥一定的防御作用。蜜蜂是社会性昆虫,其生理和行为受到整个蜂群信息素和资源的调控,因此在后续研究中,进行田间或半田间实验尤为重要。

参考文献 (References)

- Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, Brillard J, Baldy A, Belzunces LP, Le Conte Y, 2010. Interactions between *Nosema* microspores and neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.*, 12(3): 774–782.
- Alburaki M, Boutin S, Mercier PL, Loublier Y, Chagnon M, Derome N, 2015. Neonicotinoid-coated zea mays seeds indirectly affect honeybee performance and pathogen susceptibility in field trials. *PLoS ONE*, 10(5): e0125790.
- Alkassab AT, Kirchner WH, 2016. Impacts of chronic sublethal exposure to clothianidin on winter honeybees. *Ecotoxicology*, 25(5): 1000–1010.
- Aronstein K, Saldivar E, 2005. Characterization of a honey bee Toll related receptor gene *Am18w* and its potential involvement in antimicrobial immune defense. *Apidologie*, 36(1): 3–14.
- Belzunces LP, Tchamitchian S, Brunet JL, 2012. Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie*, 43(3): 348–370.
- Callewaert L, Michiels CW, 2010. Lysozymes in the animal kingdom. *J. Biosci.*, 35(1): 127–160.
- Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Tempst P, 1993. Functional and chemical of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Biol. Chem.*, 268(10): 7044–7054.
- Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M, Tempst P, 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *Embo. Journal*, 8(8): 2387–2391.
- Casteels P, Ampe C, Riviere L, Van Damme J, Elicone C, Fleming M, Jacobs F, Tempst P, 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.*, 187(2): 381–386.
- Casteels P, Tempst P, 1994. Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreforming mechanism involving stereo specificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199(1): 339–345.
- Chan QWT, Melathopoulos AP, Pernal SF, Foster LJ, 2009. The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus* larvae. *BMC Genomics*, 10(1): 387.
- Charreton M, Decourtye A, Henry M, Rodet G, Sando JC, Charnet P, Collet C, 2015. A locomotor deficit induced by sublethal doses of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in the honeybee *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, 10(12): e0144879.
- Cox-Foster DL, Stehr JE, 1994. Induction and localization of FAD-glucose dehydrogenase (GLD) during encapsulation of abiotic implants in *Manduca sexta* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 40(3): 235–249.
- Cox-Foster DL, Schonbaum CP, Murtha MT, Cavenier DR, 1990. Developmental expression of the glucose dehydrogenase gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 124(4): 873–880.
- Démares FJ, Crous KL, Pirk CWW, Nicolson SW, Human H, 2016. Sucrose sensitivity of honey bees is differently affected by dietary protein and a neonicotinoid pesticide. *PLoS ONE*, 11(6): e0156584.
- Dively GP, Kamel A, 2012. Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators. *J. Agr. Food Chem.*, 60(18): 4449–4456.
- Evans JD, 2004. Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 85(2): 105–111.
- Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Hultmark D, 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 645–656.
- Farooqui T, 2013. A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: a unique hypothesis. *Neurochem. Int.*, 62(1): 122–136.

- Goulson D, Nicholls E, Botias C, Rotheray EL, 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229): 1255-1257.
- Henry M, Cerrutti N, Aupinel P, Decourtye A, Gayraud M, Odoux JF, 2015. Reconciling laboratory and field assessments of neonicotinoid toxicity to honeybees. *Proc. Roy. Soc. Lond B*, 282: 1819.
- Immler JL, Bulet P, 2005. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities, and gene regulation/Kabelitz D, Schorder JM (eds.). Mechanism of Epithelial Defense. Basel: Karger. 1-21.
- James RR, Xu J, 2012. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *J. Invertebr. Pathol.*, 109(2): 175-182.
- Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T, 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. Biol. Sci.*, 274(1608): 303-313.
- Krupke CH, Hunt GJ, Eitzer BD, Andino G, Given K, 2012. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS ONE*, 7(1): e29268.
- Laurino D, Porporato M, Patetta A, Manino A, 2011. Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. *B. Insectol.*, 64(1): 107-113.
- Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB, 2001. Review neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 22(11): 573-580.
- Pilling E, Campbell P, Coulson M, Ruddle N, Tornier I, 2013. A four-year field program investigating long-term effects of repeated exposure of honey bee colonies to flowering crops treated with thiamethoxam. *PLoS ONE*, 8(10): e77193.
- Pettis JS, vanEngelsdorp D, Johnson J, Dively G, 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften*, 99(2): 153-158.
- Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE, 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends. Ecol. Evol.*, 25 (6): 345-353.
- Randolt K, Gimple O, Geissendorfer J, Reinders J, Prusko C, Mueller M, Beier H, 2008. Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honeybee worker larvae and adults. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 69(4): 155-167.
- Richard FJ, Aubert A, Grozinger C, 2008. Modulation of social interactions by immune stimulation in honey bee, *Apis mellifera*, workers. *BMC Biology*, 6: 50.
- Richard FJ, Holt HL, Grozinger CM, 2012. Effects of immune stimulation on social behavior, chemical communication and genome-wide gene expression in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, 13: 558.
- Stoner KA, Eitzer BD, 2012. Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*). *PLoS ONE*, 7(6): e39114.
- Tison L, Hahn ML, Holtz S, Rossner A, Greggers U, Bischoff G, Menzel R, 2016. Honeybees' behavior is impaired by chronic exposure to the neonicotinoid thiacloprid in the field. *Environ. Sci. Technol.*, 50(13): 7218-7227.
- Van der Sluijs JP, Simon-Delso N, Goulson D, Maxim L, Bonmatin JM, Belzunces LP, 2013. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current. Opin. Environ. Sustainability*, 5 (3/4): 293-305.
- Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Vignes B, Brunet JL, Texier C, Biron DG, Blot N, ElAlaoui H, 2011. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE*, 6(6): e21550.
- Whetten R, Organ E, Krasney P, Cox-Foster DL, Cavener D, 1988. Molecular structure and transformation of the glucose dehydrogenase gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 120(2): 475-484.
- Yang EC, Chuang YC, Chen YL, Chang LH, 2008. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, 101 (6): 1743-1748.
- Yang XL, Cox-Foster DL, 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *PNAS*, 102(21): 7470-7475.