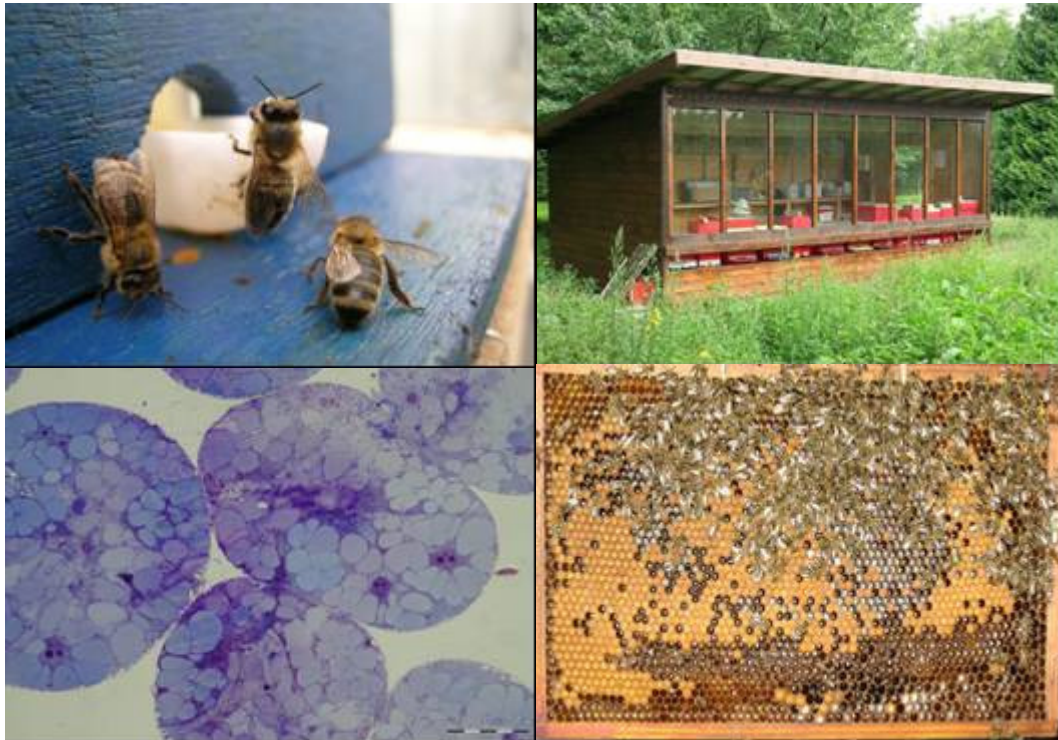


Phytofar Instituut Prijs 2011: Indiening wetenschappelijk project

Nevenwerking van gewasbeschermingsmiddelen op
bijen: identificatie en evaluatie van de impact van
subletale effecten



Samenvatting

Dit dossier is een samenvatting van belangrijkste bevindingen uit het recent gelopen ‘bijenproject’, een door het IWT gesteund onderzoeksproject waarin we, vanuit de fruitteelt als model, de subletale neveneffecten op bijen hebben getest van een selectie aan essentiële gewasbeschermingsmiddelen die rond de bloei worden ingezet. Via deze multi-dimensionele studie (genomics, proteomics, kwantitatieve real-time PCR, weefselmorfologie en gedragsexperimenten), hebben we een statistisch relevante experimentele setup gecreëerd. Hiermee hebben we op een efficiënte manier de “worst-case” subletale blootstelling aan bepaalde belangrijke gewasbeschermingsmiddelen beschreven en geëvalueerd. Onze data zijn één van de eerste uitgediepte moleculair biologische analyses, die de interpretatie van gelijkaardige studies op andere gewasbeschermingsmiddelen zullen vergemakkelijken. Het vormt aldus pionierswerk om in de toekomst nieuwe moleculaire- en gedragsstudies efficiënt te kunnen linken en interpreteren als antwoord op de controverses binnen eerder pesticide-onderzoek. Hoewel we subletale effecten éénduidig konden identificeren en kwantificeren, dient opgemerkt te worden dat via de hier uitgevoerde objectieve metingen en evaluaties voor geen van de geteste middelen schadelijke effecten op lange termijn werden gevonden, althans niet na éénmalige of een beperkt aantal subletale contaminaties.

Inleiding

Bestuiving door insecten is essentieel voor een goede productie in de fruitteelt en tal van andere landbouwgewassen. Wereldwijd nemen gecultiveerde honingbijen veruit het grootste aandeel van de door insecten uit te voeren bestuiving voor hun rekening. Door gewasbestuiving met behulp van bijen wordt op wereldschaal een productiewaarde van meer dan 100 miljard US dollar verwezenlijkt, waarvan naar schatting ongeveer een half miljard Euro in België gerealiseerd wordt. Het belang van bijen in onze landbouw wordt ook weerspiegeld in het feit dat naar schatting 1/3 van ons (Westers) dieet rechtstreeks of onrechtstreeks voortkomt uit door bijen bestuifde bloemen van bomen en planten.

De laatste jaren klinken er echter steeds vaker onrustwekkende berichten omtrent massale bijensterftes. Algemeen wordt aangenomen dat de primaire oorzaak van deze achteruitgang van ons bijenbestand vermoedelijk gezocht dient te worden in een aantal verschillende factoren, of een combinatie ervan, die allen leiden tot een verzwakking van de bijen. Vaak geciteerde mogelijke oorzaken in dit verband zijn nutritionele stress door drachtverarming (monoculturen, grootschalige landbouw, gebruik van herbiciden), infecties door schadelijke mijten (*Varroa*) of schimmels (*Nosema*), de klimaatsverandering (opwarming van de aarde) en de toepassing van diverse gewasbeschermingsmiddelen, noodzakelijk om de teelten tegen plaaginsecten te beschermen. De mogelijke impact van deze laatste wordt onderlijnd door de vereiste van het aanleveren van bijentoxiciteitsproeven bij de erkenningsprocedure van nieuwe middelen. Deze leggen echter vooral de nadruk op mortaliteit: enerzijds de acute mortaliteit van werksters die in contact komen met gewasbeschermingsmiddelen, en anderzijds de chronische mortaliteit die optreedt in het broed van bijenkolonies. Tijdens de bloei worden enkel middelen toegelaten die veilig zijn voor bijen, middelen met toxische effecten mogen, mits in achtnaam van een bepaalde wachttijd, enkel voor en na de bloei gebruikt worden. Echter, eventuele residu's van voorbloei-toepassingen of het gebruik van niet dodelijke middelen tijdens de bloei kan subletale nevenwerkingen zoals gedragsstoornissen teweegbrengen. Deze nevenwerkingen zijn nadelig voor zowel de teler als de imker. De teler krijgt een suboptimale bestuiving van zijn gewas of boomgaard, en moet dit corrigeren met hormonale middelen om zijn productie te garanderen. De imker ziet een achteruitgang in de bijenkolonies, wat een verlies aan honingproductie of mogelijk een verlies van de kolonie kan betekenen. Het is vanzelfsprekend dat een duurzaam landbouwbeleid ernaar streeft om een zo groot mogelijk aandeel van natuurlijke bestuiving te verwezenlijken. Daarom is het essentieel om deze problemen te onderkennen en in samenwerking met telers en imkers te voorkomen.

Het toepassen van insecticiden aan subletale dosissen kan verschillende types gedragsstoornissen uitlokken: verminderde activiteit en mobiliteit, een verminderd oriëntatievermogen, een verminderd leervermogen om de kwaliteit en kwantiteit van voedsel in te schatten, een verminderd vermogen om de locatie van voedsel te communiceren, een afwerend effect of een verkorte levensverwachting. Deze gedrageffecten komen slechts na chronische toepassingen tot uiting, en ze kunnen verdwijnen wanneer de bijen niet meer aan het middel blootgesteld zijn. Subletale neveneffecten kunnen de efficiëntie beïnvloeden waarmee de kolonie voedsel verzamelt en kunnen dus indirect gevolgen hebben voor de fitheid van de volgende generatie werksters. Bij sociale insecten is het belangrijk om de kolonie als één entiteit te beschouwen, waarbij verminderde performantie van haar individuele leden op langere termijn het geheel kan bedreigen.

Hoewel gewasbeschermingsmiddelen vaak als één van de potentiële oorzaken voor de achteruitgang van het bijenbestand worden aanzien, was er voor de start van dit project slechts weinig inzicht over de fysiologische

inwerking van gewasbeschermingsmiddelen op bijen. Uit de literatuur van fundamenteel biologisch onderzoek kennen we verschillende mogelijke onderliggende mechanismen die de communicatie en oriëntatie van bijen kunnen verstoren. (1) Het inwerken van externe chemische signalen op het zenuwstelsel van de bijen. (2) Een sterke immuunrespons die veel energie vergt van de werksters (3) Allerhande externe factoren (ziekten, zware metalen in pollen, etc.) kunnen de ontwikkeling van bijenbroed verstoren waardoor de volgende generatie werksters minder efficiënt wordt.

Het mogelijk effect van pesticiden op het zenuwstelsel van de bij, en/of het voorkomen van een specifieke immuunrespons in antwoord op externe chemische signalen kunnen beide op gelijkaardige technische wijze onderzocht worden. We opteren voor een gecombineerde aanpak welke toelaat om, complementair, mogelijke effecten op de expressie van boodschapper moleculen (mRNA) én de gecodeerde eiwitten na te gaan. Uiteraard zijn het de proteïnen die specifieke functionaliteit veroorzaken binnen een organisme, gezien hun centrale rol in alle cellulaire, enzymatische en structurele reacties op interne en extern stimuli. Desalniettemin kan men in de proteïne-translatie-cascade van elke cel een zestal niveaus onderscheiden waarop controle of ingrijpen mogelijk is: (1) transcriptie van mRNA uit DNA, (2) processing van dit mRNA, (3) transport van mRNA naar de cytosol, (4) mRNA turnover, (5) translatie in proteïne en (6) activering (bv. post-translationele modificaties) van het proteïne.

De doelstelling van dit project was om, via een innovatieve combinatie van expertise in neveneffecten van gewasbeschermingsmiddelen (Proefcentrum voor Fruitteelt) en moleculaire en morfometrische technieken (K.U.Leuven), de impact van gewasbeschermingsmiddelen op werksters en kolonie objectief te kwantificeren:

- Door sterke gedragsresponsen uit te lokken door orale blootstelling aan hoge subletale doses van selecte gewasbeschermingsmiddelen op kolonieniveau, hetgeen toelaat gedetailleerde verschillen te beschrijven op niveau van enerzijds foeragegedrag (activiteit, efficiëntie, oriëntatie en communicatie) en anderzijds intrakoloniaal gedrag (broedzorg, nestbouw, sociale interacties, etc.).
- Door gecontroleerde blootstelling van experimentele werkstergroepjes aan subletale doses, hetgeen toelaat de fysiologische respons in het bijenlichaam tengevolge van blootstelling aan selecte gewasbeschermingsmiddelen te beschrijven, met name de verschillen in genexpressie en proteïne expressie. De integratie van de moleculaire gegevens en gedragsresultaten laat toe de verschillen in expressie éénduidig te interpreteren en de functionaliteit van genen te herkennen.
- En vervolgens de gebruikte technieken te extrapoleren naar minder extreme, meer realistische vormen van blootstelling (bv contact met spuitresidu) om enerzijds de detectietechnieken te valideren en anderzijds praktische toepassingen te testen, zoals het bepalen van wachttijden.

Onderzoeksmethoden

Voor onze experimenten werkten we met raszuivere kolonies waarbij we kolonies opstarten rond F1 koninginnen. Deze kolonies worden opgezet in nauwe samenwerking met de imkersverenigingen. We kiezen volle zusters om intrakoloniale genetische variabiliteit en de hieraan verbonden potentiële responsvariabiliteit zoveel mogelijk uit te sluiten. Een deel van de kolonies in onze experimenten bevatten KI-geïnsemineerde koninginnen. Voor contaminatie-experimenten ontwikkelden we metalen kooitjes, ideaal voor behandelen van kleine werkstergroepen, die na elk gebruik gemakkelijk grondig ontsmet kunnen worden. Voor experimenten met bijen op raten gebruikten we houten EWK kastjes.

Gecontroleerde subletale contaminaties

Tijdens het blootstellingsexperimenten wordt een afgewogen hoeveelheid gecontamineerd suikerwater aangeboden met toevoeging van gelijke hoeveelheden van een oplossing van de te testen producten. De oplossingen van de betrokken actieve stoffen (fenoxycarb, indoxacarb, captan, imidacloprid; Tabel 1) worden gemaakt op basis van afgewogen geformuleerd product, rekening houdende met de hoeveelheid actieve stof in de formulering en de densiteit bij vloeistoffen.

Tabel 1: de concentratie van de geteste producten, weergegeven als delen actieve stof

actieve stof	concentratie	product	formulering
imidacloprid	1 ppb	Confidor	200 SL
captan	120 ppm	Captan 80 WG	80 WG
fenoxycarb	100 ppm	Insegar	25 WG
indoxacarb	300 ppb	Steward	30 WG

(1 ppb = 1 µg per l of kg; 1 ppm = 10³ppb)

Voor contaminatie van grote werkstergroepen (EWK) of kleine groepjes werksters (stalen kamertjes) gaven we de bijen afgewogen hoeveelheden suikerwater gecontamineerd met de gewenste dosis product. We gebruikten voor dit doel eppendorf buisjes waar in de tip twee kleine gaatjes werden geboord, groot genoeg om de tong van de bij door te laten, klein genoeg dat ze niet leegleken. We geven steeds een set van 3 Eppendorfsjes, om maximale toegankelijkheid van de bijen tot het voedsel te garanderen en eventuele effecten van 'slechte' buisjes uit te sluiten. In dit systeem werd steeds gelijkaardige totale hoeveelheden voedsel opgenomen bij de verschillende behandelingen. De gevulde buisjes werden zowel voor als na het experiment afgewogen, zodat we een exact beeld verkregen van de opgenomen hoeveelheid product.

Voor contaminatie van volledige kolonies boden we een afgemeten hoeveelheid suikerwater met testproduct aan in een plastic bakje in het voederverhoog. We lieten steeds een onbehandelde controlegroep meelopen bij elk contaminatie-experiment, en beschouwen een experiment enkel geldig als de mortaliteit in de controle groep lager is dan 10% (internationale richtlijn OECD). Vooral tijdens het eerste jaar van het project hadden we wat problemen om dit te bereiken, maar verder fijnstellen van onze methodologie in transfer en markering van de bijen tijdens dat jaar liet toe dat we verder in de loop van het project slechts zelden experimenten moeten afkeuren wegens mortaliteit.

In de diverse veldexperimenten kwamen bijen in contact met gewasbeschermingsmiddelen, door bloembezoeken van fruitbomen gespooten aan gangbare dosissen van de onderzochte producten (Tabel 2). De verschillende testproducten en een waterbehandelde controle werden in een gerandomiseerde blokkenproef telkens in 4 herhalingen uitgevoerd

Tabel 2: De gebruikte boomgaardddosering in veldproeven.

actieve stof	product	formulering	Dosis	actieve stof	
				g/ha loofwand	g/ha
imidacloprid	Confidor	200 SL	0,023	46,0	69,0
captan	Captan 80 WG	80 WG	0,150	1200,0	1800,0
fenoxycarb	Insegar	25 WG	0,040	100,0	150,0
indoxacarb	Steward	30 WG	0,017	51,0	76,5

Meten van gedragsstoornissen

Coherentiegedrag:

We meten de mate waarin de bijen gaan samenklitten op de raten. Dit deden we in twee verschillende proefopzetten. In de eerste opzet introduceerden we 30 bijen op EWK kastjes met uitgewerkte raten, echter zonder veel broed. Hierbij filmden we enkel na behandeling. Het mogelijk effect van de afwezigheid van broed werd bediscussieerd in de gebruikerscommissie en we besloten de proef te herhalen met waswafels waarin voldoende broed aanwezig was. Nu besloten we eveneens om te filmen voor en na behandeling.

Bij beide proefopzetten werden de beelden als volgt geanalyseerd. We verdelen het videobeeld in gelijke vakken van 17 cm². We tellen het aantal bijen per vak om na te gaan of bijen zich normaal gedragen, gaan samenklitten (lethargisch gedrag) of eerder onsamenhangend gaan rondrennen.

Broedzorg:

We meten de totale duur en de frequentie waarmee de werksters broed verzorgen. Dit meten we voor larven van een gestandaardiseerde leeftijd, met name tussen 8u en 4u voor de start van celdichting. Hierdoor trachten we mogelijke variatie in verzorgingsnaden op verschillende leeftijden zoveel mogelijk uit te schakelen. We doen dit voor 5 larven voor en 5 larven na de toepassing, elk at random geselecteerd, om het effect van individuele variatie tussen de larven te minimaliseren. Elke keer een werkster haar hoofd bij de larve houdt, noteren we de duur van de interactie. Hieruit berekenen we dan de totale duur besteed aan broedzorg, alsook de frequentie waarmee de bijen de larven verzorgen. Hiermee trachten we eventuele verschillen in broedzorggedrag door subletale blootstelling met testmiddelen na te gaan.

Nestbouw:

Als maat voor nestbouw meten we de snelheid waarmee de werksters de cellen dichtten wanneer de larven gaan verpoppen. Alle cellen van één broedtype zijn immers even groot en de werksters moeten de noodzakelijke was voor het dicht bouwen van deze cellen in gespecialiseerde klieren aanmaken. We testen ook hier de hypothese dat er mogelijke verschillen ontstaan in de benodigde tijd voor het dichtten van een cel wanneer de werkstergroep werd behandeld met een subletale dosis van de testmiddelen.

Foerageergedrag

We gebruikten gestandaardiseerde bijenkolonies met 3 broedramen die we in een serre of tunnel brengen en trainen om op een gekleurde kunstmatige voedselbron te vliegen. Eens de voedselbron goed bevolgen werd, vervingen we de voedselbron door één met afgewogen suikerwater. Deze bron werd opnieuw afgewogen na 24u. Dit liet toe, na correctie voor de veranderlijke daglichtperiode tijdens de verschillende observaties doorheen de zomer, de exacte foerageerkwantiteit te bepalen. Daarnaast telden we gedurende enkel dagen de hoeveelheid bijen die in- en uit de kolonie vliegen, als maat van foerageeractiviteit. Tegelijk werd ook het aantal bijen aan de kunstmatige voedselbron geteld. Na een vast aantal dagen vervingen we de suikerbron gedurende 24u door een behandelde voedselbron. Na 24u werd deze eveneens afgewogen, als maat voor effectieve contaminatie met de testproducten. Eén dag na het wegnemen van de behandelde voedselbron herhalen we de eerder uitgevoerde observaties (gewicht, in & uit, bijen aan bron) volgens een identiek protocol gedurende een tweede periode van een vast aantal dagen.

Taaktransitie van verzorgster- naar foerageerbijen

Hierbij voerden we enerzijds een fototaxisexperiment uit, en anderzijds een filmexperiment.

Het fototaxisexperiment bestond erin dat we bepaalden of bijen van gekende leeftijd, op basis van het merken op de leeftijd van één dag oud, positief of negatief fototactisch zijn. Foerageerbijen werken buiten de kolonie en zijn dus actief in licht. Bijen die de transitie naar foerageerbij nog niet hebben gemaakt, verzorgsterbijen, voeren taken uit binnen de kolonie en zijn dus actief in het donker. Door de reactie van bijen op licht te bepalen, bepalen we dus mogelijk of de taaktransitie reeds heeft plaatsgevonden of niet. Deze experimenten werden telkens uitgevoerd in vier herhalingen. Hierbij volgden we telkens 4 kolonies op op vier verschillende locaties verspreid over Limburg.

Daarnaast observeerden we de aanvang van het foerageergedrag ook rechtstreeks door het filmen van gemerkte bijen bij de kastingang. Hierdoor konden we nauwkeurig bepalen op welk tijdstip hoeveel van de gemerkte bijen actief zijn buiten de kast en dus de taaktransitie reeds gemaakt hebben. Omwille van technische redenen zoals de aanwezigheid van genoeg camera's, computergeheugen en vergelijkbare kolonies hebben we deze experimentele benadering uitgevoerd op één locatie, de bijenhal van pcfruit in Kerkom, waar we voor deze proef over vier bijenkolonies beschikten (Zander-kasten, 2 verdiepingen, 10 raten per verdieping). Aangezien we vier behandelingen (suiker, fenoxycarb, imidacloprid en indoxacarb) evalueerden beschikten we voor elke behandeling wel slechts over één observatie.

Moleculair en fysiologisch werk

Voor de fysiologische stalen is een strikt gecontroleerde blootstelling van de werksters noodzakelijk. Stalen van broedverzorgsters werden random uit kolonies gehaald, thoracaal gemerkt met een verfstip en verdeeld in groepjes van 15 werksters per te testen conditie. Deze werksters worden dan met een afgesloten broedraam uit hun eigen kolonie geplaatst in een gesloten éénraamskastje voorzien van suikerwater als voedsel. Vervolgens plaatsten we kweekkastjes en experimentele raten en/of kooien in een geklimatiseerde kast op 25°C. Een één à tweedaagse controle laat ons toe de pas uitgesloten, ongemerkte, werksters te vangen voor verder experimenteel gebruik.

Kwantitatieve opvolging van *Amfor* expressie: Real-Time PCR

Hiervoor namen we bijenstalen op de leeftijd van 15, 18, 20, 22 en 25 dagen oud. Staalname van bijen van een welbepaalde leeftijd is mogelijk doordat bijen van 1 dag oud aan het begin van het experiment gemerkt werden door middel van een groene stip op de thorax. De gekozen leeftijden lieten ons toe een mooi spectrum van mogelijke afwijkingen in kwantitatieve expressie van het *Amfor* gen rond het normale tijdstip van de taaktransitie tussen verzorgster- en foerageerbijen te observeren. Zowel in de controle als in de behandelde kolonies werden tijdens de ochtend van de vermelde tijdstippen gemerkte bijen van minstens drie verschillende raten weggevangen. De gevangen bijen werden na het fototaxisexperiment onmiddellijk afgedood in vloeibare stikstof en vervolgens bewaard. Eens in het laboratorium werden ze zorgvuldig gedissecteed. Uit de hersenen werd op een steriele manier RNA afgezonderd. We ontwikkelden een twee-staps real-time RT-PCR experiment, gebaseerd op Taqman technologie met gebruik van fluorescente probes (FAM-TAMRA), om de *Amfor* gen expressie correct te kunnen kwantificeren. De gevoeligheid, specificiteit en reproduceerbaarheid van de ontwikkelde methode werden ook nagegaan.

Microarrays

In het microarray experimenten werden 7-dagen oude gemerkte bijen gecontamineerd in een kooi-setup, en 1 week later werden de 14 dagen oude bijen van elke conditie verzameld. Bovendien, voor de controlebijen althans, hebben we stalen van 1 dag (8 dagen oud) en 1 week (14 dagen oud) na de behandeling verzameld om te kunnen corrigeren voor leeftijds-gerelateerde differentiele expressie. Dit experiment werd een keer herhaald op een 2^{de} set van gepaarde kolonies. Elke keer werden 10 bijenhersenen per conditie gedissecteed in Ringer-Jolly-oplossing.

2-D DIGE

Voor de 2-D-DIGE –experimenten verzamelden we ook gemerkte bijen uit kooitjes, zowel 1 dag (8 dagen oud) als 1 week (14 dagen oud) na de behandeling, om zowel korte- als lange-termijn effecten te kunnen onderzoeken. Dit gehele experiment werd 3 x herhaald. Elke keer werden 10 bijenhersenen per conditie gedissecteed in Ringer-Jolly-oplossing. Voor de analyse werd gebruik gemaakt van de software die ontwikkeld is voor het DIGE systeem (DeCyder™ by Amersham Bioscience, Sweden).

Morfologie van de bijenwerkster-hypofaryngeaalklier

Om weefsels zoals de hypofaryngeaalklier te kunnen bestuderen werden deze in de eerste plaats gefixeerd om de interne structurele organisatie te behouden. In dit onderzoeksproject werd de methode van Fixatie door crosslinking gebruikt: het fixerend agens, glutaraaldehyde, dringt de cellen binnen en vormt covalente cross-links tussen intracellulaire componenten. Na de fixatie volgt de inbedding van het weefsel in een vast medium zodat er semi-dunne coupes gemaakt kunnen worden m.b.v. een ultramicrotoom. De gebruikte hars was Araldit-hars, omdat deze hars toelaat in een later stadium electronenmicroscopie toe te passen. Eens de coupes (1 µm) gesneden waren, werden ze gekleurd met methyleenblauw. Een aangepast `Image Analysis`-softwareprogramma kon m.b.v. een eraan verbonden lichtmicroscop scherpe foto's van verschillende vergrotingen genereren. Enkele van zulke foto's zijn in het resultatengedeelte weergegeven. Ook de diameters van de acini van de klier (volgens hun grote elliptische as) werden gemeten, met dezelfde software. Nog dunnere coupes (70 nm) voor electronenmicroscopie werden gesneden en geanalyseerd met een Zeiss EM900 transmissie-electronenmicroscop.

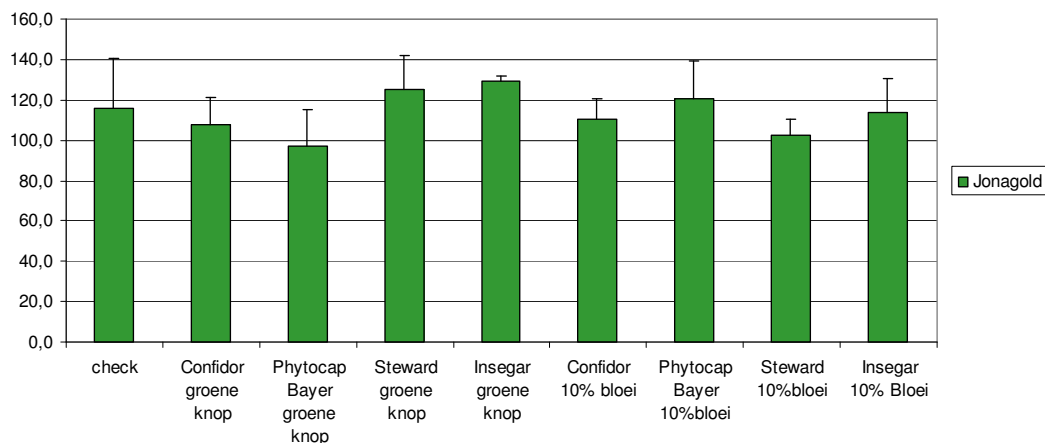
Resultaten

In het kader van dit onderzoeksproject zijn, vanuit de fruitteelt als model, de subletale neveneffecten van een selectie van vier belangrijke gewasbeschermingsmiddelen bestudeerd. Hierbij hebben we ons niet beperkt tot de observatie en beschrijving van eventuele gedragswijzigingen na blootstelling aan subletale concentraties van de middelen, maar hebben we ons tevens verdiept in meetbare moleculaire en fysiologische parameters die aan de basis liggen van deze gedragsveranderingen. Hiervoor steunden we op een innovatieve combinatie van expertise in neveneffecten van gewasbeschermingsmiddelen (pcfruit vzw) en moleculaire en morfometrische technieken (K.U.Leuven).

In de loop van het project werden honingbijen op een gecontroleerde wijze blootgesteld aan subletale contaminaties van drie insecticiden: nl. imidacloprid, fenoxycarb en indoxacarb, en één fungicide: captan. Captan en indoxacarb worden beschouwd als veilig voor volwassen honingbijen hoewel de laatste een lage LD₅₀-waarde heeft. Imidacloprid en fenoxycarb echter worden beschouwd als toxisch en onveilig voor respectievelijk volwassen bijen en bijenlarven.

Repellerend effect en impact op bestuivingsactiviteiten?

Een eerste belangrijke resultaat van dit werk, gestaafd door de resultaten van diverse onafhankelijke proeven, is dat er geen afstotend effect is van de testmiddelen op het aantal bloembezoeken door de bijen (vb. Figuur 1). Dit betekent dat er geen effect is op de directe bestuivingsactiviteiten (die dus onverminderd doorgaan), maar dat het blootstellingsrisico aan deze middelen des te groter is. Er is dus wel degelijk een potentieel gevaar van subletale contaminaties, hetgeen de relevantie van het overige onderzoekswerk in het kader van dit project onderstreept.



Figuur 1 : Het totaal aantal bloembezoeken gedurende de bloeiperiode in de verschillende behandelingen in een oude Jonagold boomgaard; gemiddelde en standaarddeviatie.

Effect van subletale contaminaties op het gedrag van bijen

Wat het gedragswerk betreft hebben we twee belangrijke aspecten van de bijenvolken grondig onder de loep genomen, nl. het intrakoloniaal gedrag en het foerageergedrag. Bij de studie van het intrakoloniaal gedrag, hebben we de mogelijke impact van subletale contaminaties van gewasbeschermingsmiddelen nagegaan op het coherentiegedrag (normaal, samenklittend of eerder onsamenhangende verspreiding op raten in de kolonie), de broedzorg (totale duur en frequentie van zorg die werksters aan larven geven) en nestbouw (de tijd die werksters nodig hebben om cellen te sluiten). De genomen voorzorgen en maatregelen om tot gestandaardiseerde condities te komen (raten en random werksters uit dezelfde kolonie, geklimatiseerde omstandigheden, gelijklopende observatie van alle condities, larven van dezelfde leeftijd) bleken afhankelijk van de specifieke test al dan niet te volstaan om een objectieve beoordeling van de gemeten parameter tussen de verschillende testkolonies te garanderen. In een aantal gevallen speelde de relatief grote verschillen tussen de diverse testwerkstergroepen (onafhankelijk van het type behandeling) ons te veel parten, hetgeen meer dan waarschijnlijk aan de basis ligt van de soms tegenstrijdige resultaten bekomen in proeven van verschillende jaren. Daar waar de tendensen tussen verschillende proeven in opeenvolgende proefjaren gelijklopend zijn, en er voldoende statistische ondersteuning is, kunnen we welonderbouwde conclusies formuleren.

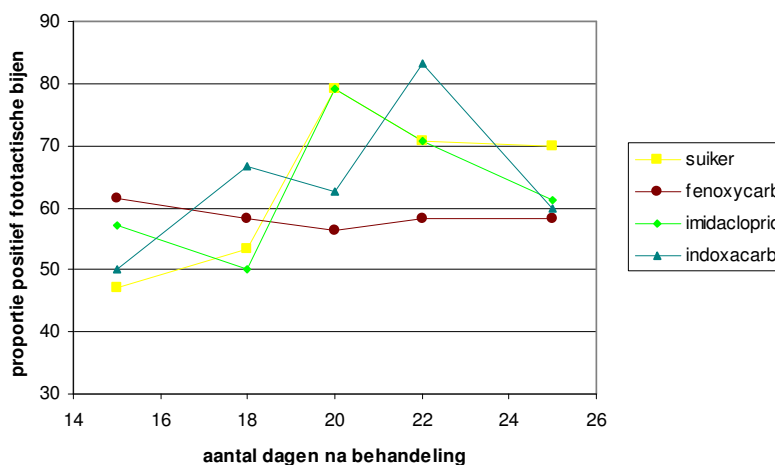
Voor wat betreft het coherentiegedrag en de broedzorg konden we geen duidelijke (statistisch relevante, en tussen de diverse proeven consequente) invloed van de geteste middelen waarnemen. Na contaminatie met fenoxycarb maten we in de diverse proefopzetten (serre, (semi-)veld) wel telkens een verlengde broedzorgduur, maar dit leidde over het algemeen niet tot een significant verschil met de situatie van vóór de contaminatie. Voor indoxcarb bekwamen we uiteenlopende effecten naargelang het ging om oraal opgenomen opgelost product of opgedroogd spuitresidu (praktijksituatie). Deze bevindingen worden bevestigd door analoog onderzoekswerk uitgevoerd in het buitenland. Wat betreft het nestbouwgedrag, waarbij werksterbijen was produceren om de cellen te dichten wanneer de larven gaan verpoppen, zagen we bij imidacloprid (en in mindere mate indoxcarb) een duidelijke verlenging in benodigde tijd voor sommige maar niet alle cellen. Dit onderzoek is het eerste waarin een mogelijk effect op het sluiten van de cellen werd waargenomen. Deze afwijking in het nestbouwgedrag o.i.v. de subletale contaminaties heeft echter geen nefaste effecten op de broedontwikkeling, althans niet zover we hebben kunnen nagaan in de door ons opgevolgde kolonies in het laatste jaar van het project.

Wat het foerageergedrag betreft vonden we dat een directe, orale blootstelling aan opgelost product een negatief effect heeft op de hoeveelheid voedsel die de bijen naar de kolonie halen voor zowel imidacloprid als indoxcarb. Dit werd veroorzaakt door een algemene vermindering van foerageeractiviteit, waarbij, enerzijds minder bijen in en uit de kolonie vliegen, en anderzijds een kleiner deel van de vliegbijen effectief de voedselbron exploiteren. Wanneer we deze testen in meer praktijkgerichte proefopzetten uitvoerden (contact bijen met opgedroogd residu) bemerkten we nog steeds een beduidende afname aan foerageeractiviteit onder invloed van imidacloprid. Wat indoxcarbbehandelingen betreft, werden, in analogie met de experimenten rond intrakoloniaal gedrag, ook hier tegengestelde effecten bekomen in de tunnelexperimenten (opgedroogd residu) in vergelijking met de serre-experimenten (opgelost product). Op basis van deze gegevens kunnen we dus concluderen dat opgedroogd residu van indoxcarb in tegenstelling tot orale contaminatie geen problemen veroorzaakt voor het foerageergedrag van de bijen, hetgeen aansluit bij de algemene bevindingen van dit middel.

Impact van subletale contaminaties op het tijdstip van taaktransitie

De honingbij wordt gekenmerkt door een opeenvolging van taken die zij gedurende haar levensloop uitvoert. Deze staan in functie van de nood van de kolonie maar liggen onder normale omstandigheden vast. Zo maakt de honingbij de transitie van verzorgster- naar foerageerbij rond de 21ste levensdag. Dit ijkpunt in de ontwikkeling van honingbijen gebruiken we om eventuele gedragsveranderingen onder invloed van gewasbeschermingsmiddelen te bestuderen. In het kader van dit project onderzochten we of gewasbeschermingsmiddelen een invloed hebben op het tijdstip van deze transitie van verzorgster- naar foerageerbij.

Wanneer we kijken naar de leeftijd waarop bijen beginnen foerageren konden we een aantal duidelijke trends waarnemen. In de diverse experimenten met leeftijdsgecontroleerde bijen (fototaxisexperiment, waarbij de fototactische respons van gemerkte bijen werd nagegaan; filmexperiment: waarbij het al dan niet foerageergedrag van gemerkte bijen nauwgezet opgevolgd werd) vertonen zowel de controlekolonies als de kolonies behandeld met imidacloprid en indoxcarb een stijging van het aantal bijen actief als foeragerster in functie van de leeftijd.



Figuur 2: Proportie positief fototactische bijen in functie van de leeftijd (1 dag oud op tijdstip contaminatie)

Deze stijging van het aantal foerageersters in functie van de leeftijd is echter niet waarneembaar voor de kolonie behandeld met subletale dosissen van fenoxycarb, waarvoor op de leeftijd van amper acht dagen oud, er beduidend meer bijen actief zijn als foerageerster dan in de overige kolonies. Deze bevinding dat het aanvangstijdstip van foerageeractiviteit afwijkt van het normale patroon wanneer bijen subletaal gecontamineerd worden met fenoxycarb wordt ondersteund door data gegenereerd in drie, onderling onafhankelijke, experimenten.

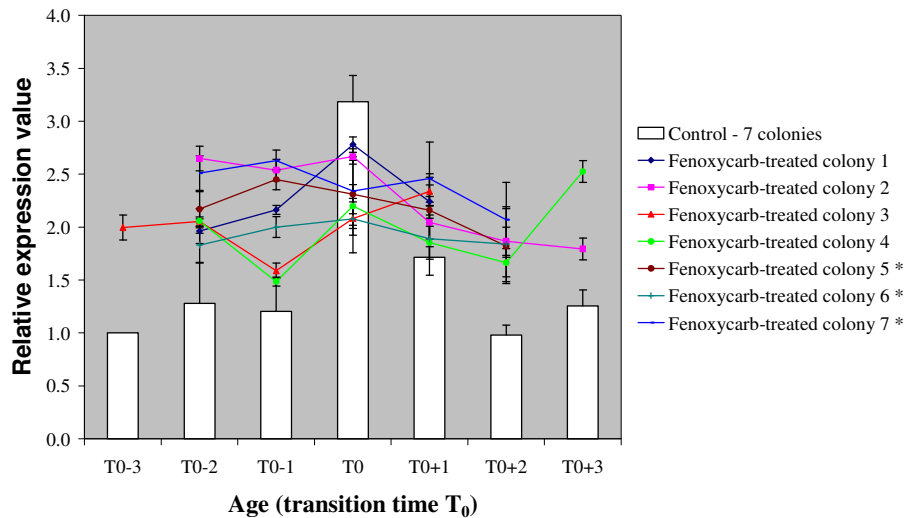
Bovendien kon deze gedragswijziging ook gelinkt worden aan moleculaire en histologische veranderingen, gemeten in het parallel lopend moleculair en histologisch onderzoeksluik van dit project (zie verder). Robinson en Ratnieks (1987) wezen op de voordelen van vroegtijdig foerageergedrag onder invloed van juveniel hormoonanalogen voor de bestuiving van landbouwgewassen. Dit voordeel is echter slechts van korte duur. Doordat bijen vroegtijdig foerageren daalt het aantal werksters die de ontwikkelende larven in de kolonie verzorgen. Subletale neveneffecten, zoals vroegtijdig foerageren, kunnen zeer ernstige gevolgen hebben aangezien het de mogelijkheid beperkt om een nieuwe generatie werksterbijen op te bouwen (Thompson *et al.*, 2007). Desondanks wordt er voorlopig nog geen onderzoek verricht naar dergelijke gedragsveranderingen in het traject dat doorlopen wordt bij de ontwikkeling en lancering van nieuwe gewasbeschermingsmiddelen. Het hier geleverde werk biedt alvast een aantal methoden (fototaxistest, moleculaire/histologische test) waarmee dit eventueel zal kunnen gebeuren in de toekomst.

De link tussen gedragsstoornissen en hun moleculaire/fysiologische basis

Gedragsstoornissen bij bijen tengevolge van subletale dosissen van toxische pesticiden vormden ook reeds het onderwerp van verscheidene andere studies uitgevoerd vóór de aanvang en in de loop van dit project. Buiten dit onderzoeksproject is er echter tot op heden zeer weinig kennis vergaard omtrent de fysiologische impact van subletale contaminaties van gewasbeschermingsmiddelen op bijen. Door de unieke combinatie van gedrags-, histologisch en moleculair onderzoek zijn we er met dit project in geslaagd om inzicht te verwerven aangaande de moleculaire (expressiepatronen) en histologische veranderingen die de geobserveerde gedragswijzigingen onderbouwen.

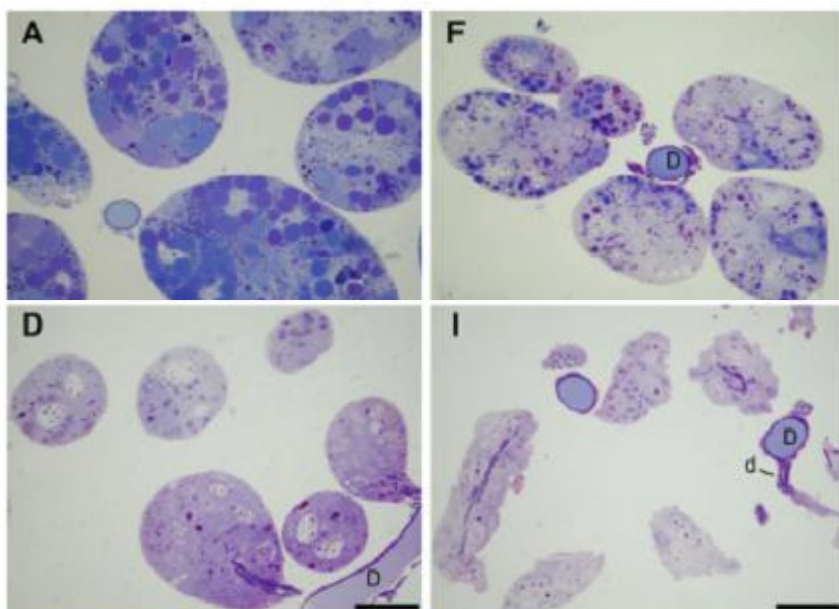
Een belangrijke pijler van het moleculaire onderzoek omvatte de studie was de detectie, identificatie en interpretatie van gen- en eiwit-expressieprofielveranderingen in de hersenen van honingbijen. Meer specifiek hebben we onze aandacht gericht op de veranderingen die tijdens de ontwikkeling optreden voor één speciaal gen, *Amfor* (*Apis mellifera* foraging gene). Dit gen wordt geassocieerd met het begin van de foerageeractiviteit. Gebruik makend van Real-Time PCR hebben we eerst de expressieprofielveranderingen van *Amfor* onder de loep genomen in controlebijen. Zodoende konden we aantonen dat de significante piekexpressie-waarden van dit gen kunnen betekenen dat het optreedt als mogelijke “trigger” in het hele transitionele proces van verzorgsterbij naar foerageerbij. Aangezien eerdere studies al hadden uitgewezen dat op-regulatie van *Amfor*-activiteit de gedragsontwikkeling van de honingbij kan beïnvloeden via het visueel systeem, kan het dus betrokken zijn in visueel gedreven motorisch leren, wat een essentieel onderdeel vormt van de dans-taal, en oriëntatie-tochten beïnvloedt die optreden tijdens het foerageren. Dit konden we ondubbelzinnig aantonen met de data gegenereerd in de complementaire gedragsstudie. Bovendien gingen we ook de invloed van gewasbeschermingsmiddelen na. Het IGR insecticide fenoxycarb bleek een sterke impact te hebben op het *Amfor*-expressieprofiel. Bij deze behandeling kon er geen significante stijging of daling over tijd gevonden worden. Dit wijst er op dat jonge bijen al vroeg enkele foerageerbij-specifieke kenmerken vertonen wanneer ze zijn blootgesteld aan subletale concentraties van dit gewasbeschermingsmiddel. Deze vaststellingen sluiten perfect aan bij de conclusie omtrent de foerageeractiviteit in het gedragswerk.

Om verder het mogelijke vroegtijdig-foerageer-effect van deze IGR te onderzoeken, hebben we geopteerd voor een gecombineerde functionele genomics/proteomics aanpak, gebruik makend van microarrays en 2-D DIGE. In 8- en 14-dagen oude bijen, respectievelijk 1 dag en 1 week na behandeling, hebben we de algemene neer-regulatie van verzorgsterbij-achtige genen en eiwitten zoals *Hsp70/Hsp90 organizing protein homolog* en *vice versa* de op-regulatie van foerageerbij-achtige genen en eiwitten zoals *Headcase* aangetoond.



Figuur 3: Het effect van fenoxycarb op de *Amfor* expressie. Data van 7 verschillende experimenten, elk met een controle- en behandelde kolonie, en met een mogelijk verschil in de leeftijd waarop de transitie van nurse-bij naar foerageerster-bij plaatsvindt ($=T_0$), werden geïntegreerd in deze grafiek, gebruikmakend van 18 S rRNA als housekeeping-gen. The effects of Fenoxycarb on *Amfor* expression. Terwijl de controleconditie duidelijk een significant *Amfor* trigger-siginaal vertoont, met lagere expressiewaarden voor en na T_0 , wordt het gen in behandelde bijen niet zo strikt gereguleerd en vertoont her hogere *Amfor*-expressiewaarden doorheen de ganse ontwikkeling. * duidt op kolonies waarvan de bijen ook werden gebruikt in een fototaxis-gedragsexperiment.

Tenslotte hebben we ons ook gefocust op de grootte en de morfologie van de hypofaryngeaalklieren van de honingbijen aangezien de secretie van deze klieren de voedselbron is van de volgende bij-generatie. In onze metingen op de hypofaryngeaalklieren van fenoxycarb-behandelde bijen, vertoonden de klier-acini misvormingen in grootte en vorm, en dit veel sneller dan normaal, wat duidt op vroegtijdige desintegratie (Figuur 4). Al deze resultaten bevestigen de hypothese dat fenoxycarb het vroegtijdig foerageren induceert.

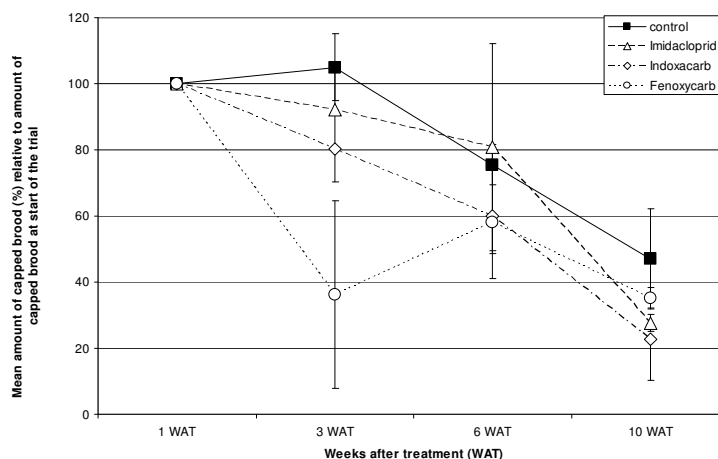


Figuur 4: Licht-microscopische foto's van hypofaryngeaalklier-acini (scale bar 50 μ m). Linkse kolom: 8 dagen oude bijen, rechtse kolom: 14 dagen oude bijen. Elke rij stelt een verschillende conditie voor: controle (A en F), fenoxycarb (D en I).

Captan-, imidacloprid- en indoxacarb-behandelingen induceerden minder rechtlijnige veranderingen in de transcriptionele en translationele profielen van de hersenen van de bij. De succesvolle functionele annotatie van 80 % (microarray) en 95 % (2-D DIGE) van de differentiële genen en eiwitten bracht aan het licht dat, op het moleculaire niveau, elk pesticide een grote variatie aan genen en eiwitten beïnvloedde. Er kon geen uniek algemeen pesticide merker-gen of -eiwit worden geïdentificeerd zodat pesticide-specifieke responsen een betere beschrijving van hun effecten geven. Nochtans veroorzaakten alle behandelingen hoofzakelijk een neerregulatie, en veranderden ze ook significant de expressie van vele leeftijds-gerelateerde genen en eiwitten, wat hun effect op de ontwikkeling van de bij onderlijnt. Indoxacarb-behandelde bijen zijn de enigen met een groter aandeel differentieel tot expressie gebrachte eiwitten op de dag na de pesticide-applicatie, wat het enige geteste gewasbeschermingsmiddel maakt met een duidelijk tijdelijk effect. Geen van de drie behandelingen had echter een effect op de hypofaryngeaalklieren van de bijen, en voor imidacloprid en indoxacarb verschilde de *Amfor* expressie en de fototactische respons evenmin van de controles. Voor imidacloprid zijn deze resultaten des te meer opvallend omdat het algemeen beschouwd wordt als een schadelijk en controversieel product.

We kunnen besluiten dat we met deze multi-dimensionele studie (genomics, proteomics, kwantitatieve real-time PCR, weefselmorphologie en gedragsexperimenten), meestal uitgevoerd op dezelfde leeftijds-gecontroleerde bijen, een statistisch relevante experimentele setup hebben gecreëerd. Hiermee hebben we op een efficiënte manier de “worst-case” subletale blootstelling aan bepaalde belangrijke gewasbeschermingsmiddelen beschreven en geëvalueerd. Aangezien elk van de geteste producten representatief is voor een hele waaier aan andere gewasbeschermingsmiddelen, zullen onze data, één van de eerste uitgediepte moleculair biologische analyses, de interpretatie van gelijkaardige studies op andere gewasbeschermingsmiddelen vergemakkelijken. Op die manier kunnen we hopelijk in de toekomst nieuwe moleculaire- en gedragsstudies efficiënt linken en interpreteren als antwoord op de controverses binnen eerder pesticide-onderzoek. Bovendien hebben we een gedetailleerde analyse van de rol van fenoxycarb uitgevoerd, en zelfs een real-time PCR-indicator vooropgesteld als mogelijke detector van fenoxycarb-intoxicatie.

Naast de identificatie van mogelijke effecten van gewasbeschermingsmiddelen op het gedrag van de honingbij en de moleculaire/histologische basis hiervoor, werden in dit project ook de gevolgen van een subletale contaminatie voor de algemene vitaliteit van de bijenkolonie onderzocht. Uit de resultaten blijkt er een tijdelijk negatief effect van fenoxycarb. Ondermeer, drie weken na behandeling stellen we significant minder gesloten broedcellen vast in de kolonies behandeld met fenoxycarb (Figuur 5). Dit ligt in de lijn van de verwachtingen aangezien in de literatuur reeds meerdere malen werd gewezen op de nefaste gevolgen van fenoxycarb op het ontwikkelende broed (Czoppelt, 1991; Tasei, 2001; Thompson *et al.*, 2005; Aupinel *et al.*, 2007).



Figuur 5: Totale hoeveelheid gesloten broed, relatief t.o.v. de beginsituatie, in functie van het aantal weken na behandeling. Gemiddelden en standaarddeviaties van de vier herhalingen zijn weergegeven.

Verder bleek dat fenoxycarbcontaminatie leidt tot een –weliswaar tijdelijke- significante daling van het gewicht van de bijenkolonies, wat onder imkers toch beschouwd wordt als een maatstaf voor de sterkte van de kolonie. Als gevolg van het effect op broedontwikkeling stellen we zes weken na behandeling significant minder levende bijen vast bij fenoxycarb gecontamineerde kolonies in vergelijking met de controle. Dit effect werd tevens aangetoond voor de kolonies behandeld met indoxacarb. Er dient wel opgemerkt te worden dat we na langere termijn de significante verschillen tussen de behandelde kolonies en de controlekolonies verdwenen. Dit

betekent dat al de subletaal gecontamineerde kolonies in staat zijn te herstellen van de nadelig effecten. In de proefopzetten van dit project werkten we echter noodgedwongen met éénmalige of een beperkt aantal subletale contaminaties, en bijgevolg kunnen we op basis van deze resultaten geen uitspraken doen op het langetermijneffect van chronische blootstelling aan subletale dosissen van de geteste gewasbeschermingsmiddelen. Echter bij de toepassing van goede landbouwpraktijken en het gebruik van de diverse middelen volgens hun erkenning is dit niet aan de orde. M.a.w. het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen volgens de momenteel geldende voorschriften in de pitfruitteelt (met dus een potentiële kans op subletale contaminaties van bijen) heeft geen schadelijke effecten op lange termijn voor bijenkolonies, althans niet volgens de objectieve metingen en evaluaties uitgevoerd in de loop van dit project.

Conclusie

Via een innovatieve combinatie van expertise in neveneffecten van gewasbeschermingsmiddelen (Proefcentrum voor Fruitteelt) en moleculaire en morfometrische technieken (K.U.Leuven), zijn we erin geslaagd de impact van gewasbeschermingsmiddelen op werksters en kolonies objectief te kwantificeren: Bovendien hebben we een gedetailleerde analyse van de rol van fenoxycarb uitgevoerd, en hierbij een Real-Time PCR-indicator (*Amfor gen*) vooropgesteld als mogelijke detector van fenoxycarb-intoxicatie. Onze data zijn één van de eerste uitgediepte moleculair biologische analyses, die de interpretatie van gelijkaardige studies op andere gewasbeschermingsmiddelen zullen vergemakkelijken. Het vormt aldus pionierswerk om in de toekomst nieuwe moleculaire- en gedragsstudies efficiënt te kunnen linken en interpreteren als antwoord op de controverses omtrent pesticiden en hun effect op bijen. Hoewel we subletale effecten éénduidig konden identificeren en kwantificeren, dient opgemerkt te worden dat via de hier uitgevoerde objectieve metingen en evaluaties voor geen van de geteste middelen schadelijke effecten op lange termijn werden gevonden, althans niet voor de praktijk relevante potentieel aanwezige subletale concentraties (indien de middelen op een correcte manier volgens de geldende voorschriften in de pitfruitteelt toegepast worden).

BIJLAGE

De onderzoeksgroepen

1. Proefcentrum Fruitteelt vzw (pcfruit vzw)

Afdeling Zoölogie

Fruittuinweg 1

B-3800 Sint-Truiden

Dr. ir. Tim Beliën, Dr. Bruno Gobin

Tel : +32 (0) 11/69 71 33, Fax : +32 (0) 11/69 71 10

E-mail: tim.belien@pcfruit.be, website: www.pcfruit.be

De afdeling Zoölogie van pcfruit vzw heeft een jarenlange ervaring met de systematische opvolging van de levenscycli van plagen en nuttige organismen in de fruitteelt. Deze kennis is noodzakelijk voor de uitbouw van een efficiënt waarschuwingssysteem voor de telers en een goede toepassing van geïntegreerde bestrijding, waarin elke plaag op het juiste tijdstip behandeld moet worden. Daarnaast hebben we fundamentele ervaring in de nevenwerkingen van gewasbescherming op de nuttige organismen, essentieel voor een correcte inschatting van de prooi-predator interacties in de boomgaard. Deze kennis werd verworven via kwaliteitsvolle onderzoeksprojecten rond gewasbescherming en via contractwerk in het kader van productontwikkeling voor de Fytofarmaceutische industrie. Experimentele protocols worden op hoog niveau uitgevoerd volgens gestandaardiseerde en internationaal erkende normen (GEP; EPPO richtlijnen). Pcfruit beschikt over eigen proefboomgaarden en kan via een uitgebreid netwerk van leden een beroep doen op een groot areaal van privé boomgaarden voor experimenten en plaagopvolging. De afdeling zoologie heeft een lange traditie in de verspreiding van haar onderzoeksresultaten via publicaties. Sinds 1995 zijn meer dan 100 artikels verschenen. Naast 60 publicaties in praktijkgerichte, Vlaamse, vaktijdschriften voor de fruittelers, werd er ook veelvuldig in internationale en gerenommeerde wetenschappelijke vaktijdschriften gepubliceerd. Via allerhande vormingsactiviteiten worden onderzoeksresultaten snel naar de fruitteeltsector verspreid.

2. Departement Biologie, K.U.Leuven

Partner Prof. Lutgarde Arckens

Prof. Lutgarde Arckens is hoofd van de onderzoeksgroep *Neuroplasticiteit en Neuroproteomics*, de eerste groep in Vlaanderen met extensieve expertise in 2D-DIGE en massaspectrometrie. De elegante resultaten en algemene inzetbaarheid van deze technologieën hebben reeds geleid tot meerdere succesvolle nationale en internationale samenwerkingen in het kader van diverse onderzoekstopics. Intra-universitair wordt zo samengewerkt met Prof. Dr. B. Nuttin (Lab. voor Exp. Neurochirurgie en Neuroanatomie), Prof. Dr. E. Decuypere (Lab. Fysiologie en Immunologie der huisdieren), Prof. Dr. F. Van Leuven (Dept. Menselijke Erfelijkheid), Prof. L. Schoofs (Lab. Ontwikkelingsfysiologie, genomics en proteomics) en inter-universitair met Prof. Dr. L Moens (Lab. voor Eiwitchemie, UIA) en Prof. Dr.E. Nouwen, Lab. voor Neurofarmacologie, UIA).

Ook internationaal staat de onderzoeksgroep aan de top omtrent het gebruik van massaspectrometrie. Internationaal wordt samengewerkt met Prof. Dr. J. Proudman (Biotechnology and Germplasm Lab., Beltsville, USA), Prof. Dr. C. Cuello en Prof. Dr. R. Quirion (Dept. of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Canada), Dr. N. Chartrel (Labo. de Neuroendocrinologie Cellulaire et Moléculaire, Université de Rouen), Prof. Dr. L.R. Berghman (Dept. Poultry Science, Texas A&M University, USA) en Prof. Dr. B. Hargis (Dept Poultry Science, University of Arkansas, USA).

Partner Prof. Roger Huybrechts

Als onderzoeksteam binnen de onderzoekseenheid Ontwikkelingsfysiologie, genomics en proteomics werd in het verleden in samenwerking met het team van Prof. Arckens de methode van differential display voor identificatie van differentiële genexpressie in de visuele cortex geoptimaliseerd. Deze methode wordt ook gehanteerd om vat te krijgen op het immuunsysteem bij de sprinkhaan. De apparatuur voor moleculair werk rond differential display is aanwezig in het laboratorium.

Partner Prof. Johan Billen

De onderzoeksgroep van het laboratorium voor Entomologie verricht onderzoek in het domein van sociale insecten, met vooral aandacht voor een functioneel-morfologische en een gedragsecologische benadering. De twee centrale topics hierin zijn enerzijds de studie van de communicatie in de insectengemeenschap, en anderzijds de mechanismen die aan de grondslag liggen van de reproductieve regulatie. Binnen het morfologische luik is deze groep gespecialiseerd in de studie van de bij sociale insecten bijzonder sterk ontwikkelde exocriene klieren. Het laboratorium maakt ook deel uit van een Europees netwerk waarin verschillende onderzoeksgroepen rond de problematiek van sociale insecten samenwerken. Behalve de eigen publicaties, is het lab. voor Entomologie sedert 1990 tevens de thuisbasis van het vooraanstaande tijdschrift *Insectes Sociaux*, waarvan projectpartner Prof. J. Billen fungeert als Editor-in-Chief.

Overzicht van de output van dit project

Wetenschappelijke publicaties:

- Beliën, T., Kellers, J., Heylen K, Billen J, Arckens L, Huybrechts R, Gobin, B. (2010): Identification and evaluation of sublethal effects of crop protection products on honey bees (*Apis mellifera*). IOBC bulletin 55: 55-59.
- Beliën T, Kellers J, Heylen K, Keulemans W, Billen J, Arckens L, Huybrechts R. Gobin B. (2009). Effects of sublethal doses of crop protection agents on honey bee (*Apis mellifera*) global colony vitality and its potential link with aberrant foraging activity. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 2009;74:245-253.
- Heylen K., Gobin B., Arckens L., Huybrechts R. & Billen J. (2010). The effects of four crop protection products on the morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of the European honeybee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, DOI: 10.1051/apido/2010043
- Heylen K., Gobin B., Billen J., Kellers J., Beliën T., Huybrechts R. & Arckens L. (2011) An integrated molecular and histological study on the impact of sublethal effects of the “Insect Growth Regulator” Fenoxycarb on the European honeybee, *Apis mellifera*. In submission.
- Heylen K., Gobin B., Billen J., Huybrechts R. Beliën T., & Arckens L. (2009) Sublethal effects of four pesticides on gene and protein expression in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. In submission
- Gobin B, Heylen K, Billen J, Huybrechts R, Arckens L (2008) Sub-lethal exposure of honey bees to crop-protection: Feeding behaviour and flower visits. *IOBC/WPRS Bulletin* 39:155-159.
- Gobin B, Heylen K, Billen J, Arckens L, Huybrechts R. (2008) Sublethal effects of crop protection on honey bee pollination: foraging behaviour and flower visits. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 73:405-408.
- Tobback, J., Heylen, K., Gobin, B., Wenseleers, T., Billen, J., Arckens, L. and Huybrechts, R. (2008). Cloning and expression of PKG, a candidate foraging regulating gene in *Vespula vulgaris*. *Animal Biology* 58, 341-351.
- Heylen K., Gobin B., Billen J., Hu T.-T., Arcken L.s & Huybrechts R. (2008). Amfor expression in the honeybee brain: the trigger for nurse-forager transition. *Journal of Insect Physiology* 54, 1400-1403.

Publicaties in de vakpers:

- Bangels E. & Beliën T. (2011) Lijst van de erkende insecticiden en acariciden in pitfruit voor 2011. *Fruiteeltnieuws* - 24(04): 16-17 + bijlage
- Bangels E. & Beliën T. (2010) Lijst van de erkende insecticiden en acariciden in pitfruit voor 2010. *Fruiteeltnieuws* - 23(04): 20-21 + bijlage
- Bangels, E. Beliën, T. (2009): Lijst van de erkende insecticiden en acariciden in pitfruit voor 2009. *Fruiteeltnieuws* 04 (6 maart 2009)
- Gobin B (2008) Het belang van goede bijenbestuiving. *Fruiteeltnieuws* 21 (april 2008): 38
- Bangels, E. en Gobin, B. (2008): Lijst van de erkende insecticiden en acariciden in pitfruit voor 2008. *Fruiteeltnieuws* 03 (9 februari 2008):16-17
- Gobin B (2008) Wintersterfte bij Bijen: Complexe oorzaken. *Fruiteeltnieuws* 21 (06): 21 maart. p30-31.
- Gobin B (2008) Complexe oorzaken van wintersterfte bij Bijen. *Maandblad van de Vlaamse Imkersbond* 96: juli/augustus p17-19.
- Gobin B (2007) Goede bestuiving nodig voor het fruit. *De Vlaamse Imker* april 2007
- Gobin, B. en Bangels, E. (2007): Intrekkingen en nieuwe erkenningen van erkende insecticiden en acariciden in pitfruit voor 2007. *Fruiteeltnieuws* 3 (9 februari 2007):16-17
- Gobin, B. en Bangels, E. (2007): Tabel van gecommmercialiseerde insecticiden/acariciden in pitfruit voor 2007. *Fruiteeltnieuws* 3 (9 februari 2007). Bijlage 2
- Gobin B (2006) Maximale bestuiving, een goede start voor het fruitseizoen. *Fruiteeltnieuws* 8 april 2006 p5-6.
- Gobin B (2006) Neveneffecten op bijen: identificatie en evaluatie van de impact van subletale effecten. *Maandblad van de Vlaamse Imkersbond* jg9 n°1 Jan-Feb 2006 p21

Gobin B (2005) Nevenwerking van gewasbeschermingsmiddelen op bijen. De Vlaamse Imker jg9 N°8 Okt 2005 p14-16

Wetenschappelijke verspreiding:

- Beliën, T., Kellers, J., Heylen K, Billen J, Arckens L, Huybrechts R, Gobin, B. (2011): Identification of sublethal effects of crop protection products on honey bees (*Apis mellifera*) and their impact on bee behavior and colony health. Bee-together"21-12-2010, Ghent.
- Beliën, T., Kellers, J., Heylen K, Billen J, Arckens L, Huybrechts R, Gobin, B. (2009): Identification and evaluation of sublethal effects of crop protection products on honey bees (*Apis mellifera*). IOBC/ wprs WG "Pesticides and Beneficial Organisms"- Meeting 07-09 October 2009, Dubrovnik, Croatia. Voordracht.
- Beliën T, Kellers J, Heylen K, Keulemans W, Billen J, Arckens L, Huybrechts R, Gobin B. (2009). Effects of sublethal doses of crop protection agents on honey bee (*Apis mellifera*) global colony vitality and its potential link with aberrant foraging activity. 61-th International Symposium on Crop Protection (ISCP 2009), Gent, Belgium. Voordracht
- Heylen K, Billen J, Huybrechts R (2008) An integrated molecular and histological study on the impact of sublethal effects of Fenoxycarb on the European honeybee, *Apis mellifera*. The International Congress of Entomology, 6-12 July 2008, Durban, South Africa,
- Gobin B, Heylen K, Billen J, Huybrechts R, Arckens L (2008) Sublethal effects of crop protection on honey bee pollination: foraging behaviour, flower visits and an evaluation of molecular characterization. 60th International Symposium on Crop Protection. May 20, Gent, Belgium
- Heylen K., Gobin B., Billen J., Huybrechts R. and Arckens L.. Side effects of crop protection products on honeybees: identification and evaluation of the impact of sublethal effects. Bee Benelux meeting. 8th of January 2008, Kolenmuseum, Leuven, Belgium
- K. Heylen, B. Gobin, J. Billen, R. Huybrechts and L. Arckens (2007). Honeybee brain gene expression analysis using cDNA-microarrays. Presentation on the Bee Lateral Symposium II (organized within the framework of a bilateral scientific project between Flanders and China) (BIL 04/11) 17/12/2007, abstract
- B. Gobin, E. Bangels, G. Peusens, K. Heylen, R. Huybrechts, J. Billen and L. Arckens (2007). Side-effects of crop protection substances on bees: identification and evaluation of sublethal effects. Bee Benelux meeting. 17th of January 2007, Proefcentrum Fruitteelt, Gorseme, Belgium, abstract
- Heylen K, Gobin B, Hu T-T, Billen J, Arckens L, Huybrechts R (2006) Development of a real-time RT-PCR assay to quantify the honeybee's (*Apis mellifera*) *Amfor* gene expression. Abstractbook of the 13th Benelux Congress of Zoology, 27th-28th October, Leuven, Belgium
- Heylen K, Gobin B, Billen J, Arckens L, Huybrechts R (2006) Study of the *Amfor* gene expression in honeybees (*Apis mellifera*) using real-time PCR. Voordracht op het *Bee Lateral Symposium* (organized within the framework of a bilateral scientific project between Flanders and China (BIL 04/11) 12 Dec. 2006.
- Gobin B. (2006) Beyond bee molecules: pollination services, biohazard indicators and tons of fresh food. Voordracht op het *Bee Lateral Symposium* (organized within the framework of a bilateral scientific project between Flanders and China (BIL 04/11) 12 Dec. 2006.

Voordrachten voor de sector:

- Beliën T. (2011). Subletale effecten van gewasbeschermingsmiddelen op bijen: onderzoeksresultaten. Studiedag: Pesticiden in de fruitteelt en de impact op bijen. KHKempen. 26/02/2011. Geel.
- Beliën T. and Bangels E. (2010): Insecticiden en acariciden in de fruitteelt: proefervaringen. Voordracht voor voorlichters. 17/12/2010. St-Truiden
- Beliën T. (2010): Nevenwerking van gewasbeschermingsmiddelen op nuttigen in de pitfruitteelt. Voordracht voor voorlichters fytohandel. 07/12/2010. St-Truiden
- Beliën T. and Bangels E. (2010): Nevenwerking van gewasbeschermingsmiddelen op nuttigen in de pitfruitteelt. Voordracht voor voorlichters fytohandel. 03/12/2010. Alken.
- Beliën T. (2010): Activities, research and development pcfruit Zoology department. Voordracht voor groep studenten Gembloux. 02/10/2010. St-Truiden

- Beliën T. (2010): Activities, research and development pcfruit Zoology department. Voordracht voor groep onderzoekers Zuid-Afrika. 02/09/2010. St-Truiden
- Beliën T. (2010): Activities, research and development pcfruit Zoology department. Voordracht voor groep professor Cesare Gessler, studenten, voorlichters Europa. 28/06/2010. St-Truiden
- Beliën T. (2010): Activities, research and development pcfruit Zoology department. Voordracht voor groep voorlichters en fruittelers uit Libanon. 18/06/2010. St-Truiden
- Beliën T. (2010): Wandelvoordracht studiekkring Guvelingen: Actuele teelttips voor gewasbescherming van pitfruit 11/06/2010. St-Truiden.
- Beliën T. (2010): Activities, research and development pcfruit Zoology department. Voordracht voor groep voorlichters, beleidsmensen en fruittelers uit Chili. 08/06/2010. St-Truiden
- Beliën T. (2010): Actualiteiten in onderzoek en ontwikkeling in het kader van gewasbescherming in fruitteelt. Voordracht voor voorlichters. 31/05/2010. St-Truiden
- Beliën T. (2010): Milieuvriendelijke teeltwijzen ter productie van residu-arm fruit. Presentatie Cleantech platform Agentschap Ondernemen Antwerpen 07/04/2010. St-Truiden
- Beliën T. (2010): Nuttigen in de pitfruitteelt. Voordracht voor studenten Tuinbouw Hoge school Gent. 26/03/2010.
- Beliën T. (2010): Gewasbeschermingsavond Guvelingen: overzicht onderzoeksresultaten voor een optimale geïntegreerde bestrijding 12/03/2010. St-Truiden.
- Beliën T. (2010): Activities, research and development pcfruit Zoology department. Voordracht voor groep voorlichters, beleidsmensen en fruittelers uit Roemenië. 15/02/2010. St-Truiden.
- Beliën T. (2010): Voordracht insecticiden/acaraciden in aardbeienteelt. 19/01/10. Veiling Borgloon
- Beliën T. (2010): voordracht/overleg voorlichters praktijkadviezen voor een optimale geïntegreerde bestrijding 13/01/2010. Sint-Truiden
- Beliën T. (2009): Toelichtingen insecticiden producten fytohandel. 09/12/2009. Kerkom
- Beliën T. (2009): cursus erkend verkoper insecticiden. 01/12/2009. Herent
- Beliën T. (2009): cursus gevorderde imker, bijenbond Diksmuide: Belang bestuiving en impact van gewasbeschermingsmiddelen gebruikt in fruitteelt. 04/10/2009. Diksmuide.
- Beliën T. (2009): cursus 'bestuivingsimkerij': de honingbij als bestuiver / economisch belang van de honingbij 21/09/2009. Tessenderlo
- Beliën T. (2009): cursus 'bestuivingsimkerij': gewasbescherming in de fruitteelt en haar potentiële impact op bijen 11/02/2009. Tessenderlo
- Beliën T. (2009): Overzicht onderzoeksresultaten insecticiden. Cappelle-Fyto. 09/12/2009. Sint-Truiden
- Beliën T. (2009): Side effects of crop protection products on bees: scientific research project. Voordracht objectieven/resultaten project voor internationale groep studenten, universiteit Gembloux FSAGX. 25/11/2009. Sint-Truiden
- Beliën T. (2009): Sublethal effects of crop protection agents on honey bees: scientific research project. Voordracht objectieven/resultaten project voor internationale groep van Syngenta. 11/02/2009. Sint-Truiden
- Beliën T. (2009): Impact of sublethal contaminations of crop protection products on honey bees: aberrant onset of foraging and its influence on global colony vitality. Voordracht voor voorlichters fruitteelt. 16/07/2009. Sint-Truiden
- Beliën T. (2009): Sublethal doses of crop protection agents on honey bees: aberrant onset of foraging and its influence on global colony vitality. Voordracht voor internationale groep van Bayer Cropscience. 26/06/2009. Sint-Truiden
- Beliën T. (2009): Sublethal effects of crop protection agents on honey bees: scientific research project. Voordracht objectieven/resultaten project voor internationale groep van Belchim. 18/06/2009. Sint-Truiden.
- Beliën, T. (2009): wandelvoordracht praktijktips ter verbetering van bestrijdingsstrategieën en bescherming van bijen, Studiekkring Guvelingen, tuinbouwschool, 12/06/2009. Sint-Truiden

- Beliën, T. (2009) Impact of sublethal doses of crop protection agents on honey bees Voordracht voor groep Pflanzenschutzberater aus Rheinland-Pfalz 08/06/2009. St-Truiden.
- Gobin B (2008) cursus 'bestuivingsimkerij': de honingbij als bestuiver / economisch belang van de honingbij
- Gobin B (2008) cursus 'bestuivingsimkerij': gewasbeschermingsmiddelen en hun repercussie op de bijenvolkeren
- Gobin B (2007) gevorderde imkerkursus: gevaar bestrijding maart 2007 Roeselare
- Gobin B (2007) gevorderde imkerkursus: bijen en bestuiving maart 2007 Roeselare
- Gobin B (2007) voordracht: bestuiving en gewasbescherming november 2007 Brasschaat
- Gobin B (2006) Bijen en gewasbescherming, is er werkelijk een tegenstelling? Voordracht op het 17^e Vlaamse Imkerscongres, Hasselt, Belgium, voordracht voor een 300-tal imkers op 24 sept 2006
- Gobin B (2006) Bijen en bestuiving, de risico's verbonden aan gewasbescherming correct inschatten. Lesvoordracht voor de Limburgse Imkersbond, 18nov 2006
- Gobin B (2006) Bijen en bestuiving, de risico's verbonden aan gewasbescherming correct inschatten. Lesvoordracht voor de wase imkers, 17dec 2006, Beveren
- Gobin B (2005) The importance of bees in fruitgrowing . Symposium on challenges in crop protection strategies in fruit growing: new research developments, Hasselt, Belgium, voordracht naar een publiek uit fruitteeltsector en fytoindustrie

Deelname aan congressen en workshops:

- Studiedag: Pesticiden in de fruitteelt en de impact op bijen. KHKempen. 26/02/2011. Geel.
- Bee-together"21-12-2010, Ghent. free conference on pollinators with emphasis to stimulate interactions in the field.
- IOBC/ wprs WG "Pesticides and Beneficial Organisms"- Meeting 07-09 October 2009, Dubrovnik, Croatia.
- 61-th International Symposium on Crop Protection (ISCP 2009), Gent, Belgium.
- The 7th International Conference on Integrated Fruit Production (VII-th IFP 2008), Avignon, France. T. Beliën en B. Gobin
- The International Congress of Entomology, Durban, South Africa, 6-12 July 2008. K. Heylen en B. Gobin
- Bee Benelux meeting. 8th of January 2008, Kolenmuseum, Leuven, Belgium
- 60-th International Symposium on Crop Protection (ISCP 2008), Gent, Belgium.
- The Bee Lateral Symposium II (organized within the framework of a bilateral scientific project between Flanders and China) (BIL 04/11), 17 December 2007
- Bee Benelux meeting. 17th of January 2007, Proefcentrum Fruitteelt, Gorseme, Belgium,
- 13th Benelux Congress of Zoology, Oktober 2006, Voorstelling projectresultaten met posters.
- The *Bee Lateral Symposium* (organized within the framework of a bilateral scientific project between Flanders and China (BIL 04/11) 12 Dec. 2006.
- 2nd Eurbee meeting, Prague, 10th-14th September 2006, deelname door Kevin Heylen en Bruno Gobin
- Symposium Bijenbenelux, Melle 21 december 2005; DVK-CLO, Lezing B. Gobin: voorstelling IWT onderzoeksproject.
- Symposium on Challenges in crop protection strategies in fruit growing: new research developments, Hasselt, november 2005.
- 9th International symposium on Hazards of Pesticides to bees, York 12-14 October 2005. International Commission for plant-bee relationships
- zomer 2005: bezoeken aan het PPO Bijen, Universiteit Wageningen, Sjef Vandersteen. discussies en beknopte opleiding ivm met GLP studies op bijen, zodat we onze testen verder konden optimaliseren.

Organisatie congressen en workshops:

Jaarlijks symposium Bijenbenelux, 8 januari 2008, Leuven. Organisatie: Kevin Heylen en Lien Moors.: een ontmoetings- en uitwisselingsforum waarbij de verschillende onderzoeksgroepen uit België en Nederland ideeën uitwisselen. Voorstelling van de doelstellingen en onderzoeksresultaten van voorliggend IWT project.

Jaarlijks symposium Bijenbenelux, 18 januari 2007, Gorseem.

Een ontmoeting- en uitwisselingsforum waarbij de verschillende onderzoeksgroepen uit België en Nederland ideeën uitwisselen. Voorstelling van de werking van pcfruit, voorstelling van de doelstellingen en onderzoeksresultaten van voorliggend IWT project.

Doctoraatsthesis

Kevin Heylen 2009. Side effects of crop protection products on bees: identification and evaluation of the impact of sublethal effects. Promotoren prof. Arckens, prof. Huybrechts, Dr. Gobin

Licentiaatverhandelingen

Jeroen Kellers 2008. Subletale neveneffecten van gewasbescherming op bijen. promotor: Prof Wannes Keulemans, K.U.Leuven, co-promotor: Dr Bruno Gobin, pcfruit

In het kader van dit project werden verder aan de K.U.Leuven reeds 2 licentiaatverhandelingen verwezenlijkt:

Eva Soetemans 2007 Studie van de expressie van het foerageergen bij de Europese honingbij, *Apis mellifera* en de gewone wesp, *Vespula vulgaris* m.b.v. Real-time PCR- Evaluatie van de invloed van het juveniel hormoon analoog Fenoxycarb.

Nicolas Pardon 2007 Sublethale effecten onder invloed van gewasbeschermingsmiddelen bij de Europese honingbij, *Apis mellifera*, aan de hand van genexpressie- en morfologische analyse

Varia

Academiejaar 2008-2009: Begeleiding Bachelor student *Steve Bers*

Academiejaar 2007-2008: Begeleiding REGA stagiair *Ruud Cuyvers*

Academiejaar 2008-2009: Ondersteuning thesis reportage studenten journalistiek over bijenonderzoek in de fruitteelt