

**Eterična olja s potencialom za zatiranje varoje (*Varroa destructor*):  
mehanizmi toksičnosti in negativen vpliv na medonosno čebelo  
(*Apis mellifera*)**

Essential oils with the potential for varroa mite control (*Varroa destructor*):  
mechanisms of toxicity and negative impact on honey bee (*Apis mellifera*)

Anita Jemec Kokalj, Gordana Glavan\*

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo,  
Večna pot 111, Ljubljana SI-1000, Slovenija  
\*korespondenca: gordana.glavan@bf.uni-lj.si

**Izvleček:** Varoja (*Varroa destructor*) je pomemben dejavnik umiranja čebel, zato njeno učinkovito zatiranje predstavlja enega izmed osrednjih problemov čebelarjenja. Trenutno čebelarji za zatiranje varoje največ uporabljajo sintetične akaricide. Zaradi njihovih negativnih učinkov na čebele ter kemičnih ostankov v čebeljih pridelkih je velik trend k vzpodbujanju uporabe naravnih akaricidov. Med naravne snovi s potencialnim akaricidnim delovanjem sodijo eterična olja in njihove aktivne učinkovine. Med njimi se nekatere, kot je timol, že dlje časa uporabljajo v čebelarstvu. V tem prispevku povzemamo dosedanje znanje o mehanizmih toksičnosti eteričnih olj, s poudarkom na delovanju na živčni in imunski sistem, ter o ostalih vplivih na čebele. Ugotavljamo, da bi lahko bila nekatera eterična olja glede na ugotovljene mehanizme toksičnosti uporabna za zatiranje varoje, vendar pa so njihovi negativni učinki na čebele zelo slabo raziskani. Še posebej so pomembna znanja o njihovem vplivu na imunski odziv, saj so spremembe le tega navedene kot eden izmed potencialnih možnih vzrokov za upad čebeljih družin. Med eteričnimi olji prevladujejo podatki za timol ter njegove pripravke (Apiguard®, Api Life VAR®), precej manj pa je podatkov o drugih pogostih aktivnih učinkovinah eteričnih olj. Zaključujemo, da obstaja potreba po sistematičnem testiranju vplivu akaricidnih eteričnih olj na čebele, s poudarkom na dolgotrajnih izpostavitvah izvedenih po principu aktualnih smernic testiranja strupenosti. Velik izziv za prihodnje raziskave predstavlja optimizacija nanosa in standardizacija uporabe eteričnih olj in njihovih učinkovin v čebelarstvu.

**Ključne besede:** akaricidi, eterična olja, *Apis mellifera*, živčni sistem, imunski sistem, varoja

**Abstract:** The parasitic bee mite varroa (*Varroa destructor*) is among the most serious honey bee pests. Beekeepers utilize a wide range of different synthetic acaricides to keep mite populations under control. However, due to documented adverse impact of synthetic substances, the use of naturally derived acaricides, among these essential oils, is greatly being promoted. Thymol is already used in beekeeping. We present a review of the existing knowledge regarding the effects of essential oils on honey bees *Apis mellifera*. We focus only on those that have potential acaricide action.

We discuss their mechanisms of toxic action on the immune and nervous systems. We conclude that due to their mechanisms of toxicity several essential oils could be used for varroa mite control, still very little data regarding the negative effects of essential oils on honey bees are known. In particular, knowing their interferences with the immune response is important to be able to predict the potential effect on the colony health. The majority of toxicity data currently exist for thymol and its commercial preparations under acute exposure (Apiguard®, Api Life VAR®), but the data for a number of other potential acaricide-related essential oils are missing. We recognize the need for systematic screening of potential toxicity and sublethal effects of essential oils with acaricide action on honey bees. Standardised application of essential oils in honey bee keeping remains a challenging task for the future.

**Keywords:** acaricides, essential oils, *Apis mellifera*, nervous system, immune system, varroa mite

## Uvod

Medonosne čebele (*Apis mellifera*) so eden ključnih oprasovalcev in so zato pomembne ne samo za okolje, temveč tudi ekonomsko. V zadnjih 10-15 letih se med čebelarji in v širši skupnosti pojavlja pereč problem nenadzorovanega propadanja čebeljih družin. Dosedanje raziskave so pokazale, da je za propad čebeljih družin krivih več dejavnikov, kot so: intenzivno kmetijstvo, uporaba pesticidov, stradanje in slaba prehranjenost čebel ter predvsem pojavnost virusov in invazivnih vrst kot so pršice varoja (*Varroa destructor*), azijski sršen (*Vespa velutina*) in mali panjski hrošč (*Aethina tumida*) (Sánchez-Bayo in sod. 2016). Bolezni pri čebelah niso nič novega, vendar pa je njihovo širjenje pospešil človek zaradi nenamernega vnosa patogenov v nova okolja, v katerih čebele še niso razvile odpornosti nanje. Zunanji zajedalec varoja (*Varroa destructor*) je prvotno zajedal vzhodno medonosno čebelo (*Apis cerana*), po prenosu na novega gostitelja medonosno čebelo *Apis mellifera* pa se je varoja razširila skoraj po celotnem svetu in danes predstavlja grožnjo medonosni čebeli (Rosenkranz in sod. 2010). Domnevajo, da je varoja glavni dejavnik pri umiranju čebeljih družin. Pršica *V. destructor* je namreč relativno novi parazit medonosne čebele, zato odnos gostitelja in parazita še ni uravnotežen, poleg tega čebelarji nimajo dolgotrajnih izkušenj z zatiranjem varoje. Varoja se je v kratkem razširila skoraj po vsem svetu. Dandanes je praktično okužena že vsaka čebelja družina, z izjemo Avstralije. Brez

rednega zdravljenja lahko večina čebeljih družin v zmernem podnebnju propade v obdobju 2-3 let. Redna zdravljenja povečujejo stroške čebelarstva in tveganje za kemične ostanke v čebeljih izdelkih. Varoja velja za ključnega povzročitelja upada števila čebelarjev in zmanjšanega števila čebeljih družin v Evropi; skupaj s svetovnim zmanjšanjem naravnih oprasovalcev, lahko ta pršica še dodatno zmanjša uspešnost oprasovanja (Rosenkranz in sod. 2010).

Učinkovito zatiranje varoje je zato nedvomno eden izmed osrednjih problemov čebelarjenja. Čebelarji za zatiranje varoje uporabljajo različne sintetične pripravke, različne načine nanosa kemikalij in tudi biotehnoške metode (Dietemann in sod. 2015). Trenutno so za zatiranje škodljivcev in zunanjih parazitov največ v uporabi sintetične kemične spojine, ki hitro zagotavljajo svoj učinek. Večja uporaba sintetičnih akaricidov s strani čebelarjev temelji na večji in hitrejši učinkovitosti, vendar se le-ti kopičijo in so dolgo obstojni v čebeljem vosku, na njih pršice razvijejo odpornost, dokazani pa so tudi negativni učinki na čebele. Te učinkovine so lahko škodljive tudi za ljudi. Posledično je na področju raziskav s čebelami velik trend k vzpodbujanju testiranja naravnih akaricidov. V Sloveniji je bil leta 2008 uveden enotni operativni program za zatiranje varoze čebel, saj je bil v zimskem obdobju 2006/2007 opažen 16 % upad čebeljih družin. V omenjenem programu je bilo priporočeno, da se vsako leto poveča uporaba naravnih zdravilnih učinkovin, ki

vsebujejo organske kisline in eterična olja (Rejski program za kranjsko čebelo 2010).

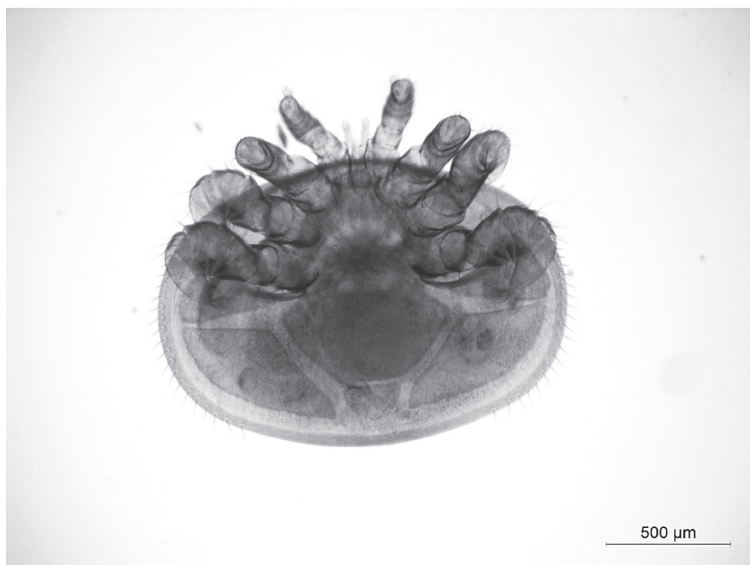
Trajnostni princip zatiranja varoze naj bi temeljil na uporabi akaricidov, ki predstavljajo visoko učinkovitost v boju proti pršicam in nizko tveganje za čebele, pa tudi za človeka (Imdorf in sod. 1999). Zato se kot nadomestilo sintetičnim akaricidom vse bolj vzpodbuja uporaba akaricidov z naravnim izvorom oz. naravnih akaricidov. V nasprotju s sintetičnimi akaricidi, v čebeljih pridelkih ostaja manj naravnih pripravkov in pršice nanje ne razvijejo odpornosti. Med naravne akaricide sodijo predvsem nekatera eterična olja ter organske kisline. Vendar pa imajo lahko tudi naravni akaricidi v določenih primerih neželene učinke na zdravje čebel, kar se zgodi predvsem pri neustrezni uporabi, pri kateri lahko pride do lokalno presežene za čebele škodljive koncentracije uporabljene snovi.

Ugotavljamo, da so podatki o potencialnih negativnih vplivih naravnih akaricidov na čebele pomanjkljivi. Zato smo pripravili pregled obstoječih znanj na tem področju z namenom spodbude tovrstnih raziskav v prihodnosti. Osredotočili smo se predvsem na tista eterična olja, ki imajo dokazan

toksični učinek na varoja. Povzeli smo podatke o strupenosti teh snovi za čebele, posebej pa smo se osredotočili na mehanizme toksičnosti, s poudarkom na živčni in imunski sistem. Primerjalno podajamo tudi mehanizme delovanja toksičnosti najbolj uporabljenih sintetičnih akaricidov.

### Vpliv varoje (*Varroa destructor*) na čebele

Varoja (*V. destructor*) (Sl. 1) za preživetje potrebuje gostitelja. V razvojnem ciklu parazita samic obstajata dve ločeni fazi. Prva je foretična faza, ki poteka na odrasli čebeli, druga je reprodukcijska faza, ki poteka v pokritih satnih celicah trotov, delavk in matic. Samci in nimfe pršice *V. destructor* živijo kratek čas in njihov razvoj poteka izključno v pokritih satnih celicah. Varoja pije hemolimfo ličink in bub znotraj pokritih celic satovja in odraslih čebel (Rosenkrantz in sod. 2009). Simptome pri čebelah kot posledica okuženosti imenujemo varoza. Čebele varoja prizadene na več načinov. Najbolj občutljive so ličinke v razvoju in bube, saj se zaradi izgube hemolimfe med ontogenetskim



**Slika 1:** Pršica varoja *Varroa destructor* (ventralno). Sliko smo posneli na trajnem preparatu na Oddelku za biologijo (foto A. Jemec Kokalj).

**Figure 1:** Varroa mite *Varroa destructor* (ventral view). Foto was taken by A. Jemec Kokalj at the Department of Biology (permanent slide preparation).

razvojem bistveno zmanjša njihova teža. Izguba teže je odvisna od števila pršic. V povprečju ličinke in bube delavk izgubijo 7% telesne teže, odrasli troti pa 11–19%, odvisno od stopnje okužbe. Zaradi okužbe se skrajša življenjska doba delavk, ki prej začnejo s pašno aktivnostjo, zmanjšana je tudi sposobnost učenja in navigacije, kar posledično zmanjša uspešno vrnitev pašnih čebel v panj. Troti, ki so bili okuženi med njihovim razvojem, imajo zmanjšano sposobnost parjenja z maticami (Duay in sod. 2002) in v okuženih družinah je rojenje okrnjeno (Fries in sod. 2003, Villa in sod. 2008). Varoja je prenašalka različnih čebeljih virusov, kot so virus deformiranih kril, virus akutne paralize, kašmirski virus čebel in virus mešičkaste zalege (Rosenkrantz in sod. 2009). Domnevajo, da umiranje čebeljih družin predvsem posledica okužb z virusi, ki jih prenaša varoja, in ne toliko posledica neposrednega vpliva varoje na čebele.

## Vrste akaricidov

Akaricidi, ki se uporabljajo v čebelarstvu, so bodisi sintetični ali pa naravni. Najpogosteje uporabljeni sintetični akaricidi in njihovi pripravki za zatiranje varoje v zadnjih 15 letih so: organofosfat kumafos (CheckMite<sup>®</sup>, Asuntol<sup>®</sup>, Perizin<sup>®</sup>), piretroid tau-fluvalinat (Apistan<sup>®</sup>, Klartan<sup>®</sup>, Mavrik<sup>®</sup>), flumetrin (Bayvarol<sup>®</sup>) in formamidin amitraz (Rosenkranz in sod. 2010). Slovenski čebelarji uporabljajo predvsem flumetrin (Bayvarol<sup>®</sup>), amitraz (Varidol<sup>®</sup>) in kumafos (CheckMite<sup>®</sup>).

Med naravne učinkovine z akaricidnim učinkom sodijo predvsem eterična rastlinska olja ter organske kisline. Rastlinska eterična olja so kompleksne mešanice dišavnih snovi, pridobljene iz rastlin z ekstrakcijo vodne pare, suho destilacijo ali mehansko obdelavo brez ogrevanja (Vigan in sod. 2010). Glavne sestavine eteričnih olj so monoterpeni in seskviterpeni, ki predstavljajo približno 90 % vseh sestavin, v manjšem deležu pa so prisotne še druge sorodne aromatske spojine (Blenau in sod. 2012). V rastlinah imajo eterična olja različne fiziološke vloge, kot so privabljanje/odganjanje insektov, zaščita pred vročino/mrazom in kot obramba pred paraziti (Koul in sod. 2008). Imajo tudi fungicidno in baktericidno aktivnost. Zaradi teh lastnosti imajo eterična olja dokazano toksično delovanje na različne vrste organizmov,

tudi na ljudi (Vigan 2010). Celoten seznam potencialnih eteričnih olj, ki imajo potencialne akaricidne lastnosti (povzročijo smrtnost različnih vrst pršic), je zelo obširen (Imdorf in sod. 1999, Koul in sod. 2008, Blenau in sod. 2012). Med najpogostejše omenjena imena rastlin, iz katerih so bila proizvedena eterična olja z dokazanim vplivom na varoje, sodijo: *Thymus vulgaris*, *Thymus kotschyanus*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Salvia officinalis*, *Origanum vulgare*, *Azadirachta indica*, *Citrullus colocynthis*, *Cymbopogon citratus*, *Satureia hortensis*, *Rosemarinus officinalis*, *Lavandula officinalis* in *Tagetes minuta* (Ghasemi in sod. 2011). Aktivne učinkovine teh eteričnih olj, s katerimi največkrat povezujejo akaricidno aktivnost, so timol, kafra, mentol, karvakrol, idr. (Imdorf in sod. 1995, Sammataro in sod. 2009, Blenau in sod. 2012). Imdorf in sod. (1999) povzemajo testiranja učinkovitosti različnih učinkovin eteričnih olj na zmanjšanje okuženosti čebel z varoje. Kar 150 različnih eteričnih olj in njihovih učinkovin je bilo testiranih v laboratorijskih pogojih in le malo se jih je izkazalo za učinkovite pri testiranju v panjih, z izjemo timola. Na učinkovitost zdravljenja čebel z eteričnimi olji namreč močno vplivajo precejšnje spremembe v lokalnih razmerah v okolju in znotraj čebeljih družin, predvsem temperatura. Eterična olja so namreč hlapljiva, zato je regulacija koncentracij učinkovin pri tretiranju v panju otežena. Poleg tega so težave tudi pri standardizaciji vsebnosti aktivnih učinkovin eteričnih olj, saj je znano, da je po ekstrakciji eteričnega olja iz iste vrste rastlin vsebnost aktivne učinkovine lahko različna.

Glede na mrežo predstojnikov agencij za zdravila (*angl.* Heads of Medicines Agencies; HMA 2015), ki deluje v okviru Evropske komisije, se v državah članicah EU uporabljajo naslednja eterična olja, njihove sestavine in komercialni pripravki: timol (Api Var<sup>®</sup>, Apiguard<sup>®</sup> in Thymovar<sup>®</sup>), evkaliptusovo olje, kafra, levomentol (Apilife Var<sup>®</sup>) ter zmesi 3-*p*-cimenola, 2,4 heksandiojske kisline in drugih eteričnih olj (Mehpatika<sup>®</sup>). V Sloveniji čebelarji uporabljajo pretežno pripravke, ki vsebujejo velik delež timola (Apiguard<sup>®</sup> in Thymovar<sup>®</sup>).

## Glavne tarče akaricidov pri čebeli

V tem poglavju želimo najprej na kratko predstaviti dva glavna fiziološka sistema čebel,

t.j. živčni in imunski sistem, na katera prvenstveno delujejo sintetični akaricidi in eterična olja z akaricidnim delovanjem. V nadaljevanju pa smo pripravili pregled obstoječih podatkov o vplivu določenih akaricidov na komponente omenjenih sistemov. Poleg vplivov eteričnih olj na čebele primerjalno podajamo tudi podatke o vplivu nekaterih najbolj pogosto uporabljenih sintetičnih akaricidov.

## Živčni sistem čebel

Holinergični sistem je eden izmed najpomembnejših ekscitatornih sistemov živčnega sistema čebel (Bicker 1999, Thany in sod. 2010). Holinergični nevroni sintetizirajo ter sproščajo živčni prenašalec acetilholin, ki so ga dokazali bolj ali manj po celotnem živčnem sistemu. Acetilholin deluje na dva tipa receptorjev: muskarinske in nikotinske, muskarinski so pretežno presinaptični, nikotinski pa postsinaptični (Thany in sod. 2010). Muskarinski receptorji so pomembni za uravnavanje sproščanja acetilholina, saj z vezavo na muskarinske receptorje, zavira nadaljnjo sproščanje acetilholina, aktivacija postsinaptičnih nikotinskih receptorjev pa povzroči vzbujenje postsinaptičnega nevrona. Acetilholinesteraza (AChE), na katero inhibitorno delujejo nekateri akaricidi, je encim, ki povzroča inaktivacijo acetilholina s hitro hidrolizo v sinapsah (Thany in sod. 2010). Večino encima AChE v glavi čebel najdemo predvsem v sestavljenem očesu in očescih (Kral 1980, Kral in Schneider 1981). V možganih pa je prisotna v področju antenarnih lobusov ter kaliksov gobastih teles, optičnih lobusih, v nevrotilu, ki povezuje obe hemisferi ter področjih znotraj protocerebruma (sprednjih možganov) (Kreissl in Bicker 1989, Scheidler in sod. 1990). Nikotinskih receptorji se v možganih čebel nahajajo predvsem na Kenyonovih celicah gobastih teles ter nevronih antenarnih lobusov (Bicker 1999, Nauen in sod. 2000, Deglise in sod. 2002, Wustenberg in Grunewald 2004, Barbara in sod. 2005, Thany in sod. 2010). Pokazali so, da so nikotinski receptorji vpleteni v nastanek olfaktor-nega (vonjalnega) spomina, ki je zelo pomemben za uspešno usmerjanje čebel na pašo (Cano Lozano in sod. 1996, 2001). Možganske strukture pri čebeli, ki so pomembne za olfaktor-no učenje,

so antenalni lobusi, gobasta telesa, lateralni deli protocerebruma (sprednjih možganov) ter subezofagealni ganglij (Mobbs 1985). Prvo procesiranje olfaktornih informacij poteka v antenarnih lobusih, zato le-ti po analogiji predstavljajo olfaktor-ne bulbuse pri vretenčarjih (Hildebrand in Shepherd 1997). Vonjalna informacija se nato prevaja v višje integracijske centre kot so gobasta telesa ter po poteh, ki vodijo do subezofagealnega ganglija. Gobasta telesa so osnovni možganski center, ki nadzoruje kompleksa vedenja in so bistvena za nastanek olfaktor-nega spomina (Heisenberg 1998, Menzel 2001). Čebelje gobasto telo je sestavljeno iz parnih kaliksov (klobukov), pedunkla (peclja) ter dveh lobusov (režnjev), alfa in beta. Najpomembnejši vhodni informacijski del gobastih teles predstavljajo kaliksi, kamor prihajajo informacije iz drugih senzoričnih področij čebeljih možganov (Schurmann 1973, Mobbs 1982, Kenyon 1896). Kenyonove celice, nevroni gobastih teles, hkrati obdelujejo različne senzorične informacije ter jih nato prevajajo v alfa ter beta lobusa, ki predstavljata glavna izhodna dela gobastih teles (Schurmann 1970, Mobbs 1982, Rybak in Menzel 1993, 1998).

Gama-aminomaslena kislina (GABA) je osnovni inhibitorni živčni prenašalec centralnega živčnega sistema ter živčno-mišičnih stikov (Chapman 1998). Pri čebelah je GABA prisotna v nevrotilu, v strukturah, povezane z učenjem in spominom (antenalni lobus – tipalnični reženj, gobasto telo ter optični lobusi – vidni reženj) (Schäfer in Bicker 1986, El Hassani in sod. 2009). Z uporabo protiteles proti GABA so pokazali njeno prisotnost v lokalnih internevronih, v projekcijskih nevronih pa je prisotnost živčnega prenašalca GABA precej okrnjena (Bicker in sod. 1985, Meyer in sod. 1986, Schäfer in Bicker 1986). GABA se v možganih čebele nahaja v približno 5% nevronov. Inhibitorni GABA internevroni v gobastih telesih vplivajo v nastanek olfaktor-nega spomina pri čebeli, tako da inhibirajo delovanje Kenyonovih celic (Grunewald 1999). Živčni prenašalec GABA so dokazali tudi v vidnih projekcijah, predvsem v optičnih lobusih (Schäfer in Bicker 1986). Pri medonosni čebeli verjetno obstajata vsaj dve vrsti GABAergičnih receptorjev, na pikrotoksin (antagonist GABA receptorjev) občutljivi ter na picrotoksin neobčutljivi receptorji (Sachse in Galizia 2002).

Oktopamin spada v skupino biogenih aminov (Farooqui 2011). Pri žuželkah oktopamin

deluje kot neurotransmitter, nevromodulator in nevrohormon in ima zato pomembno vlogo v različnih fizioloških procesih. V perifernem živčnem sistemu modulira aktivnost letalnih mišic, perifernih organov in večine senzoričnih organov. V osrednjem živčnem sistemu je vpleten v regulacijo motivacije, desenzibilizacije senzoričnih informacij, vzburjenja, iniciacije in vzdrževanja različnih ritmičnih vedenj, higienskega vedenja in kompleksnega socialnega vedenja, skupaj z učenjem in spominom. Pri čebelah so pokazali predvsem vpletenost oktopamina v plesno komunikacijo ter pašno aktivnost, uravnavanje iztegovanja žela ter olfaktorno učenje (Burrell in sod. 1995, Hammer in Menzel 1998, Farooqui in sod. 2003, Schwaerzel in sod. 2003, Barron in sod. 2007). V možganih čebel je oktopamin prisoten predvsem v gobastih telesih in v nevrotilu optičnih lobusov, predvsem v meduli ter v nevrosekretornih celicah, ki inervirajo žlezo corpora cardiaca (Mercer in sod. 1983, Kreissl in sod. 1994). Čebele imajo samo eno vrsto oktopaminskega receptorja AmOA1 (Grohmann in sod. 2003). Pri nevrohormonalnem delovanju oktopamina se le-ta sprošča v hemolimfo, transportira v ciljna tkiva in sproži mobilizacijo lipidov in ogljikovih hidratov, ter tako omogoči žuželkam podaljšano aktivnost ali pa okrevanje iz obdobja povečanega povpraševanja po energiji. Vpliva tudi na mobilizacijo hemocit po bakterijskih okužbah. Domnevajo, da posreduje pri celičnem imunskem odzivu, kot so hemocitna fagocitoza in nodulacija med bakterijsko okužbo (Farooqui 2011).

## Imunski sistem čebel

Imunski sistem čebel je prirojen in pretežno nespecifičen. Imunski sistem žuželk predstavlja: kutikula kot fizikalno-kemijska bariera, humoralna imunost, celična imunost in vedenjske strategije za zmanjšanje prenosa bolezni na nivoju družine. Humoralno imunost predstavljajo različne molekule, kot so antimikrobni proteini (AMP), proteini podobni komplementu in encimske kaskade, ki uravnavajo tvorbo melanina (Hillyer 2016). Humoralni odgovor se sproži s strani vzorčno prepoznavnih receptorjev ali receptorjev PRR, ki so odgovorni za prepoznavanje mikroorganizmov v telesu, kar sproži sintezo različnih AMP (James in Xu 2012). Sinteza AMP je uravnavana preko

številnih signalnih poti, štiri so našli tudi pri čebelah: Toll (pomembna za imunost ter razvoj), Imd, JNK in JAK/STAT (Evans in sod. 2006). Humoralni odgovor nastaja lokalno v prebavilih na mestu vdora mikroorganizmov, nastaja pa tudi sistemsko v hemocelu, kjer receptorji PRR prepoznavajo patogene ter inducirajo sintezo AMP v maščobnih telescih ter hemolimfi. Nekateri litični encimi, kot so esteraze, karboksilesteraze ter lizocimi lahko delujejo kot AMP (Hillyer 2016). Celično imunost predstavljajo odgovori različnih vrst hemocit po prepoznavanju patogenov, kar sproži fagocitozo (bakterije, virusi), nodulacijo (glive, skupki bakterij) ali enkapsulacijo (mnogocelični paraziti). Celična imunost omeji infekcije s strani patogenih organizmov (Evans 2006, Hillyer 2016). Fagocitozo spremlja sinteza melanina ter melanizacija nodulov ter kapsul. Značilna je hitra sinteza in nalaganje melanina na mesto okužbe in poškodbe. Ključni encim za sintezo melanina je fenoloksidaza. Akaricidi lahko vplivajo na čebelji imunski sistem na vseh nivojih z oslabitvijo humoralnega in celičnega odziva, pa tudi vedenjske imunosti. Maščobno telesce je pri žuželkah organ s številnimi metabolnimi funkcijami in je med drugim glavni organ udeležen v imunskem odzivu organizma. Celice maščobnega telesca, imenovane oenociti, so odgovorne za produkcijo proteinov, ki se sprostijo v hemolimfo in sodelujejo pri prepoznavanju patogena in pri mehanizmih imunske obrambe (Hillyer 2016). Tkivo maščobnega telesca je urejeno v tanke sloje celic ob integumentu, v direktnem kontaktu s hemocelom, bolj pogosto pa se ga najde v zadku žuželke (Roma in sod. 2010).

## Mehanizmi delovanja sintetičnih akaricidov in eteričnih olj na čebele

### *Vpliv na živčni sistem*

Pogosto uporabljen sintetični akaricid kumafos je organofosfat. Organofosfosfati inhibirajo acetilholinesterazo (AChE) (Fukuto 1990). Ker je AChE glavna sestavina večine sinaptičnih prenosov v žuželkah, lahko njeno zaviranje povzroči splošne motnje v delovanju vseh organskih sistemov (Kreissl in Bicker 1989, Desneaux in sod. 2007). Amitraz spada med formamidne akaricide. Formamidi delujejo toksično preko



agonističnega delovanja na receptor za nevro-modulator oktopamin (Evans in Gee 1980, Dudai in sod. 1987). Naslednji pogosto uporabljen akaricid tau-fluvalinat je piretroid (Davies in sod. 2007). Sintetični piretroidi blokirajo napetostno odvisne natrijeve kanalčke žuželk v membranah živčnih celic in s tem blokirajo delovanje živčnih celic (Davies in sod. 2007).

Tudi eterična olja delujejo toksično predvsem preko vpliva na živčni sistem (Blenau in sod. 2012). Ena izmed pomembnih tarč eteričnih olj v živčnem sistemu so receptorji za biogena amina oktopamin in tiramin. To so pokazali za eterična olja, ki vsebujejo eugenol,  $\alpha$ -terpineol in cimetni alkohol (Enan 2001). Toksičnost *p*-cimena, timola, karvakrola,  $\alpha$ -terpineola in karvona pri vinski mušici *Drosophila melanogaster* je sorazmerna z afiniteto vezave na tiraminski receptor, kar pomeni, da vse te snovi delujejo preko tega receptorja (Enan in sod. 2005). Potrjena je tudi delovanje eugenola, cimetnega alkohola, transanetola na oktopaminski receptor ter timola na receptor za tiramin (Blenau in sod. 2012). Pokazano je bilo, da nekatere snovi eteričnih olj delujejo tudi na GABAergični živčni sistem. Karvakrol, pulegon in timol so pozitivni alosterični modulatorji žuželčjih GABA<sub>A</sub> receptorjev in s tem dodatno ojačajo učinek delovanja živčnega prenašalca GABA (Blenau in sod. 2012). Tarče nekaterih monoterpenov so tudi TRP ionski kanalčki, ki jih najdemo v senzoričnih sistemih žuželk, kot je vidni sistem, pa tudi na termo-, mehano- ter proprioreceptorjih (Fowler in Montell 2013). Pokazano je bilo, da karvakrol, timol, eugenol, cimetni aldehyd, mentol in karveol delujejo inhibitorno na TRPL ionske kanalčke, ki so del družine TRP kanalčkov in za katere je znano, da so pomembni pri fototransdukciji, medtem ko pa kafa in borneol stimulirata te kanalčke (Blenau in sod. 2012).

## Vpliv na imunski sistem

Delovanje sintetičnih akaricidov na imunski sistem čebel je slabo raziskano. Naša prejšnja študija ter tudi študije tujih avtorjev so pokazale, da kronična izpostavitve akaricidom tau-fluvalinat, kumafos, amitraz in flumetrin spremeni izražanje nekaterih genov pri čebelah, ki so povezani z imunskim sistemom (Boncris-

tiani in sod. 2012, Garrido in sod. 2013, Cizelj in sod. 2016).

Boncrisiani in sod. (2012) so pokazali vpliv kumafosa na izražanje genov, ki so vpleteni v celični imunski odziv. Kumafos pri čebelah inhibira gen *Dscam* odgovoren za izražanje higienskega vedenja čebel, ki služi za obrambo proti varoji. Ta gen se izraža v hemocitah, kjer ima vlogo pri prepoznavanju in odstranjevanju patogenov. Kumafos je zmanjšal tudi izražanje gena *basket*, katerega izražanje aktivira melanizacijo ter protimikrobne in apoptotične obrambne mehanizme. Isti avtorji so pokazali tudi inhibicijo gena za vitelogenin, ki med drugim stimulira normalno delovanje hemocit pri imunskem odzivu (Amdam in sod. 2004, Boncrisiani in sod. 2012). Garrido in sod. (2013) so pri čebelah, tretiranih s kumafosom in flumetrinom, ugotovili spremenjeno izražanje genov za antimikrobne peptide (AMP), ki so del humoralne imunosti. V raziskavi Cizelj in sod. (2016) smo pokazali, da je vpliv kronične vzpostavitve kumafosa na imunski sistem kompleksen ter odvisen od razvojne stopnje čebele. Največje zmanjšanje smo opazili pri izražanju genov ličink in sicer za AMP defensin-1, za signalni peptid Spaetzle in gen za PGRP-SC protein, odgovoren za prepoznavanje patogenov. Pri bubah z belimi očmi je kumafos vplival predvsem na gene za AMP: *abaecin*, *lysozyme-2* in *defensin-1*. Pri odraslih čebelah smo po izpostavitvi kumafosu pokazali povečano izražanje genov, ki kodirajo AMP in beljakovine, ki so vključene v JAK / STAT in JNK signalne poti (Cizelj in sod. 2016). Vse te rezultate vplivov akaricidov je zaradi kompleksnosti imunskega sistema težko natančno pojasniti. Ugotovljeno je bilo tudi, da akaricida kumafos in tau-fluvalinat ter fungicid klorotalonil spremenijo sestavo bakterijske flore v prebavilih čebel in na tak način morebiti vplivajo na imunski sistem čebel (Kakumanu in sod. 2016).

Vplivi eteričnih olj na imunski sistem čebel so praktično neraziskani. Boncrisiani in sod. (2012) so ugotovili, da ima kronično tretiranje s pripravkom Apiguard®, ki vsebuje timol, podobne učinke na izražanje genov imunskega odgovora (*Dscam* in *basket*) kot kumafos. Zaradi podobnih mehanizmov delovanja sestavin eteričnih olj na organizme lahko pričakujemo, da tudi drugi naravni akaricidi vplivajo na imunski sistem, za potrditev pa so potrebne nadaljnje raziskave.

**Tabela 1:** Pregled obstoječih podatkov o strupenosti eteričnih olj in njihovih aktivnih učinkovin za čebele (*Apis mellifera*). Viri so razporejeni kronološko.  
**Table 1:** An overview of existing data on the toxicity of essential oils and their active ingredients for bees (*Apis mellifera*). References are arranged chronologically.

Razvojna stopnja čebele	Testiran parameter		Opisan učinek	Vir
	Način izpostavitve	Testirana snov		
Odrasle čebele, različne starosti	Izpostavitve v panjih, 15 g timola zavitega v gazo/panji, 4 x vnos v panj vsake 4 dni	Smrtnost	Niso opazili vpliva na odrasle čebele in zalego	Marchetti in Barbattini 1984
Odrasla čebela	Inhalacija, zrakovestna posoda z vmesnim obdobjem prezračevanja.	Smrtnost	a.) 72 h LD50 = 3 µg/L zraka b.) 72 h LD50 = 30-40 µg/L zraka c.) 72 h LD50 = 10-15 µg/L zraka d.) 72 h LD50 = 350 µg/L zraka	Imdorf in sod. 1995
Odrasla čebela	Inhalacija; nanos raztopin (10 µL) na dno 3-4 L zaprte posode, v kateri je kletka s čebelami	Smrtnost	15 eteričnih olj je imelo > 10 % učinek na čebele po 72 h. Največji učinek (100 % smrtnost) so imela eterična olja iz česna, čebule, in pelina. Sledijo timijan (92 %), origano (87 %), evkaliptus (67 %), poprova meta (48 %), koriander (40 %), kumina (17 %) idr.	Imdorf in sod. 1995
Odrasla čebela	Preko voska, laboratorij	Smrtnost	Po 3 dneh 10 % olja iz nagejnovih žbic povzroči 100 % smrtnost, 10 % olja iz majarona pa 20 % smrtnost čebel.	Imdorf in sod. 1995
Odrasle čebele, delavke, okužene z pršico <i>Acarapis woodi</i>	Nanos raztopine na dno steklene posode, čebele v kletki.	Smrtnost	a.) 24 h LC50 = 11 µg/mL b.) 24 h LC50 = 10 c.) 24 h LC50 = 10 d.) 24 h LC50 = 5,3 e.) 24 h LC50 = 6,6 f.) 24 h LC50 = 1,7 g.) 24 h LC50 = 17,1	Ellis in Baxendale 1997
Odrasle čebele, delavke, okužene z varjo	Nanos raztopine na dno petrijevke. Čebele izpostavljene v petrijevki.	Smrtnost	a.) 24 h; 5 mg/kletko ni učinka b.) 24 h; 2 mg/kletko: 11 % smrtnost c.) 24 h; 5 mg/kletko; 44 % smrtnost d.) 24 h; 5 mg/kletko; 56 % smrtnost e.) 24 h; 15 mg/kletko; 94 % smrtnost f.) 24 h; 5 mg/kletko; 78 % smrtnost	Lindberg in sod. 2000
Odrasla čebela, delavka	Oralna izpostavitve, raztopina saharoze, laboratorij	Smrtnost	24 h in 48 h; ni natančnih podatkov za LC50; smrtnost pri: a.) 2 µg/čebelo b.) 5 µg/čebelo c.) 8 µg/čebelo d.) 3 µg/čebelo e.) 24 h LD50 = 16-122 µg/čebelo in 48 h LD50 = 19-357 µg/čebelo	Albo in sod. 2003



Odrasla čebela	Izpostavitve v panjih	Smrtnost, razmnoževanje	a.) Apiguard <sup>65</sup> b.) Apliffe Var <sup>66</sup>	Po 4 tednih ni bilo učinka na preživetje odraslih čebel po tretiranju z 2,5 palice Api Life VAR ali 1 gelom Apiguarda/ panji. V obeh primerih pride do značilnega zmanjšanja velikosti zaloge, kar pomeni vpliv na reprodukcijo.	Floris in sod. 2004
Odrasle čebele, delavke	Nanos raztopine na dno petrijevke. Čebele v petrijevki.	Smrtnost	a.) timijan <sup>8</sup> b.) navadni lovor <sup>9</sup> c.) sivka <sup>10</sup>	a.) 24 h LC50 = 22; 48 h LC50 = 12 in 72 h LC50 = 8 µL/petrijevko b.) 72 h LC50 > 20 µL/petrijevko	Damiani in sod. 2009.
Odrasla čebela, delavka	Topična izpostavitve, 5 µL na dorzalno stran trupa, laboratorij	Smrtnost	a.) Timol b.) Origanovo olje* c.) Olje nageljnovih žbic <sup>11</sup> * d.) Mentol	a.) 4 h LC50 = 210,3 µg/čebelo b.) 4 h LC50 = 331,3 c.) 4 h LC50 = 238,6 d.) 4 h LC50 = 523,5	Gashout in Guzman-Novoa 2009
Larva	Nanos raztopine na dno testne posode, 5 µL; v panju	Smrtnost	a.) Timol b.) Origanovo olje* c.) Olje nageljnovih žbic* d.) Mentol	a.) 4 h LC50 = 150,7 µg/larvo b.) 4 h LC50 = 236,4 c.) 4 h LC50 = 281,4 d.) 4 h LC50 = 382,8	Gashout in Guzman-Novoa 2009
Odrasle čebele, različne starosti	Izpostavitve v panjih po navodilih proizvajalca <sup>7</sup> (28 dnevna izpostavitve)	Vedenje	Apiguard <sup>65</sup>	Čebele delavke se izogibajo stiku z Apiguardom. Ob stiku s pripravkom odrasle čebele ventilirajo (hitro zamahujejo s krili), mlajše (2- in 4-dnevne čebele) ne ventilirajo.	Mondet in sod. 2011
Odrasle čebele, različne starosti	Izpostavitve v panjih po navodilih proizvajalca <sup>7</sup> (30 dnevna izpostavitve)	Subletalni vplivi na izražanje genov	Apiguard <sup>65</sup>	Značilna sprememba izražanja genov, ki so udeleženi v detoksifikaciji in imunskem odzivu.	Boncrisiani in sod. 2012
Odrasle čebele, različne starosti	Izpostavitve v panjih, 3 tablete vsakih 7 dni/panj (vzorčenje čebel 1 teden po vnosu pripravka, vzorčenje vsak mesec Ix (skupno 3 jeseni in 3 spomladi)	Vedenje	Apliffe Var <sup>66</sup>	Opažen upad fototaktičnega vedenja (zmanjšan odziv na svetlobo).	Carayon in sod. 2014, Alayrangues in sod. 2016

\* sestava ni znana

1 *Cymbopogon citratus*, 67 % citral, 33 % neznano2 *Satureia hortensis*, 35 % karvakrol, 40 % Y-terpinene, 5 % p-cimene3 *Thymus vulgaris*, 40 % timol, 18 % p-cimene; 13 % Y-terpinene; 17 % neznano4 *Origanum vulgare*, 25 % timol, 14 % borneol, 7 % Y-terpinene, 40 % neznano

5 25 % timol v želatini

6

74 % timol, 3,7 % mentol, 3,7 % kafra, 16 % evkaliptovo olje

7

<http://www.vita-europe.com/products/apiguard/#HowtouseApiguard>

8

*Thymus vulgaris*, 65 % timol, 5,4% karvakrol

9

*Laurus nobilis*

10

*Lavandula officinalis*, *Lavandula hybrid*

11

*Syzygium aromaticum*

## Drugi negativni vplivi akaricidov na čebele

Zaradi načina aplikacije akaricidov v čebelarstvu so glede učinkov najbolj relevantni rezultati kroničnih tretiranj čebel s subletalnimi koncentracijami. Neželeni učinki subletalnih koncentracij kumafosa na čebele so zelo dobro dokumentirani. Tuji avtorji so poročali tudi o spremembah izražanja genov za detoksifikacijo in hormonov, ki sodelujejo pri nastanku različnih vedenj čebel, kot je juvenilni hormon III (Boncristiani in sod. 2012, Garrido in sod. 2013, Schmehl in sod. 2014, Chaimanee in sod. 2016). Subletalni odmerki kumafosa negativno vplivajo na vitelogenin in hexamerin 70B v čebeljih maticah, kar verjetno zmanjšuje njihovo življenjsko dobo, reproduktivno zmogljivost in povečuje oksidativni stres (Chaimanee in sod. 2016). Nivo izražanja proteina hexamerin Hsp70 po tretiranju s kumafosom je bil spremenjen tudi pri ličinkah (Gregorc in sod. 2012). Kumafos vpliva tudi na premer končnega, mešičkasto razširjenega dela (acinusa) krmilne žleze in sproži povečani nivo programirane celične smrti (Smodiš Škerl in Gregorc 2010). Ugotovljenih je bilo tudi veliko učinkov kumafosa na čebele na nivoju celotne družine. Kumafos zmanjša pašno aktivnost čebel (Schneider in sod. 2009) hkrati pa negativno vpliva na prenos hrane med pašnimi čebelami in delavkami ter med čebelami, ki skrbijo za ličinke, kar posledično negativno vpliva na razvoj zalege (Bevk in sod. 2012). Prav tako se lahko zmanjša prenos hrane med pašnimi čebelami plesalkami ter spremljevalkami, kar pomembno vpliva na usmerjanje čebel na pašo (Farina in Wainselboim 2005). Matice družin, ki so bile tretirane s kumafosom, imajo lahko zmanjšano telesno težo, zmanjšano težo ovarijev, poleg tega se matice nenavadno vedejo, njihove ličinke pa imajo visoko stopnjo umiranja (Haarmann in sod. 2002, Collins in sod. 2004, Pettis in sod. 2004). Po tretiranju s kumafosom je lahko zmanjšana tudi viabilnost spermijev trotoev (Burley in sod. 2008). Akutna letalna doza kumafosa je odvisna od starosti čebel in znaša 3 to 6  $\mu\text{g}$  na čebelo in je manjša za stare čebele (van Buren in sod. 1992).

Amitraz je formamidni akaricid, ki stimulira receptor za nevromodulator oktopamin (Evans in Gee 1980, Dudai in sod. 1987), zato bi lahko vplival

na pašno aktivnost čebel, vendar to ni raziskano. Pokazana pa je bila njegova akutna toksičnost na celice srednjega črevesja ličink čebel (Gregorc in Bowen 2000). Akaricid tau-fluvalinat deluje na napetostno odvisne natrijeve kanalčke in tako učinkovito odstranjuje varojo, vendar je relativno varen za čebele, saj ga čebelji detoksifikacijski encimi citokrom-P450-monooksigenaze učinkovito in hitro metabolizirajo (Johnson in sod. 2010). Vendar tau-fluvalinat verjetno ni neškodljiv za čebele in vpliva na zdravje matic in trotoev. Matice, izpostavljene visokim odmerkom tau-fluvalinata, so manjše od neizpostavljenih. Troti, izpostavljeni temu akaricidu tekom razvoja, bodisi spolno ne dozori in so neplodni ali pa imajo manjšo količino spolnih celic, vendar pa to naj ne bi imelo vpliva na število njihovih potomcev (Johnson in sod. 2010). Ne glede na nedvoumno dokazane negativne učinke kumafosa in tau-fluvalinata na čebele, pa raziskovalci Berry in sod. (2013) po aplikaciji v subletalnih koncentracijah komercialnih pripravkov Apistan® (tau-fluvalinat) in Check Mite® (kumafos) v panje niso zaznali negativnih učinkov obeh akaricidov na čebelje družine. Apistan® ali Check Mite® tako nista imela vpliva na količino zalege, medu, stopnje pašne aktivnosti, na čas vračanja pašnih čebel nazaj v panj in stopno okuženosti z nosečo.

Če primerjamo akutne letalne doze najbolj pogostih sintetičnih akaricidov, lahko ugotovimo, da je izmed zgoraj opisanih akaricidov amitraz najmanj toksičen za čebele, tau-fluvalinat in flumentrin pa sta najbolj toksična (Oruc in sod. 2012, Dai in sod. 2017). Namreč, akutna letalna doza amitraza je 14.83  $\mu\text{g}$  na ličinko čebel, kumafosa 2.7  $\mu\text{g}$  na ličinko in tau-fluvalinata 0.83  $\mu\text{g}$  na ličinko, flumentrina pa 0.527  $\mu\text{g}$  na odraslo čebelo.

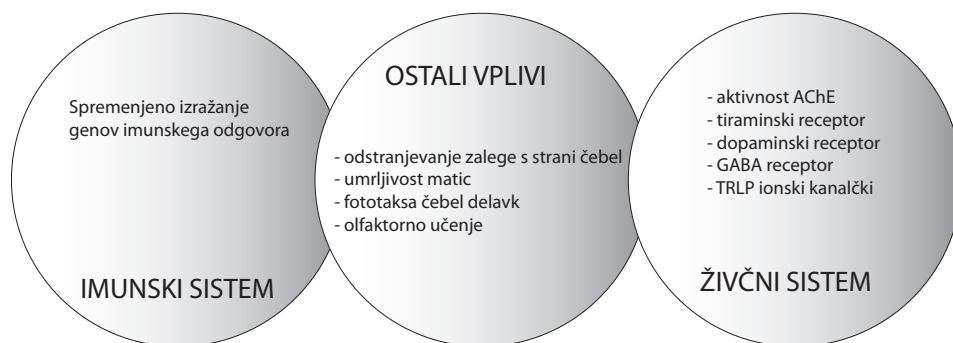
V primerjavi s sintetičnimi akaricidi je za naravne akaracide znanih bistveno manj podatkov glede njihove varnosti za čebele, sploh kar se tiče kroničnih izpostavitvev oziroma izpostavitvev subletalnim koncentracijam. V Tabeli 1 smo zbrali obstoječe podatke o strupenosti različnih eteričnih olj z akaricidnim delovanjem za čebele *A. mellifera*. Ugotovljamo, da so bile čebele v večini dosedanjih študijah izpostavljene akutno (4-72 ur) zelo visokim koncentracijam izbranih testnih snovi. Slednje je vodilo v visoko smrtnost čebel. Čebele so bile eteričnim oljem izpostavljene pod zelo različnimi pogoji. Eterična olja so bila

bodisi nanese na direktno v petrijevko ali stekleno posodo, v vosek, direktno na trup čebele, v nekaterih študijah pa so bile čebele izpostavljene v panju. Podajanje izpostavitvenih doz je zato neenotna. Čebele so bile pogosto okužene, saj so avtorji vzporedno proučevali tudi vpliv na zmanjšanje pojavnosti varoje, zato ti rezultati ne podajo informacije, kako bi se na testirano snov odzvale zdrave čebele. Zaključujemo, da obstaja potreba po sistematičnem testiranju vplivu naravnih akaricidov na čebele, kjer bi bile čebele le-tem izpostavljene pod enakimi pogoji in bi bili poskusi izvedeni po principu aktualnih smernic testiranja strupenosti, npr. OECD TG 245.

Na voljo je le malo podatkov o subletalnih učinkih akaricidnih eteričnih olj na čebele (Boncristiani in sod. 2012). Poleg že zgoraj omenjenih učinkov na imunski sistem (Boncristiani in sod. 2012) je bilo pokazano, da timol vpliva tudi na odstranjevanje zalege s strani čebel (Marchetti in sod. 1984, Floris in sod. 2004), povečuje umrljivost matic (Whittington in sod. 2000), zmanjša fototakso čebel delavk (Bergougnoux in sod. 2013) ter preprečuje olfaktorno učenje: pogojevanje refleksa iztegovanja proboscisa pri čebelah delavkah (Bonnafé in sod. 2016). Učinke eteričnih olj z akaricidnim delovanjem na čebelo smo povzeli na Sliki 2.

## Zaključki in nadaljnje smernice

V prispevku smo predstavili obstoječa znanja o vplivu eteričnih olj s potencialnim akaricidnim delovanjem na medonosno čebelo *A. mellifera*. Ugotavljamo, da je v nasprotju s sintetičnimi akaricidi, področje vpliva akaricidov z naravnim izvorom precej manj raziskano. Kratkotrajne študije so pokazale, da so v določenih visokih odmerkih nekatera eterična olja strupena za čebele. Vendar uporaba v čebelarstvu temelji na nižjih, subletalnih koncentracijah s podaljšanim tretiranjem. Testiranja subletalnih koncentracij eteričnih olj za zatiranje varoje v laboratoriju so pokazale visoko akaricidno učinkovitost velikega števila eteričnih olj ter relativno nizko toksičnost za čebele, zato so nadaljnje takšne raziskave perspektivne. Kot glavni tarči delovanja eteričnih olj na čebele smo izpostavili živčni ter imunski sistem. Še posebej so pomembna znanja o njihovem vplivu na imunski odziv, saj so spremembe le tega navedene kot eden izmed potencialnih možnih vzrokov za slabo zdravje čebel. Med eteričnimi olji prevladujejo podatki za timol ter njegove pripravke (Apiguard®, Apilife Var®), precej manj pa je podatkov o drugih pogostih aktivnih učinkovinah eteričnih olj. Zaključujemo, da obstaja potreba po sistematičnem testiranju vplivu akaricidnih eteričnih olj na čebele, s poudarkom na dolgotrajnih izpostavitvah izvedenih po principu aktualnih smernic testiranja strupenosti, npr. OECD TG 245.



**Slika 2:** Povzetek učinkov nekaterih eteričnih olj, ki se uporabljajo za zatiranje varoje, na medonosno čebelo *Apis mellifera*. (AChE:acetilholinesteraza; GABA: Gama-aminomaslena kislina).

**Figure 2:** Summary of the effects of some acaricide essential oils on the honey bee *Apis mellifera*. (AChE:acetylcholinesterase; GABA: gamma-aminobutyric acid).

Velik izziv za prihodnje raziskave predstavlja optimizacija aplikacije in standardizacija uporabe eteričnih olj in njihovih učinkovin v čebelarstvu.

## Summary

Beekeeping has been recognized as an essential part of food production in countries with intensive agriculture. Honey bees (*Apis mellifera*) are important pollinators and have great environmental, agronomic and economic importance. The parasitic bee varroa mite (*Varroa destructor*) is among the most serious honey bee pests and cause substantial economic losses in beekeeping industry. Effective varroa mite treatment is therefore a pressing issue worldwide. Beekeepers utilize a wide range of different synthetic chemical substances (called acaricides), and application techniques to keep mite populations under control. However synthetic acaricides cause mite resistance, they are persistent in the wax and have documented adverse effects on honey bees. Therefore the use of naturally derived substances is being promoted. One of these substances with known varroa mite toxic actions are essential oils. Among them, thymol is the one with the most frequent use. In this paper we review the existing knowledge regarding the effects of essential oils with known acaricide actions on honey bee *A. mellifera*. In particular, we focus on the mechanisms of toxic action on

the immune and nervous system. Also, other effects on honey bees are presented. We conclude that some essential oils could be effectively used to treat varroa mite but currently very little data regarding their sublethal chronic effects on honey bees are known. In particular, their interference in the immune response is important to be able to predict the potential effect on the colony health. The majority of toxicity data currently exist for thymol and its commercial preparations (Apiguard<sup>®</sup>, Apilife Var<sup>®</sup>), but the data for a number of other essential oils with the acaricidal potential are missing. We recognize the need for systematic screening of potential toxicity and sublethal effects of essential oils with acaricide action on honey bees. Existing honey bee toxicity testing guidelines should be employed, e.g. OECD TG 245. Standardized application of essential oils in beekeeping remains a challenging task for the future.

## Zahvala

Avtorici prispevka se zahvaljujeta izr. prof. dr. Janku Božiču za konstruktivne nasvete in pomoč pri pisanju. Delo je bilo financirano s strani Agencije za raziskovalno dejavnost RS (raziskovalni program: P1-0184).

Slika 1 je bila posneta v okviru infrastrukturnega centra »Mikroskopija bioloških vzorcev« na Biotehniški fakulteti (Univerza v Ljubljani).

## Literatura

- Alayrangues, J., Hotier, L., Massou, I., Bertrand, Y., Armengaud, C., 2016. Prolonged effects of in-hive monoterpenoids on the honey bee *Apis mellifera*. *Ecotoxicology*, 25, 856-862.
- Albo, G.N., Henning, C., Ringuelet, J., Reynaldi, F.J., De Giusti, M.R., Alippi, A.M., 2003. Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees. *Apidologie*, 34, 417-427.
- Amdam, G.V., Simões, Z.L., Hagen, A., Norberg, K., Schröder, K., Mikkelsen, Ø., Kirkwood, T.B., Omholt, S.W., 2004. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology*, 39(5), 767-773.
- Barbara, G.S., Zube, C., Rybak, J., Gauthier, M., Grünwald, B., 2005. Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology*, 191, 823-836.
- Bergognoux, M., Treilhou, M., Armengaud, C., 2013. Exposure to thymol decreased phototactic behaviour in the honeybee (*Apis mellifera*) in laboratory conditions. *Apidologie*, 44, 82-89.
- Barron, A.B., Maleszka, J., Vander Meer, R.K., Robinson, G.E., 2007. Octopamine modulates honey bee dance behavior. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*, 104, 1703-1707.

- Berry, J.A., Hood, W.M., Pietravalle, S., Delaplane, K.S., 2013. Field-level sublethal effects of approved bee hive chemicals on honey bees (*Apis mellifera* L). PLoS ONE, 8(10), e76536.
- Bevk, D., Kralj, J., Čokl A., 2012. Coumaphos affects food transfer between workers of honeybee *Apis mellifera*. Apidologie, 43, 465-470.
- Bicker, G., 1999. Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. Microscopy Research and Technique, 45(3), 174-183.
- Bicker, G., Schäfer, S., Kingan, T.G., 1985. Mushroom body feedback interneurons in the honey bee show GABA-like immunoreactivity. Brain Research, 360, 394-397.
- Blenau, W., Rademacher, E., Baumann, A., 2012. Plant essential oils and formamidines as insecticides/acaricides: what are the molecular targets? Apidologie, 43, 334-347.
- Boncrisiani, H., Underwood, R., Schwarz, R., Evans, J.D., Pettis, J., van Engelsdorp, D., 2012. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. Journal of Insect Physiology, 58, 613-620.
- Bonnafe, E., Alayrangues, J., Hotier, L., Massou, I., Renom, A., Souesme, G., Marty, P., Allaoua, M., Treilhou, M., Armengaud, C., 2017. Monoterpenoid-based preparations in beehives affect learning, memory, and gene expression in the bee brain. Environmental Toxicology and Chemistry, 36, 337-345.
- Burley, L.M., Fell, R.D., Saacke, R.G., 2008. Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa incubated at room temperature from drones exposed to miticides. Journal of Economic Entomology, 101(4), 1081-1087.
- Burrell, B.D., Smith, B.H., 1995. Modulation of the honey bee (*Apis mellifera*) sting response by octopamine. Journal of Insect Physiology, 41, 671-680.
- Cano Lozano, V., Bonnard, E., Gauthier, M., Richard, D., 1996. Mecamylamine-induced impairment of acquisition and retrieval of olfactory conditioning in the honeybee. Behavioural Brain Research, 81, 215-222.
- Cano Lozano, V., Bonnard, E., Gauthier, M., Richard, D., 2001. Memory impairment induced by cholinergic antagonists injected into the mushroom bodies of the honeybee. Journal of Comparative Physiology. A, 187, 249-254.
- Carayon, J.L., Tene, N., Bonnafe, E., Alayrangues, J., Hotier, L., Armengaud, C., Treilhou, M., 2014. Thymol as an alternative to pesticides: Persistence and effects of Apilife Var on the phototactic behavior of the honeybee *Apis mellifera*. Environmental Science and Pollution Research, 21, 4934-4939.
- Chaimanee, V., Evans, J.D., Chen, Y., Jackson, C., Pettis, J.S., 2016. Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. Journal of Insect Physiology, 89, 1-8.
- Chapman, R.F. 1998. Nervous system, The insects: structure and function, 5th ed. Cambridge University Press, Cambridge, 901 pp.
- Cizelj, I., Glavan, G., Božič, J., Oven, I., Mrak, V., Narat, M., 2016. Prochloraz and coumaphos induce different gene expression patterns in three developmental stages of the Carniolan honey bee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). Pesticide Biochemistry and Physiology, 128, 68-75.
- Collins, A.M., Pettis, J.S., Wilbanks, R., Feldlaufer, M.F., 2004. Performance of honey bee (*Apis mellifera*) queens reared in beeswax cells impregnated with coumaphos. Journal of Apicultural Research, 43, 128-134.
- Dai, P., Jack, C. J., Mortensen, A. N., Ellis, J. D., 2017. Acute toxicity of five pesticides to *Apis mellifera* larvae reared in vitro. Pest Management Science, doi:10.1002/ps.4608.
- Damiani, N., Gende, L.B., Bailac, P., Marcangeli, J.A., Eguaras, M.J., 2009. Acaricidal and insecticidal activity of essential oils on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Parasitology Research, 106, 145-152.
- Davies, T.G., Field, L.M., Usherwood, P.N., Williamson, M.S., 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. IUBMB Life, 59(3), 151-162.

- Déglise, P., Grünewald, B., Gauthier, M., 2002. The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neuroscience Letters*, 321, 13-16.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52(1), 81-106.
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S.J., Anderson, D.L., Locke, B., Delaplane, K.S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P., Ellis, J.D., 2013. Standard methods for varroa research, *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-54.
- Duay, P., de Jong, D., Engels, W., 2002. Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. *Genetics and Molecular Research*, 1, 227-232.
- Dudai, Y., Buxbaum, J., Corfas, G., Ofarim M., 1987. Formamidines interact with *Drosophila* octopamine receptors, alter the flies' behaviour and reduce their learning ability. *Journal of Comparative Physiology*, 161(5), 739-746.
- El Hassani, A.K., Dupuis, J.P., Gauthier, M., Armengaud, C., 2009. Glutamatergic and GABAergic effects of fipronil on olfactory learning and memory in the honeybee. *Invertebrate Neuroscience*, 9(2), 91-100.
- Ellis, M.D., Baxendale, F.P., 1997. Toxicity of seven monoterpenoids to tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) and their honey bee (Hymenoptera: Apidae) hosts when applied as fumigants. *Journal of Economic Entomology*, 90(5), 1087-1091.
- Enan, E., 2001. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology, C: Toxicology and Pharmacology*, 130, 325-337.
- Enan, E.E., 2005. Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 309-321.
- Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J.L., Jiang, H., Hultmark D., 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 645-656.
- Evans, J.D. 2006. Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93, 135-139.
- Evans, P.D., Gee, J.D., 1980. Action of formamidine pesticides on octopamine receptors. *Nature*, 287 (5777), 60-62.
- Farina, W.M., Wainseboim A.J., 2005. Trophallaxis within the dancing context: a behavioral and thermographic analysis in honeybees (*Apis mellifera*) *Apidologie*, 36, 43-47.
- Farooqui, T. 2012. Review of octopamine in insect nervous systems. *Open Access Insect Physiology*, 4, 1-17.
- Farooqui, T., Robinson, K., Vaessin, H., Smith, B.H. 2003. Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *Journal of Neuroscience*, 23, 5370-5380.
- Floris, I., Satta, A., Cabras, P., Garau, V.L., Angioni, A., 2004. Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*: effectiveness, persistence, and residues. *Journal of Economic Entomology*, 97(2), 187-191.
- Fowler, M.A., Montell, C., 2013. *Drosophila* TRP channels and animal behavior. *Life Sciences*, 92(8-9), 394-403.
- Fries, I., Hansen, H., Imdorf, A., Rosenkranz, P., 2003. Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden. *Apidologie*, 34, 389-398.
- Fukuto, T.R., 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*, 87, 245-254.
- Garrido, P.M., Antúnez, K., Martín, M., Porrini, M.P., Zunino, P., Eguaras, M.J., 2013. Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. *Journal of Insect Physiology*, 59, 113-119.



- Gashout, A.H., Guzmán-Novoa, E., 2009. Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, *Varroa destructor*, and to larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, 48, 263-269.
- Ghasemi, V., Moharrampour, S., Tahmasbi, G., 2011. Biological activity of some plant essential oils against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), an ectoparasitic mite of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Experimental and Applied Acarology*, 55, 147-154.
- Gregorc, A., Bowen, I., 2000. Histochemical characterization of cell death in honeybee larvae midgut after treatment with *Paenibacillus* larvae, amitraz and oxytetracycline. *Cell Biology International*, 24, 319-324.
- Gregorc, A., Evans, J.D., Scharf, M., Ellis, J.D., 2012. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). *Journal of Insect Physiology*, 58(8), 1042-1049.
- Grohmann, L., Blenau, W., Erber, J., Ebert, P.R., Strünker, T., Baumann, A., 2003. Molecular and functional characterization of an octopamine receptor from honeybee (*Apis mellifera*) brain. *Journal of Neurochemistry*, 86, 725-735.
- Grünwald, B., 1999. Morphology of feedback neurons in the mushroom body of the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Neurology*, 404(1), 114-126.
- Haarmann, T., Spivak, M., Weaver, D., Weaver, B., Glenn, T., 2002. Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations. *Journal of Economic Entomology*, 95, 28-35.
- Hammer, M., Menzel, R., 1998. Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learning and Memory*, 5, 146-156.
- Heisenberg, M., 1998. What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. *Learning and Memory*, 5 (1-2), 1-10.
- Hildebrand, J.G., Shepherd, G.M., 1997. Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Annual Review of Neuroscience*, 20, 595-631.
- Hillyer, J.F., 2016. Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental and Comparative Immunology*, 58, 102-118.
- HMA, Heads of Medicines Agencies, 2015. [http://www.hma.eu/uploads/media/Questionnaire\\_-\\_Bee\\_products\\_in\\_EU\\_EE\\_update\\_06.03.15.pdf](http://www.hma.eu/uploads/media/Questionnaire_-_Bee_products_in_EU_EE_update_06.03.15.pdf)
- Imdorf, A., Bogdanov, S., Ibáñez Ochoa, R., Calderone, N.W., 1999. Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies. *Apidologie*, 30, 209-228.
- Imdorf, A., Kilchenmann, V., Bogdanov, S., Bachofen, B., Beretta, C., 1995. Toxic effects of thymol, camphor, menthol and eucalyptol on *Varroa jacobsoni* Oud and *Apis mellifera* L in a laboratory test. *Apidologie*, 26, 27-31.
- James, R.R., Xu, J., 2012. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109, 175-182.
- Johnson, R.M., Ellis, M.D., Mullin, C.A., Frazier, M., 2010. Pesticides and honey bee toxicity - USA. *Apidologie*, 41, 312-331.
- Kakumanu, M.L., Reeves, A.M., Anderson, T.D., Rodrigues, R.R., Williams, M.A., 2016. Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1255.
- Kenyon, F.C., 1896. The meaning and structure of the so-called „mushroom bodies“ of the hexapod brain. *American Naturalist*, 356 (30), 643-650.
- Koul, O., Walia, S., Dhaliwal, G. S., 2008. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopesticides International*, 4(1), 63-84.
- Kral, K., 1980. Acetylcholinesterase in the ocellus of *Apis mellifica*. *Journal of Insect Physiology*, 26, 807-809.
- Kral, K., Schneider, L., 1981. Fine structural localisation of acetylcholinesterase activity in the compound eye of the honeybee (*Apis mellifica* L.). *Cell and Tissue Research*, 221(2), 351-359.

- Kreissl, S., Bicker, G., 1989. Histochemistry of acetylcholinesterase and immunocytochemistry of an acetylcholine receptor-like antigen in the brain of the honeybee. *Journal of Comparative Neurology*, 286 (1), 71-84.
- Kreissl, S., Eichmüller, S., Bicker, G., Rapus, J., Eckert, M., 1994. Octopamine-like immunoreactivity in the brain and subesophageal ganglion of the honeybee. *Journal of Comparative Neurology*, 348(4), 583-595.
- Lindberg, C.M., Melathopoulos, A.P., Winston, M.L., 2000. Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite. *Journal of Economic Entomology*, 93, 189-198.
- Menzel, R., 2001. Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learning and Memory*, 8 (2), 53-62.
- Mercer, A.R., Mobbs, P.G., Davenport, A.P., Evans, P.D., 1983. Biogenic amines in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. *Cell and Tissue Research*, 234, 655-677.
- Marchetti, S., Barbattini, R., D'Agaru, M., 1984. Comparative effectiveness of treatments used to control *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 15 (4), 363-378.
- Meyer, E.P., Matute, C., Streit, P., Nässel, D.R., 1986. Insect optic lobe neurons identifiable with monoclonal antibodies to GABA. *Histochemistry*, 84, 207-216.
- Mobbs, P.G., 1982. The Brain of the Honeybee *Apis Mellifera*. I. The Connections and Spatial Organization of the Mushroom Bodies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 298 (1091), 309-354.
- Mobbs, P.G., 1985. Brain structure. In: Kerkut, G., Gilbert, L.I. (eds.): *Comprehensive insect physiology pharmacology and biochemistry*, 1st ed. Pergamon Press, Oxford, pp 299-370.
- Mondet, F., Goodwin, M., Mercer, A., 2011. Age-related changes in the behavioural response of honeybees to Apiguard®, a thymol-based treatment used to control the mite *Varroa destructor*. *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology*, 197, 1055-1062.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Schmuck, R., 2001. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Management Science*, 57, 577-586.
- OECD, Test No. 245: Honey Bee (*Apis Mellifera* L.), Chronic Oral Toxicity Test (10-Day Feeding). <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/test-no-245-honey-bee-apis-mellifera-l-chronic-oral-toxicity-test-10-day-feeding-9789264284081-en.htm> (dostop 23.11.2017)
- Oruc, H.H., Hranitz, J. M., Sorucu, A., Duell, M., Cakmak, I., Aydin, L., Orman, A., 2012. Determination of acute oral toxicity of flumethrin in honey bees. *Journal of Economic Entomology*, 105 (6), 1890-1894.
- Pettis, J.S., Collins, A., Wilbanks, R., 2004. Effects of coumaphos on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 35, 605-610.
- Rejski program za kranjsko čebelo (2011-2015), 2010. <http://www.czs.si/>.
- HMA, 2015. [http://www.hma.eu/uploads/media/Questionnaire\\_-\\_Bee\\_products\\_in\\_EU\\_EE\\_update\\_06.03.15.pdf](http://www.hma.eu/uploads/media/Questionnaire_-_Bee_products_in_EU_EE_update_06.03.15.pdf);
- Roma, G. C., Bueno, O. C., Camargo-Mathias, M. I., 2010. Morpho-physiological analysis of the insect fat body: a review. *Micron*, 41, 395-401.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B., 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, Suppl 1, S96-119.
- Rybak, J., Menzel, R., 1993. Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain: the neuronal connections of the alpha-lobe. *Journal of Comparative Neurology*, 334(3), 444-465.
- Rybak, J., Menzel, R., 1998. Integrative properties of the Pe1 neuron, a unique mushroom body output neuron. *Learning and Memory*, 5(1-2), 133-145.
- Sachse, S., Galizia, C.G., 2002. Role of inhibition for temporal and spatial odor representation in olfactory output neurons: a calcium imaging study. *Journal of Neurophysiology*, 87(2), 1106-1117.

- Sammataro, D., Finley, J., LeBlanc, B., Wardell, G., Ahumada-Segura, F., Carroll, M.J., 2009. Feeding essential oils and 2-heptanone in sugar syrup and liquid protein diets to honey bees (*Apis mellifera* L.) as potential *Varroa* mite (*Varroa destructor*) controls. *Journal of Apiculture Research*, 48, 256-262.
- Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., Desneux, N., 2016. Are bee diseases linked to pesticides? - A brief review. *Environmental International*, 89-90, 7-11.
- Schafer, S., Bicker, G., 1986. Distribution of GABA-like immunoreactivity in the brain and suboesophageal ganglion of the honeybee. *Journal of Comparative Neurology*, 246, 287-300.
- Schäfer, S., Bicker, G., 1986. Common projection areas of 5-HT- and GABA-like immunoreactive fibers in the visual system of the honeybee. *Brain Research*, 380(2), 368-370.
- Scheidler, A., Kaulen, P., Brüning, G., Erber J., 1990. Quantitative autoradiographic localization of [<sup>125</sup>I]alpha-bungarotoxin binding sites in the honeybee brain. *Brain Research*, 534 (1-2), 332-335.
- Schmehl, D.R., Teal, P.E., Frazier, J.L., Grozinger, C.M., 2014. Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 71, 177-190.
- Schneider, C., Bevk, D., Grünewald, B., Tautz, J., Fuchs, S., 2009. Radiofrequency identification. *Apidologie*, 40, 659-660.
- Schürmann, F.W., 1970. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. I. Synapses in the peduncle. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 103(3), 365-381.
- Schwaerzel, M., Monastirioti, M., Scholz, H., Friggi-Grelin, F., Birman, S., Heisenberg, M., 2003. Dopamine and octopaminergic differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*, 23, 10495-10502.
- Smoldis Skerl, M.I.S., Gregorc, A., 2010. Heat shock proteins and cell death in situ localisation in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. *Apidologie*, 41, 73-86.
- Thany, S.H., Tricoire-Leignel, H., Lapiéd, B., 2010. Identification of cholinergic synaptic transmission in the insect nervous system. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 683, 1-10.
- Van Buren, N.W.M., Mariën, A.G.H., Oudejans, R.C.H.M., Velthuis., H.H.W., 1992. Perizin, an acaricide to combat the mite *Varroa jacobsoni* its distribution in and influence on the honeybee *Apis mellifera*. *Physiological Entomology*, 17, 288-296.
- Vigan, M., 2010. Essential oils: renewal of interest and toxicity. *European Journal of Dermatology*, 20(6), 685-692.
- Villa, J.D., Bustamante, D.M., Dunkley, J.P., Escobar, L.A., 2008. Changes in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony swarming and survival pre- and postarrival of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Louisiana. *Annals of Entomological Society of America*, 101 (5), 867-871.
- Whittington, R., Winston, M.L., Melathopoulos, A.P., Higo, H.A., 2000. Evaluation of the botanical oils neem, thymol, and canola sprayed to control *Varroa jacobsoni* Oud. (Acari: Varroidae) and *Acarapsis woodi* (Acari: Tarsonemidae) in colonies of honey bees (*Apis mellifera* L., Hymenoptera: Apidae). *American Bee Journal*, 140 (7), 565-572.
- Wustenberg, D.G., Grunewald, B., 2004. Pharmacology of the neuronal nicotinic receptor of cultured Kenyon cells of the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural and Behavioral Physiology*, 190, 807-821.