



Déclin des colonies d'abeilles et origine multifactorielle : cas de *Nosema ceranae* et des insecticides

Cyril Vidau, Marie Diogon, Julie Aufauvre, Régis Fontbonne, Bernard Viguès,
Jean-Luc Brunet, Catherine Texier, David Georges Biron, Nicolas Blot,
Hicham El Alaoui, et al.

► To cite this version:

Cyril Vidau, Marie Diogon, Julie Aufauvre, Régis Fontbonne, Bernard Viguès, et al.. Déclin des colonies d'abeilles et origine multifactorielle : cas de *Nosema ceranae* et des insecticides. *La Santé de l'Abeille*, 2011, 245 (9-10), pp.417-426. hal-01115873v2

HAL Id: hal-01115873

<https://hal.science/hal-01115873v2>

Submitted on 23 May 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Déclin des colonies d'abeilles et origine multifactorielle : cas de *Nosema ceranae* et des insecticides

par Cyril VIDAU^{1,2*}, Marie DIOGON^{1,2}, Julie AUFAUVRE^{1,2}, Régis FONTBONNE^{1,2},
Bernard VIGUÈS^{1,2}, Jean-Luc BRUNET³, Catherine TEXIER², David G. BIRON^{1,2},
Nicolas BLOT^{1,2}, Hicham EL ALAOUTI^{1,2}, Luc P. BELZUNCES³ et Frédéric
DELBAC^{1,2*}

¹ Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire Micro-organismes : Génome et Environnement, BP 10448, 63 000 Clermont-Ferrand, France

² CNRS, UMR 6023, LMGE, 24 avenue des Landais, 63 177 Aubière, France

³ INRA, UMR 406 Abeilles & Environnement, Laboratoire de Toxicologie Environnementale, Site Agroparc, 84 914 Avignon, France

* Correspondances : cyril.vidau@univ-bpclermont.fr; frederic.delbac@univ-bpclermont.fr

Sauf mention particulière, les photos et les graphiques de l'article sont ceux de l'article scientifique publié par les auteurs dans PLoS-One 6(6) : June 2011, Volume 6, Issue 6, e21550.

L'abeille, un acteur majeur dans le fonctionnement des écosystèmes

Chaque année du début du printemps jusqu'aux premiers jours de l'automne, des milliards d'abeilles sortent de leurs ruches et partent visiter les fleurs des paysages environnants. Elles y trouvent nectars et pollens, éléments essentiels à la base de leur alimentation. C'est par cette intense activité de butinage que l'abeille domestique participe activement à la pollinisation des

plantes sauvages et cultivées. Son influence directe sur la qualité et la quantité des récoltes ainsi que sur le maintien de la biodiversité florale est aujourd'hui largement validée et souligne le rôle prépondérant des abeilles (sauvages et domestiques) dans le fonctionnement des écosystèmes. En France, les abeilles domestiques, *Apis mellifera* (*Hymenoptera* : *Apidae*), sont l'outil de travail d'environ 70 000 apiculteurs professionnels et amateurs qui tirent bénéfice des labeurs de cet hyménoptère (environ 20 000 tonnes de miel récoltées en France en 2009).

De nombreuses colonies succombent chaque année

Hélas, depuis une quinzaine d'années, les colonies d'abeilles sont en proie à un mal étrange et peu compris des apiculteurs et des scientifiques. En effet, à chaque nouvelle saison, des milliers de colonies succombent. Devant ce phénomène, observé principalement par les apiculteurs européens et américains, de nombreuses pistes sont avancées : l'appauvrissement de la diversité et de la qualité des ressources alimentaires en lien avec l'intensification des monocultures et la modification des paysages, l'action d'agents pathogènes responsables de maladies comme la varroase, les loques ou la nosébose, le stress chimique provoqué par l'exposition des abeilles aux produits phytosanitaires et vétérinaires ou encore certains prédateurs tel que le frelon asiatique.

Les investigations entreprises dès lors nous ont beaucoup appris de l'influence des stress nutritionnels, parasitaires et chimiques sur la biologie de l'abeille et plus globalement sur la « physiologie » des colonies. Par ailleurs, cette période a largement contribué à la structuration de réseaux de recherche tel que le réseau européen COLOSS (Prevention of Colony LOSSes), et au regain d'intérêt porté à cette problématique sociale, économique et agronomique. Malgré tous les efforts consentis à ce jour, il semble qu'aucun des facteurs incriminés ne puisse être considéré comme seul responsable des mortalités observées.

L'origine multifactorielle : l'hypothèse la plus probable à la surmortalité des abeilles

Aujourd'hui les avis des experts s'orientent vers une origine multifactorielle, c'est-à-dire l'action combinée de plusieurs agents stressants (facteurs), pour expliquer le phénomène de surmortalité des abeilles. Ironiquement, dans la nature, l'action combinée et délétère d'agents stressants a souvent été observée. Une synthèse publiée dans la revue « Science of The Total Environment » en 2010 recense en effet plus de 150 études scientifiques concernant les interactions entre toxiques et stress « naturel ». Ainsi, dans 50 % des études où des organismes sont soumis à une pollution chimique et à une autre forme de stress (thermique, hydrique, nutritionnel ou biologique), l'effet observé est bien supérieur à la somme des effets individuels de chaque stress (Holmstrup *et al.*, 2010). De plus, il est intéressant de constater dans cette synthèse, que ces interactions dites « synergiques » s'observent sur de nombreux organismes très différents, puisque des amphibiens, des bivalves, des poissons ou encore des insectes peuvent en être victimes.

Par conséquent, il semble légitime de suggérer que de telles interactions puissent affecter la santé et la survie des abeilles. D'ailleurs, une première démonstration avait été faite dès 1972 par le chercheur allemand Anastasios Ladas. Celui-ci avait constaté que la sensibilité des abeilles au DDT (insecticide organochloré) était augmentée

lorsque les abeilles étaient soumises simultanément à d'autres stress. Il avait apporté la preuve que la température, la luminosité ou l'alimentation étaient des facteurs qui influençaient significativement la dose de DDT nécessaire pour tuer 50 % de la population. Encore plus intéressant, il avait montré que des abeilles infectées par *Nosema apis* présentaient également une sensibilité accrue au DDT. Ladas prévenait déjà de l'influence toute particulière que pouvaient représenter les maladies des abeilles sur leur tolérance aux pollutions environnementales. Plus récemment, les travaux publiés par l'équipe d'Yves Le Conte à l'INRA d'Avignon, ont encore plus clairement mis en évidence le rôle prépondérant de ces interactions sur la santé des abeilles. Ils ont en effet montré que le taux de mortalité d'abeilles exposées simultanément à des spores de *Nosema* spp. et à une alimentation contaminée par de l'imidaclopride était beaucoup plus important que celui d'abeilles exposées séparément à chacun de ces deux agents stressants (Alaux *et al.*, 2009). Illustrant clairement la thèse d'une origine multifactorielle, ces études ont également mis en exergue le danger trop souvent négligé que représente la présence de *Nosema* dans les colonies d'abeilles.

L'infection par *Nosema ceranae* sensibilise les abeilles à des doses sublétales d'insecticides

Nosema ceranae est un parasite intracellulaire responsable de la nosé-

mose de l'abeille adulte dont une plus ample description a déjà été publiée dans le numéro 232 de ce magazine (El Alaoui *et al.*, 2009). Un aspect particulier du cycle de ce parasite intracellulaire est que son développement s'effectue principalement dans l'intestin moyen des abeilles. Il est important de souligner que cet organe, outre ses fonctions dans la digestion et l'absorption des nutriments, est un site important de la détoxification, un processus qui permet de modifier la structure chimique des xénobiotiques et d'en diminuer leur toxicité. C'est pourquoi, l'une des raisons pouvant expliquer la synergie entre *Nosema* et des substances toxiques serait que la prolifération des parasites à l'intérieur de l'intestin affecte la capacité des cellules qui le composent à dégrader ces substances. Par conséquent, des doses sublétales de toxiques pourraient devenir létales si elles sont ingérées par des abeilles infectées.

Pour préciser la nature des interactions *Nosema*-insecticides, **nous avons réalisé une étude visant à déterminer l'effet de la consommation quotidienne de doses sublétales d'insecticides (fipronil et thiaclopride), sur la mortalité d'abeilles préalablement infectées par *Nosema ceranae*.** Les résultats de cette étude récemment publiée dans la revue PLoS One (Vidau *et al.*, 2011 ; <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0021550>) avaient été exposés au congrès de la FNOSAD à Arles en février 2011. Un plan expérimental détaillant la mise en œuvre de cette étude est présenté sur la figure 1.

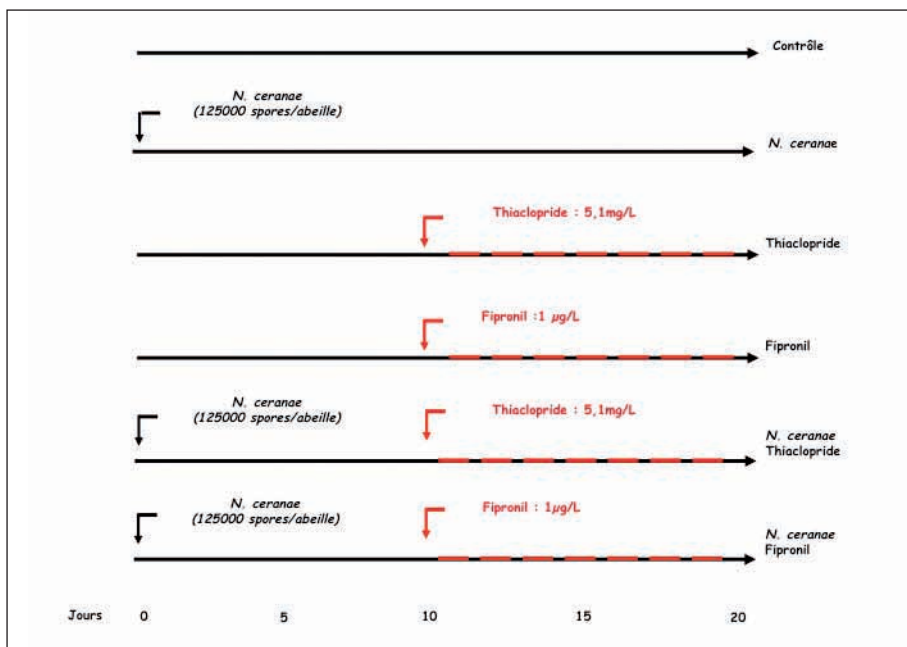


Figure 1 : Plan expérimental de l'étude.

Des abeilles naissantes sont réparties en 6 groupes expérimentaux constitués chacun de 3 cagettes de 50 abeilles. L'infection par *N. ceranae* est réalisée en nourrissant chaque abeille avec 5 µl d'une solution contenant 125 000 spores. Dix jours post-infection, les abeilles sont nourries *ad libitum* avec une solution de sucrose contenant l'insecticide (thiaclopride ou fipronil) à une concentration sublétales. Chaque jour les abeilles mortes sont retirées des cagettes et comptées. La quantité d'insecticide consommée quotidiennement est mesurée en pesant toutes les 24 heures les tubes contenant le sucrose contaminé.

Ce graphe a été réalisé par Cyril Vidau.

La figure 2 montre que 10 jours après infection par *N. ceranae*, le taux de mortalité est équivalent chez les abeilles infectées et non infectées. Pourtant, l'examen histologique de l'épithélium intestinal des abeilles infectées montre la présence de nombreux foyers qui renferment des parasites à différents stades de division (fig. 3B). La numération des spores contenues dans l'intestin et l'ampoule rectale révèle une charge parasitaire élevée (18,6 millions de spores par abeille en

moyenne), équivalente à celle mesurée chez des butineuses naturellement infectées.

Durant les 10 jours suivants, des groupes d'abeilles infectées et non infectées ont été exposés à de faibles doses de fipronil ou de thiaclopride (fig. 1). Comme le montre la figure 2, **l'exposition aux insecticides augmente significativement le taux de mortalité des abeilles infectées par *N. ceranae***. Plus précisément, alors que les abeilles seule-

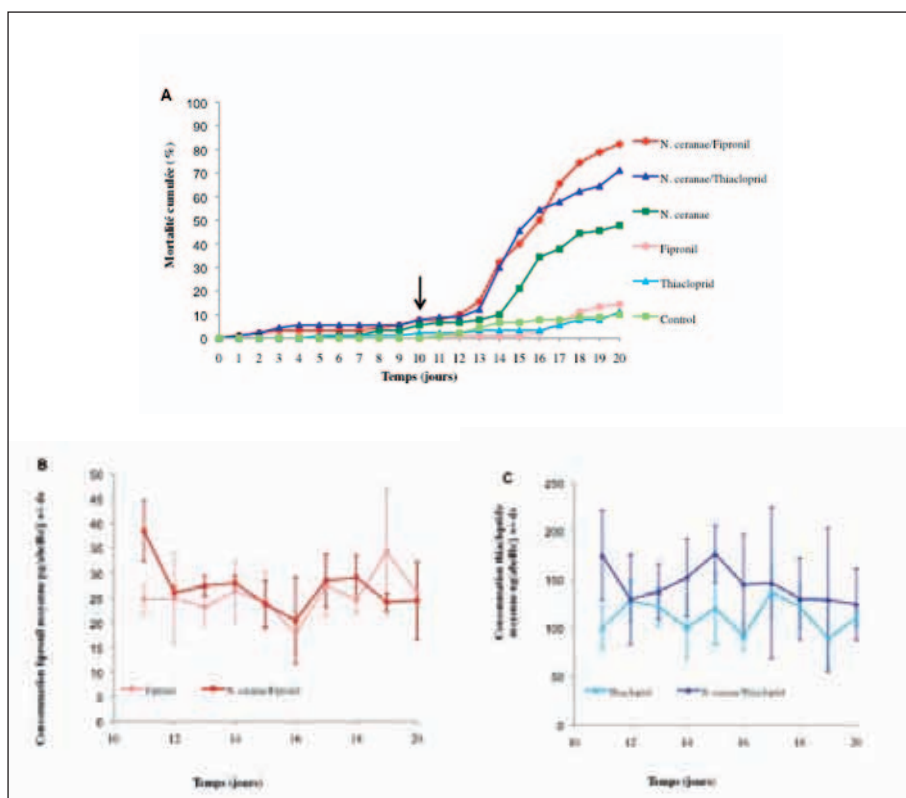


Figure 2 : Effet de l'infection par *Nosema ceranae* sur la sensibilité des abeilles aux insecticides.

A) Pourcentage de mortalité des abeilles (i) non traitées (contrôle, carré vert clair), (ii) infectées par *N. ceranae* (carré vert foncé), (iii) non infectées et exposées de manière chronique au fipronil (cercle rouge clair), (iv) non infectées et exposées de manière chronique au thiaclopride (triangle bleu clair) (v) infectées par *N. ceranae* puis exposées au fipronil (cercle rouge foncé) et (vi) infectées par *N. ceranae* puis exposées au thiaclopride (triangle bleu foncé). La flèche indique le jour à partir duquel les abeilles sont exposées aux insecticides (10 jours post-infection). Les données représentent le pourcentage de mortalité cumulée calculé à partir de 3 cagettes, chacune contenant 50 abeilles. Les consommations moyennes de fipronil (B) et de thiaclopride (C) (pg ou ng/abeille/jour $\pm$ déviation standard, ds) ont été mesurées chaque jour jusqu'au 20^e jour post-infection, pour les abeilles infectées (bleu et rouge foncé) et non infectées (bleu et rouge clair).

ment infectées présentent au 20^e jour de l'étude une mortalité de 47 %, la présence de thiaclopride et de fipronil dans l'alimentation d'abeilles infectées

génère respectivement une mortalité de 71 et 82 %. Durant la même période et comme il était attendu, **la consommation de fipronil et de thiaclopride par**

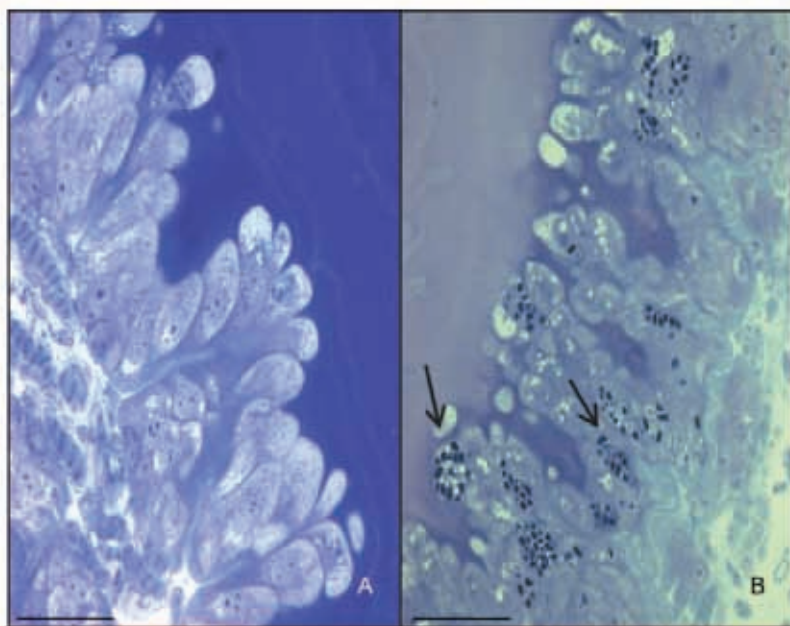


Figure 3 : Coupes semi-fines de l'épithélium intestinal d'abeilles non infectées (A) et infectées (B) par *Nosema ceranae*.

Les préparations sont colorées au bleu de toluidine. Les flèches indiquent les foyers infectieux de *N. ceranae*. Échelle = 25 μ m.

des abeilles non infectées ne provoque pas de surmortalité. Le suivi de la consommation quotidienne de chaque insecticide réalisé en parallèle révèle que les abeilles non infectées et infectées absorbent des doses comparables de fipronil ($25,3 \pm 4,8$ pg/abeille et $26,9 \pm 0,8$ pg/abeille respectivement chez les abeilles non infectées et infectées par *N. ceranae*) et de thiaclopride ($112,1 \pm 4,4$ ng/abeille et $152,8 \pm 8,7$ ng/abeille respectivement chez les abeilles non infectées et infectées par *N. ceranae*). Si l'on rapporte les doses ingérées à la DL50 du fipronil (4,2 ng/abeille) et du thiaclopride (17 μ g/abeille), on peut s'apercevoir que les abeilles infectées ont consommé quotidiennement des

doses plus de 100 fois inférieures à la DL50 de chaque insecticide.

Ces résultats démontrent clairement que **des doses d'insecticides sublétales deviennent létales lorsque des abeilles sont infectées par *N. ceranae***. De plus, la synergie existant entre ce pathogène (*N. ceranae*) et un insecticide n'est pas dépendante d'un type de molécule puisqu'à ce jour elle a été démontrée pour trois familles distinctes d'insecticides (organochlorés, néonicotinoïdes et phénylpyrazoles). Toutefois, dans notre étude, le mécanisme cellulaire à la base de la synergie entre *N. ceranae* et ces insecticides n'a pas pu être mis en évidence.

**L'abeille serait-elle
la seule victime
de l'effet synergique
entre agents pathogènes
et insecticides ?**

Pour élargir un peu la question, peut-être devrait-on se demander si l'abeille est seule victime de cette forme de synergie ? Pas vraiment ! En réalité, on trouve dans la littérature scientifique de nombreux articles illustrant notamment le phénomène de synergie entre parasites entomopathogènes et faibles doses d'insecticides. Ainsi, dans le cadre d'un programme de lutte intégrée d'insectes ravageurs, ces combinaisons peuvent faire partie des alternatives à l'usage unique et massif d'insecticides. Par ailleurs, l'utilisation de ces combinaisons permet également de contrer une partie des résistances que certains vecteurs de maladie comme les moustiques ont développée contre une grande partie des insecticides.

L'idée *a priori* bienveillante à l'origine de ces associations est de retirer une partie de la dose d'insecticide épandue dans le champ et d'en substituer le potentiel toxique perdu par l'ajout d'un micro-organisme au potentiel pathogène. Comme dans notre étude, cette combinaison pathogène-toxique induit bien souvent un effet synergique sur la mortalité des ravageurs ciblés. Il faudrait un article complet pour résumer et décrire convenablement ces travaux. Mais pour maintenir le parallèle avec notre étude, deux éléments frappants en ressortent :

- l'action de faibles doses de toxiques sur la cinétique de mortalité d'insectes parasités,
- et une diminution de la dose ou de la concentration de toxique nécessaire pour tuer 50 % des insectes parasités.

En effet, une étude parue dans la revue *Journal of Economic Entomology* (Pachamuthu et Kamble, 2000) montre que l'association du champignon *Metharizium anisopliae* avec des doses sublétales d'insecticides peut réduire le temps de survie des insectes visés. L'exemple le plus évident est illustré avec la combinaison Propetamphos/*M. anisopliae* pour laquelle le temps nécessaire pour tuer 50 % de la population de *Blattella germanica* (dictyoptères) est de 6 jours alors que 44 jours et 15 jours sont respectivement nécessaires si l'insecticide ou le champignon sont utilisés indépendamment.

Dans une autre étude plus récente (Purwar et Sachan, 2006), les auteurs montrent que les concentrations d'imidaclopride et d'oxydéméton-méthyl nécessaires pour tuer 50 % des larves de *Spilarctia obliqua* (lépidoptère) sont très significativement diminuées en présence des champignons *Beauveria bassiana* ou *Metharizium anisopliae*. Dans cette étude, on peut noter que la synergie maximale s'observe avec la combinaison imidaclopride/*M. anisopliae*. Les auteurs montrent en effet que l'imidaclopride est 72 fois plus toxique lorsqu'il est associé avec ce champignon.

Que peut-on retenir de ces observations et quelles sont les perspectives à ces études ?

D'abord qu'elles ne remettent pas en cause l'impact direct et délétère que peuvent avoir indépendamment les parasites et les faibles doses de toxiques sur la vitalité des insectes. Dans notre cas, il serait abusif de considérer que *N. ceranae* ne représente un risque qu'en présence d'insecticides et réciproquement. Bien au contraire, ces travaux s'ajoutent et renforcent le corps de données existant, d'une part sur la pathogénie des *Nosema* démontrée par de nombreuses études (Higes *et al.*, 2008; Antúñez *et al.*, 2009; Mayack et Naug, 2009; 2010; Alaux *et al.*, 2011) et d'autre part sur le risque lié aux faibles doses de toxiques (Suchail *et al.*, 2001; Desneux *et al.*, 2007; Aliouane *et al.*, 2009).

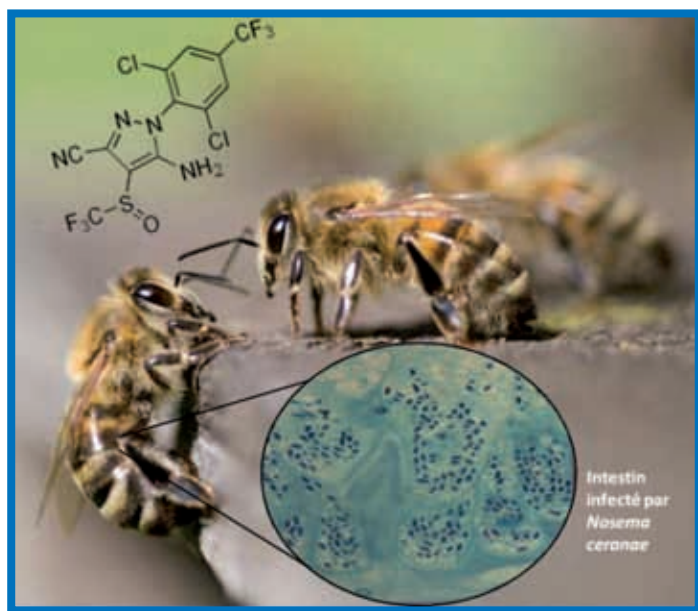
Pour valider définitivement les observations faites en laboratoire, l'impact réel des interactions *N. ceranae*-insecticides sur la vitalité des colonies devra bien entendu être démontré en milieu naturel. En parallèle, il sera nécessaire de caractériser les mécanismes moléculaires à l'origine de cette synergie.

Replacés dans un contexte multifactoriel, les problèmes posés par la nosémosse et les faibles doses de toxiques doivent être sérieusement et impartialement considérés. Concernant la nosémosse, alors qu'aucun produit vétérinaire

n'est disponible sur le marché, une augmentation de la prévalence de *N. ceranae* semble se profiler. Il convient par conséquent d'étudier, afin de pouvoir la limiter, la diffusion de *Nosema* entre les territoires. Notre équipe (« Interactions Hôtes-Parasites », LMGE, Clermont-Ferrand) est notamment impliquée dans des projets visant à :

- étudier la diversité génétique de *N. ceranae* pour mettre en évidence des souches avec des niveaux de virulence différents,
- déterminer si certaines races d'abeilles sont plus résistantes que d'autres à la nosémosse,
- rechercher la présence de *Nosema* chez différentes espèces d'abeilles sauvages (pour plus d'informations : <http://www.lmge.univ-bpclermont.fr>).

La mise au point de médicaments permettant de lutter contre la nosémosse apparaît également cruciale. C'est pourquoi nous nous sommes engagés dans la recherche et le développement de produits naturels possédant des propriétés anti-microsporidiennes pour contrer cette maladie. Enfin, l'évaluation et la gestion du risque lié à l'exposition chronique des abeilles à de faibles doses d'insecticides sont perfectibles (lire le témoignage de Janine Kievits n° 242 de La Santé de l'Abeille). La prise en compte de la toxicité chronique seule ou en lien avec les principales maladies des abeilles devrait être déterminante dans l'avenir pour le développement, la réglementation,



tion et l'utilisation de nouveaux produits phytosanitaires et vétérinaires. Afin d'améliorer notre réflexion sur l'origine multifactorielle des mortalités d'abeilles, des projets de recherche sur l'étude des effets délétères liés aux pathogènes de l'abeille et à la qualité de son environnement seront déposés prochainement par notre équipe. Preuve de l'importance de ce type d'études, le projet européen Nomiracle [NOvel Methods for Integrated Risk Assessment of CumuLative stressors in Europe (<http://nomiracle.jrc.ec.europa.eu/default.aspx>)], achevé en 2009, a mis en évidence le rôle clé et sous-estimé des interactions entre agents stressants sur la santé des organismes, l'Homme y compris. Les manques existants dans les procédures d'évaluation du risque des polluants environnementaux y sont également soulignés et des alternatives proposées.

En conclusion, il devient de plus en plus évident que les pertes d'abeilles constatées de par le monde ont une origine multifactorielle. Si l'origine multifactorielle du déclin des colonies d'abeilles faisait totalement consensus chez les apiculteurs et les scientifiques, les efforts jusqu'ici concentrés pour identifier un facteur unique pourraient dès lors se redéployer et s'associer afin de mieux qualifier et hiérarchiser l'importance respective de chacun de ces facteurs. Des stratégies et des outils de lutte efficaces contre les maladies des abeilles pourraient alors être envisagés de manière intégrée. Par ailleurs, une procédure d'évaluation des produits phytosanitaires prenant en compte les dernières avancées en toxicologie de l'abeille pourrait rationnellement être proposée aux législateurs.

Références

- Alaux C., Brunet J. L., Dussaubat C., Mondet F., Tchamitchan S., Cousin M., Brillard J., Baldy A., Belzunces L. P. and Le Conte Y. 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12: 774-82.
- Alaux C., Folschweiller M., McDonnell C., Beslay D., Cousin M., Dussaubat C., Brunet J. L. and Le Conte Y. 2011. Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 106: 380-5.
- Aliouane Y., El Hassani A. K., Gary V., Armengaud C., Lambin M. and Gauthier M. 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 113-22.
- Antúnez K., Martín-Hernández R., Prieto L., Meana A., Zunino P. and Higes M. 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ. Microbiol.* 11: 2284-90.
- Desneux N., Decourtaye A. and Delpuech J. M. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52: 81-106.
- El Alaoui H., Poincloux D., Diogon M., Roussel M., Texier C., Wawrzyniak I., Blot N., Vivarès C. et Delbac F. 2009. Des insectes à l'homme: la formidable réussite infectieuse des microsporidies, La Santé de l'Abeille, 232: 285-293.
- Higes M., Martín-Hernández R., Botías C., Bailón E. G., González-Porto A. V., Barrios L., Del Nozal M. J., Bernal J. L., Jiménez J. J., Palencia P. G. and Meana A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10: 2659-69.
- Holmstrup M., Bindesbøl A. M., Oostingh G. J., Duschl A., Scheil V., Köhler H. R., Loureiro S., Soares A. M., Ferreira A. L., Kienle C., Gerhardt A., Laskowski R., Kramarz P. E., Bayley M., Svendsen C. and Spurgeon D. J. 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Sci. Total Environ.* 408: 3746-62.
- Ladas A. 1972. The influence of some internal and external factors upon the insecticide resistance of honeybee. *Apidologie.* 3:55-78.
- Mayack C. and Naug D. 2010. Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *J. Insect. Physiol.* 56: 1572-5.
- Mayack C. and Naug D. 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J. Invertebr. Pathol.* 100: 185-8.
- Pachamuthu P. and Kamble S. T. 2000. *In vivo* study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 with sublethal doses of chlorpyrifos, propetamphos, and cyfluthrin against German cockroach (Dipteroptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 93: 60-70.
- Purwar J. P. and Sachan G. C. 2006. Synergistic effect of entomogenous fungi on some insecticides against Bihar hairy caterpillars *Spilarctia obliqua* (Lepidoptera: Arctiidae). *Microbiol. Res.* 161: 38-42.
- Suchail S., Guez D., Belzunces L. P. 2011. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 2482-6.
- Vidau C., Diogon M., Aufaure J., Fontbonne R., Viguès B., Brunet J. L., Texier C., Biron D. G., Blot N., El Alaoui H., Belzunces L. P. and Delbac F. 2011. Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One* 6(6): e21550.