نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۳۸، بهـار ۱۴۰۲
ص‌ص: ۱۱۳~۱۳۰

اثر تیمول، ترانس آنتول و دی آلیل دی سولفاید بر بقا و سیستم آنتی اکسیدانی زنبور عسل

ملیحه حدادی[۱]، نجمه صاحب‌زاده*[۲]، عباس خانی[۳]
۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی پیشین کارشناسی ارشد، دانشیار، دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

تاریخ دریافت : خرداد ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش : مرداد ۱۴۰۱
شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۱۴۲۴۴۰۷
Email: najmeh.sahebzadeh@gmail.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ ASJ.2022.359042.2233

چکیده

زنبورعسل نقش کلیدی در امنیت‌غذایی داشته اما سلامت کندوهای آن با آفات مختلف مانند واروآ تهدید شده، بنابراین استفاده از کنه‌کش‌های شیمیایی اجتناب‌ناپذیر بوده اما کاربرد مکرر آن‌ها باعث مقاومت واروآ شده، بنابراین توجه محققین به سموم با منشا گیاهی جلب شده‌است. علی‌رغم کارایی سموم‌گیاهی در مبارزه با واروآ، اثرات جانبی آن‌ها بر سلامت کندو نکته کلیدی است. با این هدف، در پژوهش حاضر اثرات زیستی تیمول، ترانس‌آنتول و دی‌آلیل‌دی‌سولفاید که به‌عنوان کنه‌کش‌های مناسب معرفی شده‌اند، روی زنبورهای عسل بررسی شد. نتایج نشان داد که غلظت ایجادکننده کشندگی ۵۰ درصد زنبورها با تیمول، ترانس‌آنتول و دی‌آلیل‌دی‌سولفاید به‌ترتیب معادل ۱۶/۴۶، ۵۵/۲۲ و ۳۷/۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود. اثرات غلظت‌های کشندگی LC_{15}، LC_{30} و LC_{50} از این ترکیبات بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی زنبورعسل (کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز وگلوتاتیون اس-ترانسفراز) و میزان پراکسیداسیون لیپیدی، نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم‌ها در تیمارهای تیمول و ترانس‌آنتول، افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد داشته، در حالی‌که در تیمارهای دی‌آلیل‌دی‌سولفاید، میزان فعالیت این آنزیم‌ها کاهش یافت. همچنین نتایج نشان داد که میزان مالون‌دی‌آلدهید در همه تیمارها کاهش معنی‌دار داشت. مطالعه میزان بقا نشان داد که در هر سه غلظت تیمول، ترانس آنتول و دی‌آلیل‌دی‌سولفاید به ترتیب در چهار، شش و سه روز پس از تیمار، تلفات ۱۰۰ درصدی زنبورهای عسل مشاهده شد. نتایج نشان داد که غلظت‌هایی زیرکشندگی ترکیبات مورد مطالعه، قادر به القای استرس‌اکسیداتیو بوده که می‌تواند بقای زنبورعسل را تحت تاثیر قراردهد. لذا توصیه می‌شود که استفاده از این ترکیبات برای مبارزه با واروآ در زنبورستان با احتیاط صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی: بقا، پراکسیداسیون لیپیدی، تنش اکسیداتیو، سموم گیاهی، مرگ و میر.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 138 pp: 113-130

Effect of Thymol, Trans-anethole and Diallyl disulfide on the survival and antioxidant system of honey bee

By: Malihe Haddadi[1], Najmeh Sahebzadeh[2]*, Abbas Khani[2]
[1, 2 1] MSc graduated, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Zabol, Zabol. [2], Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.
* Corresponding author: E-mail address: n.sahebzadeh@uoz.ac.ir

Received: June 2022 **Accepted: August 2022**

Honeybees play a key role in food safety, but various pests such as *Varroa* have been threatened the health of colonies. To control this mite, the application of pesticides is inevitable, but the consequence of pesticide usages is associated with increased incidences of *Varroa* resistance. Hence, the researchers point out the botanicals. Despite the effectiveness of botanicals in combating *Varroa*, their side effects on colony health are key topics. In the present study, the biological effects of thymol, trans-anethole, and diallyl disulfide were investigated on honeybees. The results showed that the lethal concentrations of 50% of thymol, trans-anethole, and diallyl disulfide were 16.46, 55.22, and 37.30 mg ml^{-1}, respectively. The effects of LC_{15}, LC_{30}, and LC_{50} of these compounds on the activities of honeybee antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase, and glutathione S-transferase) and the lipid peroxidation showed that the activities of these enzymes in thymol, and trans-anethole treatments significantly increased compared to the control, while in diallyl disulfide treatment, the activity of these enzymes decreased. The results also showed that the amount of malondialdehyde was significantly reduced in all treatments. Survival study showed that all concentrations of thymol, trans-anethole, and diallyl disulfide caused 100% mortalities of the honeybee at four, six, and three days post-treatment, respectively. The results showed that the lethal concentrations of thymol, trans-anethole, and diallyl disulfide could induce oxidative stress and influence the survival of

Key words: Survival, Oxidative stress, lipid peroxidation, botanicals, mortality.

مقدمه

گونه زنبور عسل اروپایی *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) به‌دلیل داشتن زندگی اجتماعی، تولید عسل فراوان، گرده افشانی و پرورش راحت آن، امروزه در اکثر نقاط دنیا و همچنین ایران، گونه غالب زنبورهای عسل بوده و مورد توجه گسترده زنبورداران است. زنبورعسل در مناطق مختلف جهان با آفات و بیماری‌های مختلفی مواجه است. از جمله مهمترین آفات می‌توان به کنه واروآ و بیدموم خوار اشاره کرد که هر ساله با نابودی تعداد زیادی از کندوهای زنبورعسل خسارات جبران ناپذیری را به صنعت زنبورداری وارد می‌کند (Eliash and Mikheyev, 2020). زنبورداران به منظور مبارزه با آفات فعال در کندوهای زنبورعسل، مقادیر بالایی از انواع آفت‌کش‌های شیمیایی و فرمولاسیون‌های تجاری بر پایه سموم و یا ترکیبات شیمیایی مختلف را مصرف می‌کنند (Johnson و همکاران، ۲۰۱۳). متأسفانه این آفت‌کش‌ها و داروها علاوه بر داشتن عوارض جانبی روی زنبورعسل، باعث گذاشتن باقیمانده در عسل، موم و سایر فرآورده‌های زنبورعسل شده و هزینه سنگینی را نیز به زنبورداران تحمیل می‌کنند (Alkassab و همکاران، ۲۰۲۰؛ Xiao و همکاران، ۲۰۲۲).

با توجه به ضرورت حفاظت زنبورعسل در برابر آفت‌کش‌ها و کاهش اثرات سوء موادشیمیایی مورد استفاده در مدیریت

زنبورستان‌ها، کاربرد روش‌های کنترل غیرشیمیایی و یا استفاده از ترکیبات کم‌خطرتر مانند سموم گیاهی مورد مطالعه محققین قرار گرفته‌است. اسانس‌های گیاهی و متابولیت‌های ثانویه آن‌ها به‌عنوان جایگزینی مناسب برای کنترل بیدموم خوار و کنه واروآ معرفی گردیده‌اند. این ترکیبات به‌دلیل داشتن بوی تند و سمیت کم برای پستانداران و عدم تأثیر سوء بر محیط زیست از جمله ترکیبات مفید برای کنترل حشرات آفت نیز محسوب می‌شوند (Isman, 2020). از متابولیت‌های ثانویه گیاهی که در مدیریت آفات کاربرد دارند می‌توان به تیمول (مونوترپن فرّار بدست آمده از گیاهان خانواده نعنائیان) اشاره کرد که فرمولاسیون‌های مختلف آن در کنترل واروآ استفاده می‌شود (Aboushaara و همکاران، ۲۰۱۷؛ Colin و همکاران، ۲۰۲۰، ۲۰۱۹؛ Glavan و همکاران، ۲۰۲۰؛ Sabahi و همکاران، ۲۰۲۰). سمیت حاد تیمول برای رشد لارو زنبورعسل خطری ندارد اما سمیت مزمن آن، بقای لارو زنبورعسل را به‌طور قابل توجهی کاهش داده در حالی‌که روی اندازه بدن لارو تاثیری نداشته است (Charpentier و همکاران، ۲۰۱۴). علاوه بر تیمول، متابولیت‌های ثانویه گیاه سیر نیز به‌عنوان جایگزین مناسب آفت‌کش‌های شیمیایی در مدیریت آفات کشاورزی استفاده شده‌است. اجزای اصلی سیر عبارتند از ترکیبات ارگانوسولفور (متیل‌آلیل‌دی‌سولفاید، دی‌آلیل‌دی‌سولفاید و دی-آلیل‌تری‌سولفاید) که سمیت بالایی در برابر آفت مختلف نشان داده‌اند (Yang و همکاران، ۲۰۱۲). علاوه بر اثر حشره‌کشی عصاره سیر، مطالعات مختلف به اثرات آن روی زنبورهای‌عسل پرداخته است. بعنوان مثال مشخص شده که عصاره سیر روی زنبورهای کارگر بالغ و لاروهای آن‌ها باعث ایجاد مسمومیت می-شود (Xavier و همکاران، ۲۰۱۵). یکی دیگر از متابولیت‌های ثانویه گیاهی که در کنترل آفات کشاورزی کاربرد دارد، ترانس-آنتول بوده که با درصد بالایی (۷۸/۲۵٪) در گیاهان مختلف خانواده چتریان یافت می‌شود (Stefanini و همکاران، ۲۰۰۶). میزان تلفات کنه واروآ با مونوترپنوئیدهایی شامل: تیمول، اکالیپتول، آلفا-پینن، دی‌آلیل‌دی‌سولفاید و ترانس-آنتول بین ۹۹-۸۰٪ گزارش شده‌است (Sahebzadeh and Lau, 2017).

به‌طورکلی، آفت‌کش‌ها و مواد شیمیایی استفاده شده در مدیریت آفات مختلف، باعث افزایش تعداد گونه‌های اکسیژن فعال گردیده که می‌توانند اثرات سوء روی متابولیسم سلولی و فعالیت-های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی موجودات زنده مانند حشرات ایجاد نمایند. گونه‌های اکسیژن فعال می‌توانند باعث اکسیده شدن پروتئین‌ها، DNA، RNA و پراکسیداسیون غشاهای سلولی شوند (Slowinska و همکاران، ۲۰۱۶). به منظور محافظت سلول‌ها در برابر تنش اکسیداتیو، موجودات زنده دارای طیف متنوعی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بوده که قادر به خنثی کردن گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشند (Felton and Summers, 1995). سامانه دفاعی آنتی اکسیدان حشرات شامل چندین آنزیم آنتی اکسیدان مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون اس-ترانسفراز، پراکسیداز و غیره می‌باشد. از آن‌جایی که آنزیم گلوتاتیون اس-ترانسفراز، فرآورده‌های پراکسیداسیون یا هیدروپراکسیدها را از سلول حذف می‌کند، می‌توان به این آنزیم نیز به‌عنوان یک آنتی اکسیدان اشاره کرد (Zhang و همکاران، ۲۰۱۳). با توجه به کارایی متابولیتهای ثانویه در کنترل واروآ، در مطالعه حاضر اثرات کشندگی و میزان تغییرات آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در زنبورهای عسل تیمار شده با دی‌آلیل دی سولفاید، تیمول و ترانس آنتول روی زنبور عسل مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین بقای زنبورهای عسل پس از تیمار نیز ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری زنبورعسل و نگهداری در شرایط آزمایشگاهی

شان‌های حاوی شفیره‌های زنبورهای کارگر از کندوهای متعلق به گونه *Apis mellifera* در منطقه سیستان (شهرستان‌های بنجار، زهک و هامون) انتخاب و به ژرمیناتور با دمای ۵±۳۵ درجه سلسیوس، تاریکی مطلق و رطوبت ۵±۴۰ درصد منتقل شدند. گروههای ۱۰۰ تایی از زنبورهای جوان تازه خارج شده (همسن ۱ تا ۳ روزه) از سلول‌های نوزادی واقع در ایزولاتور با استفاده از آسپیراتور برقی به داخل قفس‌های پلی‌کربنات، به ابعاد

۱۱/۵×۱۰×۱۴ سانتی‌متر مکعب منتقل گردید (Köhler و همکاران، ۲۰۱۳). زنبورهای متولد شده به مدت دو روز با شربت ۵۰ درصد تغذیه شدند تا مرحله تیمار آن‌ها با غلظت‌های اولیه سه ترکیب دی‌آلیل دی سولفاید، تیمول و ترانس آنتول به‌طور جداگانه انجام شود (Porrini و همکاران، ۲۰۱۷).

تهیه تیمول، ترانس آنتول و دی‌آلیل‌دی‌سولفاید

ترکیبات تجاری تیمول ۹۹ درصد، ترانس آنتول ۹۸ درصد و دی-آلیل‌دی‌سولفاید ۹۹ درصد از شرکت سیگما (اسپانیا) تهیه گردید. از اتانول ۷۵ درصد (مرک آلمان) به‌عنوان حلال برای ساختن غلظت‌های مورد نظر در آزمایشات مراحل بعدی استفاده شد.

آزمایشات زیست سنجی

غلظت‌های نهایی ترکیبات بر اساس آزمایشات مقدماتی با محدوده غلظتی ۱ تا ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای تیمول، ۲۰ تا ۱۰۰ میلی-گرم بر میلی‌لیتر برای ترانس آنتول و ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی-لیتر برای دی‌آلیل‌دی‌سولفاید انتخاب شدند. پس از مشخص شدن غلظت‌هایی با کشندگی ۲۰ تا ۸۰ درصد، غلظت‌های حدواسط بر اساس فاصله لگاریتمی تعیین شدند. در مرحله بعد، غلظت‌های نهایی ۵، ۱۵، ۲۰، ۲۸، ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای تیمول، غلظت‌های نهایی ۴۰، ۴۷/۵۰، ۵۶/۵۰، ۶۷/۲۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای ترانس آنتول و غلظت‌های نهایی ۲۸/۴۰، ۳۶/۷۰، ۵۳/۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای دی‌آلیل‌دی‌سولفاید به-صورت تدخینی روی زنبورهای همسن (۱ تا ۳ روزه) تیمار شدند. هر یک از تیمارها با ۱۰ تکرار (هر تکرار حاوی ۱۰۰ زنبورعسل) انجام شد. ۶ تا ۲۴ ساعت پس از تیمار، تعداد تلفات ثبت و با نرم-افزار SPSS نسخه ی ۲۱، میزان غلظت‌های ایجاد کننده کشندگی ۱۵، ۳۰، ۵۰ درصد (به ترتیب LC_{15}، LC_{30} و LC_{50}) هر کدام از ترکیبات تعیین شد. تیمارهای شاهد منفی و مثبت به ترتیب شامل آب مقطر و اتانول ۷۵ درصد بودند که مشابه آزمایشات اصلی انجام شدند.

آزمایشات بقای زنبورهای کارگر بالغ جوان

سنجش اثرات سمیت حاد تیمول، دی‌آلیل‌دی‌سولفاید و ترانس آنتول روی زنبورهای عسل همسن، با ۴ تیمار شامل غلظت‌های ایجاد کننده کشندگی ۱۵، ۳۰، ۵۰ درصد (به ترتیب LC_{15}، LC_{30} و LC_{50}) و شاهد انجام شد. بدلیل اینکه هیچ تلفاتی در دو شاهد مثبت و منفی مشاهده نشد و اتانول ۷۵ درصد نیز بعنوان حلال در تیمارها وجود داشت، لذا تیمار شاهد در بقیه آزمایشات فقط شامل اتانول ۷۵ درصد بود. هر تکرار شامل یک ظرف پلاستیکی با قطر ۹ سانتی متر و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر بود که در داخل آن ۱۰۰ عدد زنبورکارگر همسن قرار داشت. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هرکدام از تیمارها به‌طور جداگانه، روی پنبه ای به وزن ۰/۲ گرم ریخته شد و از قسمت بالایی ظرف آویزان گردید. در مرحله بعد، یک لیوان پلاستیکی (۱/۵×۱ سانتی‌متر) در داخل هر ظرف قرار داده شد که حاوی غذا (۷۰٪ آب و ۳۰٪درصد شکر) بود. مرگ و میر، از طریق تحریک کردن زنبورها با قلم‌موی ظریف ثبت شدند (Mengoni Goñalons and Farina, 2015). تعداد زنبورهای زنده و مرده بطور روزانه ثبت و جهت جلوگیری از آلودگی، زنبورهای مرده روزانه از ظرف خارج و ثبت تلفات تا مرگ تمام افراد هر تیمار ادامه یافت. ظرف غذا روزانه با ظرف حاوی غذای تازه، جایگزین می شد.

آزمایشات بیوشیمیایی

عصاره آنزیمی از کل بدن زنبورهای عسل زنده مانده در تیمارها و شاهد طبق روشهای Fujiyuki و همکاران (۲۰۰۹) و Chakrabarti و همکاران، (۲۰۱۵) و با اندکی تغییرات استخراج شد. ابتدا زنبورهای زنده مانده بطور کاملاً تصادفی از تیمارهای با غلظت‌های کشندگی ۱۵، ۳۰ و ۵۰ درصد (LC_{15}، LC_{30} و LC_{50}) تیمول، ترانس‌آنتول و دی‌آلیل‌دی‌سولفاید انتخاب و برای بی حس شدن به یخچال منتقل شدند. سپس سر و قفس سینه زنبورها جدا و با همزن شیشه‌ای، همگن شده و در فسفات بافر قرار داده و سانتریفیوژ (اپندورف R۵۸۱۰؛ g۴۰۰؛ ۵ دقیقه) شد. پس از افزودن ترایتون-ایکس، سانتریفیوژ (g۱۶۱۰۰؛ ۴ درجه سلسیوس؛ ۲۰ دقیقه) انجام شد و ماده رونشین در مراحل بعدی سنجش آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش میزان پروتئین به روش برادفورد (Bradford, 1976) در سه تکرار انجام شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر و

با میکروپلیت‌ریدر (BioTeK ELX800 (Winooski, USA) خوانده و غلظت پروتئینی بر اساس مقایسه با منحنی استاندارد، محاسبه شد.

سنجش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز (SOD) پس از افزودن محلول ۰/۲ میلی‌مولار پیروگالول به عصاره آنزیمی زنبورهای هرتیمار و مقایسه با سوپراکسیددیسموتاز استاندارد (سیگما) و خوانش در ۴۲۰ نانومتر هر یک دقیقه یک‌بار و به مدت ۶ دقیقه انجام شد (Chakrabarti و همکاران، ۲۰۱۵). فعالیت کاتالاز (CAT) به صورت $mol\ min^{-1}\ mg^{-1}$ از طریق کاهش جذب نوری ۳۰ میلی مولار H_2O_2 افزوده شده به محلول بافر فسفات (۷۰ میلی مولار، pH=۷) و نمونه آنزیمی در ۲۴۰ نانومتر بررسی شد (Aebi, 1984). سنجش فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز (GST) به روش Oppenoorth و همکاران (1979) با سوبسترای کلرودی‌نیتروبنزن انجام شد. مقدار ۴۰ میکرولیتر فسفات بافر (۲۰ میلی‌مولار) و ۲۰ میکرولیتر گلوتاتیون احیاشده با ۱۰ میکرولیتر سوبسترای با هم مخلوط و سپس ۵ میکرولیتر نمونه آنزیمی به آن‌ها اضافه و پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، جذب نوری در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانده شد.

میزان مالون‌دی‌آلدهید (MDA) با روش Slater (1984) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل یک میلی‌لیتر عصاره آنزیمی و یک میلی‌لیتر محلول اسید تیوباربیتوریک بود. مخلوط حاصل در حمام آب گرم (۹۹ درجه سلسیوس) به مدت یک ساعت قرار گرفت و پس از آن بلافاصله به مدت ۱۵دقیقه در حمام یخ قرار داده شد. سپس سانتریفیوژ (۱۰؛۱۰۰۰۰g دقیقه) و جذب نوری در طول موج ۵۴۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

آنالیز داده‌ها

برای بدست آوردن غلظت‌های کشندگی و زیرکشندگی (LC_{15}، LC_{30} و LC_{50}) و برای آنالیز داده‌های بیوشیمیایی از نرم افزار SPSS نسخه‌ی ۲۱ و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی با احتمال ۵ درصد استفاده شد. همچنین رسم نمودارها با نرم‌افزار سیگما پلات نسخه ۱۲/۳ انجام ستفاده شد.

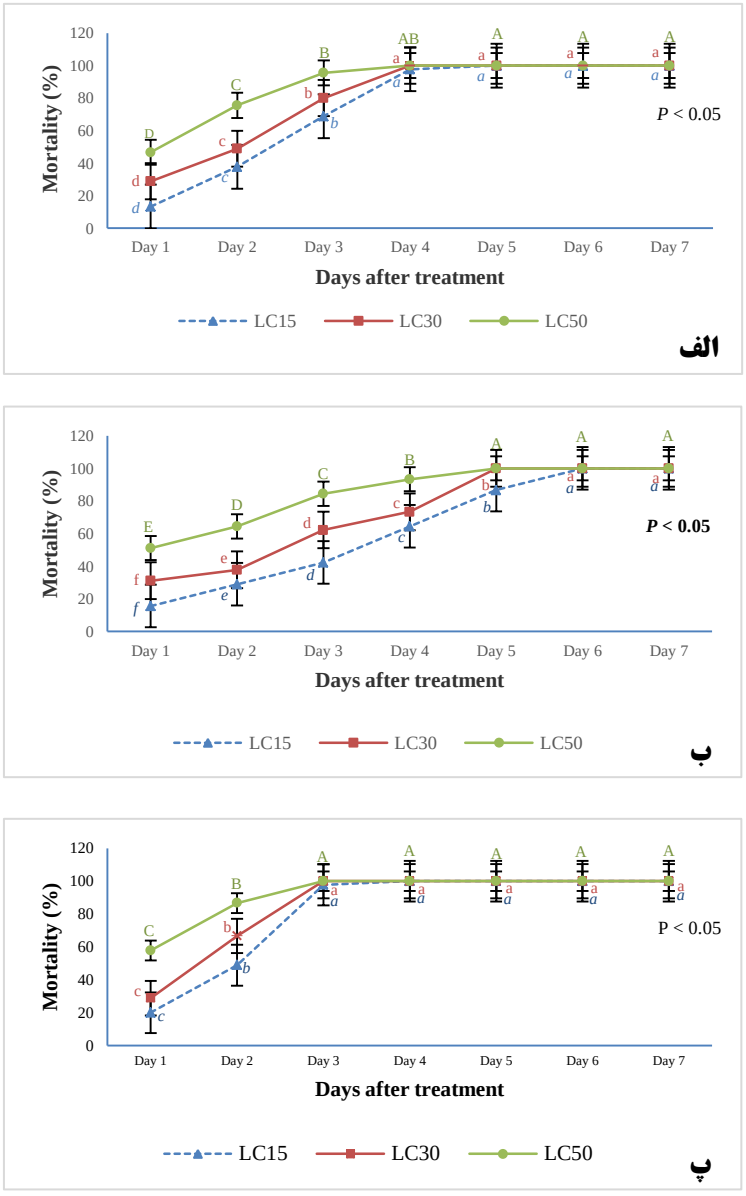
نتایج

در این پژوهش میزان سمیت تنفسی ترکیبات تیمول، ترانس‌آنتول و دی‌آلیل‌دی‌سولفاید روی زنبورهای عسل محاسبه شد که مقادیر LC_{15}، LC_{30} و LC_{50} به ترتیب برای ترانس آنتول برابر $mg\ mL^{-1}$ ۳۷/۷، ۴۵/۵ و ۵۵/۲، برای دی‌آلیل‌دی‌سولفاید برابر $mg\ mL^{-1}$ ۲۴/۰، ۲۹/۸۰ و ۳۷/۳۰ و برای تیمول برابر $mg\ mL^{-1}$ ۳/۸۷، ۸/۱۱، ۱۶/۴۶ تعیین گردیدند. نتایج نشان داد که تیمول با LC_{50} برابر ۱۶/۴۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین سمیت تنفسی و پس از آن دی‌آلیل‌دی‌سولفاید با LC_{50} برابر ۳۷/۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نسبت به ترانس آنتول سمیت تنفسی بیشتری را روی زنبور عسل داشت (جدول ۱). در این پژوهش مشاهده شد که با افزایش غلظت ترکیبات مورد استفاده میزان کشندگی افزایش می‌یابد که این مورد اثر سمیت ترکیبات را روی زنبورعسل تایید می‌کند.

جدول ۱. غلظتهای کشندگی متابولیتهای ثانویه روی زنبورهای عسل

متابولیتهای ثانویه گیاهی	غلظت های کشندگی ($mg\ mL^{-1}$)				Slope ± Standard Error	χ^2(df)	Sig.
	LC_{15} (حد بالا- حد پایین)	LC_{30} (حد بالا- حد پایین)	LC_{50} (حد بالا- حد پایین)	LC_{90} (حد بالا- حد پایین)			
تیمول	۳/۸۷ (۰/۴۷-۷/۳۶)	۸/۱۱ (۲/۴۴-۱۲/۶۱)	۱۶/۴۶ (۹/۷۲-۲۵/۳۰)	۱۰۳/۰۵ (۵۱/۱۸-۱۰۵۳/۹۳)	۲/۷۵۸ ± ۰/۷۹۵	۰/۰۶۰(۳)	۰/۹۹۶
دی آلیل دی سولفاید	۲۴/۰۵ (۱۳/۲۱-۲۹/۹۵)	۲۹/۸۷ (۲۰/۰۷-۳۵/۱۵)	۳۷/۳۰ (۲۹/۹۶-۴۲/۵۶)	۶۴/۱۵ (۵۳/۷۴-۱۰۰/۹۳)	۵/۴۴۲ ± ۱/۳۹۰	۰/۰۴۳(۳)	۰/۵۸۱
ترانس آنتول	۳۷/۷۴ (۲۵/۰۵-۴۰/۸۷)	۴۵/۵۵ (۳۵/۴۳-۵۱/۳۸)	۵۵/۲۲ (۴۸/۲۹-۵۹/۲۰)	۸۸/۴۱ (۷۴/۰۸-۱۴۰/۵۷)	۶/۲۷۰ ± ۱/۵۶۵	۰/۱۷۶(۳)	۰/۹۸۱

در پژوهش حاضر نتایج میزان بقای زنبورهای عسل کارگر تحت تاثیر غلظت‌های کشندگی ۱۵، ۳۰ و ۵۰ درصد از تیمول، ترانس-آنتول و دی‌آلیل‌دی‌سولفاید، نشان داد که تیمول در هر سه غلظت اشاره شده، ۴ روز پس از تیمار باعث ۱۰۰ درصد مرگ‌ومیر زنبورهای عسل شد (شکل۱، الف)، در حالی‌که ترانس آنتول در غلظت LC_{15} پس از ۶ روز و در غلظت‌های LC_{30} و LC_{50}، ۵ روز پس از تیمار باعث ۱۰۰ درصد مرگ‌ومیر زنبورهای عسل گردید (شکل ۱، ب). هم‌چنین نتایج در مورد دی‌آلیل‌دی‌سولفاید نشان داد که ترکیب موردنظر در هر سه غلظت، ۳ روز پس از تیمار باعث ۱۰۰ درصد مرگ‌ومیر زنبورهای عسل گردید (شکل۱، پ).



شکل ۱. تغییرات میزان بقای زنبورهای عسل پس از تیمار با تیمول (الف)، ترانس آنتول (ب) و دی‌آلیل‌دی‌سولفاید (پ).

حروف مختلف تفاوت‌های آماری را نشان می‌دهند (Tukey test, $P \leq 0.05$).

در پژوهش انجام شده تیمول و ترانس‌آنتول در غلظت‌های LC_{15} ، LC_{30} و LC_{50}، باعث افزایش میزان فعالیت سوپراکسیددیسموتاز در مقایسه با شاهد (سطح معنی‌داری ۵ درصد) شدند. به‌طوری‌که در غلظت LC_{50} هر دو ترکیب تیمول و ترانس‌آنتول، در مقایسه با شاهد، حداکثر میزان فعالیت این آنزیم مشاهده شد (جدول ۲).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که دی‌آلیل‌دی‌سولفاید در هر سه غلظت ($LC_{(15,\ 30,\ 50)}$) باعث کاهش میزان فعالیت سوپراکسیددیسموتاز شد، به‌طوری‌که در غلظت LC_{50} در مقایسه با شاهد میزان فعالیت سوپراکسیددیسموتاز کاهش معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد (جدول ۲). میزان کاهش فعالیت این آنزیم رابطه مستقیمی با افزایش غلظت متابولیت ثانویه مورد مطالعه داشت.

جدول ۲. میزان فعالیت آنزیمهای سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون اس-ترانسفراز (GST) در زنبورهای عسل پس از تیمار با متابولیتهای ثانویه

فعالیت آنزیمی	تیمارها	غلظت های کشندگی ($mg\ mL^{-1}$)			شاهد	*P* value
		LC_{50}	LC_{30}	LC_{15}		
سوپراکسید دیسموتاز	تیمول	۲۸/۴۷۰±۱/۹۷^{A}	۱۷/۵۹۰±۰/۸۸^{B}	۸/۰۰۰±۰/۸۲^{C}	۳/۰۵۰±۰/۹۴^{D}	$P<0.05$
(U/mg protein)	ترانس آنتول	۳۲/۸۵۰±۱/۲۳^{A}	۲۰/۰۲۰±۰/۹۹^{B}	۱۶/۵۰۰±۰/۸۴^{B}	۱/۸۳۰±۰/۷۰^{C}	$P<0.05$
	دی آلیل دی سولفاید	۱۰/۸۴۰±۰/۴۶^{D}	۱۹/۶۹۰±۱/۴۷^{C}	۲۸/۰۰۰±۰/۶۶^{B}	۳۴/۹۷۰±۰/۹۹^{A}	$P<0.05$
کاتالاز	تیمول	۰/۱۰۴±۰/۰۰۳^{A}	۰/۰۸۹±۰/۰۰۱^{B}	۰/۰۶۰±۰/۰۰۴^{B}	۰/۰۴۵±۰/۰۰۱^{C}	$P<0.05$
(nmol/min/ml)	ترانس آنتول	۰/۱۵۱±۰/۰۰۲^{A}	۰/۰۶۳±۰/۰۱۲^{B}	۰/۰۳۳±۰/۰۰۲^{C}	۰/۰۲۵±۰/۰۰۲^{C}	$P<0.05$
	دی آلیل دی سولفاید	۰/۰۹۸±۰/۰۰۳^{D}	۰/۱۴۷±۰/۰۰۱^{C}	۰/۱۷۷±۰/۰۰۳^{B}	۰/۲۰۵±۰/۰۰۲^{A}	$P<0.05$
گلوتاتیون اس ترنسفراز	تیمول	۰/۱۶۸±۰/۰۳۷^{C}	۰/۴۹۰±۰/۲۷۳^{A}	۰/۳۳۴±۰/۱۴^{B}	۰/۴۵۰±۰/۰۲^{A}	$P<0.05$
(nmol/min/ml)	ترانس آنتول	۱/۶۹۲±۰/۰۶۰^{A}	۱/۶۳۰±۰/۰۵۰^{A}	۱/۲۶۲±۰/۰۲۰^{A}	۰/۹۰۴±۰/۰۹۰^{B}	$P<0.05$
	دی آلیل دی سولفاید	۰/۹۵۹±۰/۱۲۲^{B}	۱/۱۳۳±۰/۱۴۷^{A}	۱/۱۳۳±۰/۲۱^{A}	۱/۱۳۳±۰/۱۲^{A}	$P<0.05$

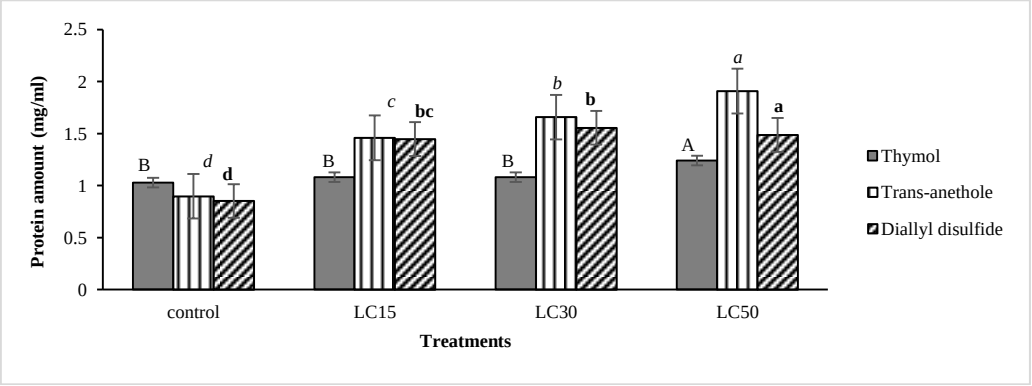
حروف مختلف در هر ردیف، تفاوت‌های آماری بین غلظتهای مختلف یک تیمار را نشان می‌دهند (Tukey test, $P\leq0.05$).

نتایج نشان داد که تیمول و ترانس‌آنتول در غلظت‌های LC_{15}، LC_{30}و LC_{50}، باعث افزایش معنی دار میزان فعالیت کاتالاز در سطح ۵ درصد شدند (جدول ۲). علیرغم این نتایج، مشخص شد که دی‌آلیل دی‌سولفاید در هر سه غلظت مطالعه شده ($LC_{(15,\ 30,\ 50)}$) باعث کاهش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم کاتالاز گردید، به‌طوری‌که در غلظت LC_{50} در مقایسه با شاهد، بیشترین میزان کاهش معنی‌دار فعالیت کاتالاز در سطح ۵ درصد مشاهده شد (جدول ۲).

نتایج سنجش فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز در زنبورهای تیمارشده باغلظت‌های LC_{15}، LC_{30} و LC_{50} تیمول و ترانس-آنتول در مقایسه با شاهد، افزایش معنی داری در سطح ۵ درصد نشان داد. علاوه بر موارد بالا، نتایج نشان داد که دی‌آلیل‌دی-سولفاید در غلظت‌های LC_{15} و LC_{30}، در مقایسه با شاهد، تغییر معنی‌داری در میزان فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز ایجاد نکرده است، اما در غلظت LC_{50} این متابولیت ثانویه توانسته است باعث کاهش معنی‌دار فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز در زنبورهای عسل گردد (جدول ۲).

نتایج پژوهش حاضر بیان می‌کند که مقدار پروتئین در زنبورهای

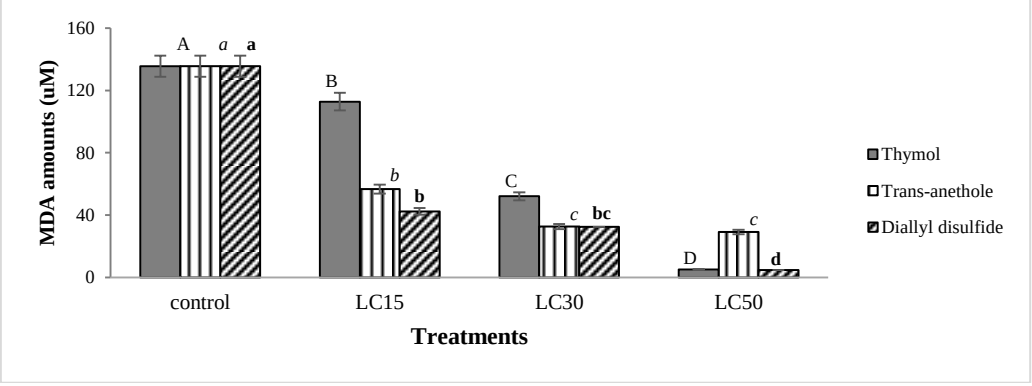
عسل تیمار شده با تیمول، ترانس‌آنتول و دی‌آلیل‌دی‌سولفاید در مقایسه با شاهد در هر سه غلظت ($LC_{(15,30,50)}$) افزایش معنی-داری در سطح احتمال ۵ درصد نشان داده است (شکل ۲).



شکل ۲. مقدار پروتئین در زنبورهای عسل پس از تیمار با متابولیتهای ثانویه.

حروف مختلف تفاوت‌های آماری بین تیمارها را نشان می‌دهند (Tukey test, $p \leq 0.05$).

در این پژوهش نشان داده شد که ترانس‌آنتول، تیمول و دی‌آلیل‌دی‌سولفاید در غلظت‌های کشندگی LC_{15}، LC_{30} و LC_{50}، در مقایسه با شاهد باعث کاهش معنی‌دار (سطح احتمال ۵ درصد) میزان فعالیت مالون‌دی‌آلدهید شدند. بیشترین میزان کاهش مقدار مالون‌دی‌آلدهید در تیمارهای تیمول و دی‌آلیل‌دی‌سولفاید (در غلظت LC_{50}) مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳. مقدار مالون‌دی‌آلدهید در زنبورهای عسل پس از تیمار با متابولیتهای ثانویه.

حروف مختلف تفاوت‌های آماری را نشان می‌دهند (Tukey test, $p \leq 0.05$).

بحث

دلیل اصلی برای مطالعه اثرات جانبی تیمول، ترانس آنتول و دی-آلیل‌دی‌سولفاید روی زنبورهای عسل این بود که اثرات آنها در مطالعات سایر محققین علیه کنه واروآ و در مواردی سایر آفات مخرب کندوهای زنبورعسل به اثبات رسیده است (Colin و همکاران، ۲۰۱۹؛ Sabahi و همکاران، ۲۰۱۸، ۲۰۲۰؛ Peng و همکاران، ۲۰۱۵؛ Klouceka و همکاران، ۲۰۱۲) اما مطالعه جامعی در مورد تاثیر آنها روی زنبورهای عسل انجام نشده بود. علاوه بر این، مشخص شده که تیمول به عنوان آگونیست گیرنده گابا در مغز حشرات عمل می‌کند (Price and Lummis, 2014) و می‌تواند تاثیر مستقیم روی یادگیری زنبورهای عسل داشته باشد (Colin و همکاران، ۲۰۲۰) و باعث بهبودبخشی پردازش حس بویایی زنبورهای عسل در هنگام مواجه با بوهای مختلف گردد (Bonnafe و همکاران، ۲۰۱۵). تیمول به دلیل مشاهده اثرات کنه‌کشی بالا که به خوبی توسط زنبورهای عسل

قابل تحمل است، بیشترین اسانس گیاهی مورد استفاده در زنبورداری است. نتایج مطالعه Colin و همکاران (۲۰۲۰)، بیان می‌کند که استفاده از تیمول و ایمیداکلوپراید، هیچکدام به تنهایی اثر کنه‌کشی نشان ندادند، اما وقتی زنبورها در معرض هر دو آفت-کش تیمول و ایمیداکلوپراید قرار گرفتند، عملکرد یادگیری بصری را کاهش دادند. همچنین مطالعه Charpentier و همکاران (۲۰۱۴) نشان می‌دهد که تیمول بطور معنی داری باعث کاهش بقا و وزن لاروهای زنبورهای عسل گردیده است. همچنین Colin و همکاران (۲۰۱۹)، نشان دادند که تیمول می-تواند باعث افزایش رفتارهای بهداشتی زنبورعسل در هنگام مواجهه با کنه واروآ گردد. مطالعه دیگری نشان داد که تیمول حتی در صورت کاربرد بصورت فرمولاسیونهای پودری و ژله ای باعث ایجاد ۱۴ درصد مرگ و میر روزانه در زنبورهای عسل گردید (Tananaki و همکاران، ۲۰۱۴) و هم‌چنین باعث از بین رفتن نوزادان زنده که در کنار ظروف تیمول بودند، گردید (Floris و همکاران، ۲۰۰۴). طبق تحقیقات Shoukry و همکاران (۲۰۱۳)، مشخص شد که تیمول بر زنده مانی زنبورهای نر تاثیر منفی دارد. همچنین در بررسی Mondet و همکاران (۲۰۱۱)، مشخص شد که زنبورهای مسن‌تر (دوهفته‌ای) بیشتر از زنبورهای یکروزه در هنگام تیمار با تیمول، رفتار اجتناب از خود نشان میدهند. هم‌چنین مطالعه Bonnafe و همکاران (۲۰۱۵)، بیان کرد که قرار گرفتن در معرض تیمول، ممکن است قابلیت‌های جستجو را در زنبورهای جستجوگر تغییر دهد. علاوه براین، در زنبورهایی که تحت تاثیر فرمولاسیونهای حاوی تیمول قرار گرفتند نیز اختلالات متابولیکی و ژنی قابل توجهی ایجاد شد (Bonnafe و همکاران، ۲۰۱۵).

تاکنون در مطالعه متمرکزی به اثرات آلفاپینن و دی‌آلیل‌دی-سولفاید روی زنبورهای عسل پرداخته نشده است اما در مطالعاتی اثرات سایر متابولیتهای ثانویه در زنبورستانها بررسی شده است. بعنوان مثال، در مطالعه‌ای تاثیر مونوترپنوئیدهایی شامل سیترال، تیمول، کارواکرول، آتروپینول[1]، پولاگون[2]، دی لیمونن[3] و منتول به روش تدخینی روی زنبورهای عسل آلوده به کنه تراشه‌ای (*Acarapis woodi*؛ Tarsonemidae) بررسی و نتایج نشان داد که تیمول و منتول سمی‌ترین ترکیبات برای زنبورعسل بودند و آتروپینول، کمترین سمیت را برای زنبورهای عسل داشت (Ellis and Baxendale, 1997). هرچند که برخلاف این نتایج در مطالعه مشابهی اثرات سمی متابولیتهای ثانویه گیاهی روی زنبورهای بالغ بررسی و مشخص شد که تیمول در مقایسه با سایر ترکیبات فاقد سمیت بود (Ebert و همکاران، ۲۰۰۷). در بررسی، اخیراً مشخص شده که تیمول در بالاترین غلظت (50% w/w) باعث تلفات بالایی در زنبورهای عسل گردیده است (Glavan و همکاران، ۲۰۲۰). همچنین Gashout و همکاران نشان دادند که تیمول در دز زیرکشندگی ۵ درصد (4.509 µg/bee) علیرغم اینکه تلفاتی روی زنبورهای عسل ایجاد نمیکند اما می‌تواند روی رفتار جستجوگری زنبورهای کندو تاثیر مستقیم بگذارد (Gashout و همکاران، ۲۰۲۰). از نظر ساختار شیمیایی، تیمول (۲-ایزوپروپیل-۵ متیل فنول) که در اسانس آویشن به وفور یافت می‌شود علاوه بر داشتن خواص کنه کشی، می‌تواند به گیرنده‌های اکتوپامینی یا گاما-آمینوبوتریک اسید در سیستم عصبی کنه‌ها متصل و باعث ایجاد اثرات کشندگی روی سیستم عصبی آنها گردد (Rattan, 2010).

در پژوهش حاضر ترانس آنتول (LD_{50}= 55.22 mg ml^{-1}) در مقایسه با دو ترکیب ثانویه دیگر استفاده شده، سمیت کمتری را بر زنبورعسل نشان داد. برخلاف این یافته، Sabahi و همکاران (۲۰۱۸)، نشان دادند که آنتول (LD_{50}=35942 µg ml^{-1}) دارای سمیت بیشتری برای زنبورهای عسل کارگر و سمیت اندک روی لاروهای آنها (LD_{50}=14518.0 μg ml^{-1}) می‌باشد (Sabahi و همکاران، ۲۰۱۸). در بررسی دیگری مشخص شده که ترانس آنتول در غلظت ۰/۰۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث تلفات ۸۰ درصدی کنه واروآ شده اما در این غلظت هیچ تلفاتی روی زنبورعسل ایجاد نکرده است (Sahebzadeh and Lau, 2017).

همچنین اثر سمیت دی‌آلیل دی‌سولفاید بر کنه واروآ بررسی و مشخص شد که این ترکیب در غلظت ۰/۰۰۲۵ میلی‌گرم بر میلی-

[1] Atropinol
[2] Polagon
[3] D-Limonene

لیتر باعث ۹۰ درصد کشندگی بر کنه واروآ می‌شود (Sahebzadeh and Lau, 2017). اما طبق بررسی منابع انجام شده تاکنون، به‌نظر می‌رسد این پژوهش اولین مطالعه، جهت ارزیابی اثر سمیت دی‌آلیل‌دی‌سولفاید روی زنبورعسل می‌باشد. در مطالعه حاضر، دی‌آلیل‌دی‌سولفاید نسبت به تیمول، سمیت تنفسی کمتری بر زنبورعسل داشت که برخلاف نتایج پژوهش حاضر، تاثیر دی‌آلیل‌دی‌سولفاید بر لاروهای بیدآرد توسط Shahriari and Sahebzadeh (۲۰۱۷)، نشان داد که دی-آلیل‌دی‌سولفاید سمیت بیشتری نسبت به تیمول و آلفاپینن بر این آفت داشت.

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که علیرغم سمیت تنفسی کم دی‌آلیل‌دی‌سولفاید، اما این متابولیت گیاهی باعث کاهش بقای محسوس زنبورهای عسل در مقایسه با تیمول و ترانس آنتول، شده است. در راستای این نتایج، Dickel و همکاران (۲۰۱۸)، نشان دادند که بقای جمعیت‌های زنبورعسل تحت تاثیر غذای آلوده به آفت‌کش‌ها و کنه‌کش‌ها، کاهش محسوسی داشته است. هم‌چنین مطالعه Charpentier و همکاران (۲۰۱۴)، نیز نشان داد که لارو زنبور عسل تحت تاثیر سمیت مزمن تیمول (۶ روزه) باعث کاهش بقای آن می‌شود. مطالعه دیگری نیز نشان داد که اسانس اوکالیپتوس (در غلظت ۳/۳۳ تا ۶/۶۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) باعث کاهش بقای زنبورهای عسل به کمتر از ۰/۴ درصد طی نه روز گردید در حالیکه متابولیت ثانویه آن (۱و۸-سینئول) باعث کاهش بقای مشابه طی ۱۳ روز گردید (Porrini و همکاران، ۲۰۱۷). همچنین مشخص شد که زنبورهای تغذیه شده با تیمول، میزان زنده مانی کمتری نسبت به زنبورهای تغذیه شده با شربت قند دارند و زنبورهای تیمارشده با تیمول پس از ۵ روز دچار مرگ ومیر شدند (Aboushaara و همکاران، ۲۰۱۷). درحالیکه در مطالعه دیگری مشخص شد که زنبورهای تغذیه شده با تیمول بطورمعنی داری بقای بیشتری در مقایسه با زنبورهای شاهد داشتند (Costa و همکاران، ۲۰۱۰). بر خلاف نتایج پژوهش حاضر، بررسی Hogeboom (۲۰۱۹)، نشان داد که افزودن متابولیت‌های ثانویه گیاهی به شربت باعث افزایش بقای متوسط زنبورعسل شده و در برخی موارد طول عمر زنبورهای کارگر را بیش از دو برابر افزایش می‌دهد. این نتایج در مغایرت با یافته های پژوهش حاضر است. هرچند که برخی از مطالعات قبلی به نقش اسانسهای گیاهی بعنوان پرواکسیدان[4] در تولید گونه های اکسیژن فعال اشاره کرده اند (Bakkali و همکاران، ۲۰۰۸) اما این احتمال وجود دارد که متابولیتهای ثانویه گیاهی میتوانند باعث تحریک فعالیت آنتی اکسیدانی در سایر سیستم‌های بیولوژیکی موجودات زنده مانند زنبورهای عسل شده و مکانیزمی باشد که بقا توسط آن افزایش یابد که نیاز به مطالعات تکمیلی دارد. بطورکلی مشخص شده که سمیت مستقیم با سموم گیاهی و متابولیتهای ثانویه نتیجه‌ای از اثر عصبی ناشی از مهار استیل‌کولین‌استراز یا تداخل با گیرنده‌های انتقال دهنده عصبی اکتوپامینی و گابا است، در حالی‌که سمیت غیرمستقیم به اهداف بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بسیاری مانند مهار سم‌زدایی مربوط می‌گردد (Mossa, 2016). در سطح سلولی، اسانسهای گیاهی و اجزای آنها ممکن است با داشتن اثرات اکسیدانی باعث تغییر در جریان الکترون زنجیره تنفسی میتوکندریایی و افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) که منجر به آسیب به درشت مولکولهای زیستی (پروتئینها، لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و کربوهیدراتها) و آپوپتوز[5] (مرگ برنامه ریزی شده سلول) گردند (Bakkali و همکاران، ۲۰۰۸). از اینرو با توجه به این دانسته‌ها، در مطالعه حاضر به بررسی اثرات زیرکشندگی متابولیت‌های ثانویه گیاهی (تیمول، ترانس آنتول و دی‌آلیل‌دی‌سولفاید) روی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی زنبورعسل پرداخته شده است. کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون اس-ترانسفراز (GST) و سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، از جمله آنزیمهای مهم مهارکننده گونه‌های اکسیژن فعال و از شناخته شده ترین آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در موجودات زنده بوده و نقش مهمی در دفاع آنتی اکسیدانی در زنبورهای عسل که در معرض عوامل تنش‌زا و استرس‌های زیستی هستند، دارند (Weirich و همکاران، ۲۰۰۲). در حالت کلی، استرس اکسیداتیو در اثر افزایش تولید رادیکال های آزاد یا کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن موجود زنده تحت شرایط تنش ایجاد می‌شود. رادیکال‌های

[4] prooxidant
[5] apoptosis

آزاد باعث آسیب اکسیداتیو اجزای سلولی شده و ترکیباتی تولید می‌کنند که به‌عنوان نشانگر استرس اکسیداتیو استفاده می‌شوند. در مطالعه حاضر، مالون دی‌آلدهید به عنوان نشانگر اکسیداسیون لیپیدها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان میدهد که استفاده از متابولیت‌های ثانویه گیاهی شامل تیمول و ترانس آنتول و دی‌آلیل-دی‌سولفاید بصورت تدخینی، برای تیمار زنبورهای عسل باعث تغییر در تهویه و آلودگی محیط تیمار زنبورها شده که این امر احتمالاً می‌تواند بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی زنبورهای عسل تاثیرگذار باشد. به‌طوری‌که زنبورهایی که در معرض تیمول و ترانس آنتول قرار گرفتند، به‌دلیل ایجاد شرایط محیطی جدید توسط این ترکیبات، تحت‌تاثیر محیط آلوده قرار گرفتند و در نتیجه فعالیت سوپراکسید دیسموتاز جهت مقابله با شرایط محیطی آلوده، افزایش یافت. در راستای این نتایج، Nikoli و همکاران، نشان دادند که فعالیت‌های آنتی اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز و بیان ژن‌های آن‌ها تفاوت آماری معنی داری بین مکان-های مختلف (صنعتی و شهری) نشان می‌دهد و نتایج مطالعه آن‌ها تاکید کرد که فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در زنبورهای عسل، تحت تاثیر آلودگی محیط زیست قرار می-گیرد (Nikoli و همکاران، ۲۰۱۵). سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز، مبنای دفاع موجود زنده در برابر گونه‌های اکسیژن فعال هستند. این آنزیم‌ها از لحاظ عملکردی، با تسریع بخشیدن تفاوت مقدار آنیون‌های رادیکال سوپراکسید و تولید H_2O_2، با هم مرتبط هستند (Nikoli و همکاران، ۲۰۱۵، ۲۰۱۶).

برخی مطالعات نشان داده‌اند که عوامل استرس‌زای غیرزنده مانند مواد شیمیایی و نوع تغذیه می‌توانند فعالیت‌ها و سطوح ترجمه آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در زنبورهای عسل را کاهش دهند (Nikoli و همکاران، ۲۰۱۵، ۲۰۱۶؛ Li و همکاران، ۲۰۱۴، ۲۰۲۰). نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که سوپراکسید دیسموتاز در سم‌زدایی دی‌آلیل‌دی‌سولفاید نقش نداشته و قادر به متابولیزه کردن این ترکیب در زنبورهای عسل نمی‌باشد در حالیکه فعالیت این آنزیم در تیمارهای تیمول و ترانس آنتول در مقایسه با شاهد افزایش معنی داری نشان داده است.

مطالعات نشان می‌دهد که کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی ممکن است مربوط به استفاده شدن بیشتر آن‌ها علیه رادیکال‌های آزاد و از طرف دیگر به علت محدود شدن آنزیم-های آنتی اکسیدانی توسط گونه‌های اکسیژن فعال شده باشد. بعنوان مثال، مشخص شده که مهار فعالیت SOD توسط H_2O_2 به‌دلیل کاهش یون‌های مس در مرکز فعال این آنزیم می‌باشد (Hodgson and Fribdowich, 1975). هم‌چنین مطالعه دیگری نشان داد که افزایش استرس اکسیداتیو، سیستم دفاعی سلول همانند آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را جهت مقابله با استرس اکسیداتیو تولید شده، تحریک و فعال می‌کنند (Li و همکاران، ۲۰۱۴). در بررسی مشابهی، مشخص شده که اسانس برگ گیاه *Eugenia uniflora* (L.) باعث افزایش گونه های اکسیژن فعال و سطوح پراکسیداسیون لیپیدی در درزوفیلا ملانوگاستر (*Drosophila melanogaster*) و همچنین فعال شدن آنزیمهای آنتی اکسیدانی و پروتئین های درگیر در پاسخ به استرس وارد شده با تیمارهای آهن (10 mM) و پاراکوآت (20 mM) تأیید شده است (da Cunha و همکاران، ۲۰۱۵). طبق مطالعه Balieira و همکاران (۲۰۱۸)، افزایش سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، نشان‌گر تلاش ارگانیسم‌ها برای پاسخ به وضعیت استرس اکسیداتیو می‌باشد. این نتیجه مشابه یافته‌ی این پژوهش در زنبورهای تیمارشده با تیمول و ترانس آنتول می باشد که توانسته اند در مواجه با این دو تیمار که باعث القای استرس اکسیداتیو شده اند، پاسخ فیزیولوژیکی مناسب از طریق افزایش میزان فعالیت سوپراکسیددیسموتاز نشان دهند. هم‌چنین این نتایج در راستای تحقیقات انجام شده توسط Strachecka و همکاران (۲۰۱۴) نیز می‌باشد که نشان دادند استفاده از کافئین در تغذیه زنبورهای عسل، میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را افزایش داده است. مکانیسم عمل سوپراکسید دیسموتاز به این‌صورت است که این آنزیم نقش مهمی در حذف گونه های اکسیژن فعال از طریق کاتالیز کردن واکنش اکسایشی-کاهشی داشته و رادیکال سوپراکسید را به اکسیژن یا هیدورژن در بدن موجود زنده تبدیل می‌نماید (Colinet و همکاران، ۲۰۱۱).

مشخص شده است که کاتالاز قادر است آب اکسیژنه را به اکسیژن و آب تجزیه کند. همچنین این آنزیم قادر است سلول‌های موجودات را در برابر گونه‌های اکسیژن فعال حفاظت نماید (Weirich و همکاران، ۲۰۰۲). طبق بررسی منابع انجام شده، مطالعات اندکی درخصوص اثر مواد شیمیایی بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی زنبورعسل وجود دارد. به‌عنوان مثال در مطالعه Balieira و همکاران (۲۰۱۸) مشخص شده که ایمیداکلوپراید و کافئین باعث افزایش فعالیت کاتالاز در زنبورهای عسل شده است که نشان‌گر القای استرس اکسیداتیو می‌باشد. این نتایج در راستای تحقیقات انجام شده توسط Strachecka و همکاران (۲۰۱۴) بود که نشان دادند استفاده از کافئین باعث شده که میزان فعالیت کاتالاز افزایش داشته باشد. مطالعه دیگری نشان داد که افزایش فعالیت کاتالاز، باعث کاهش میزان پراکسیدهیدروژن حاصل از متابولیسم سلولی شده و از آسیب رسیدن به بافت جلوگیری می‌کند (Balieira و همکاران، ۲۰۱۸). به‌طورکلی، کاتالاز یکی از مهمترین آنزیم‌های جمع‌آوری کننده پراکسیدهیدروژن است که افزایش فعالیت این آنزیم باعث مقاومت حشره به تنش اکسیداتیو می‌شود (Weirich و همکاران، ۲۰۰۲). کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌تواند ناشی از تاثیر مستقیم تولید گونه‌های اکسیژن فعال پس از تیمار موجود مورد مطالعه با ترکیبات مختلف، کاهش سوبسترای آنزیمی و همچنین کاهش تنظیم فرآیندهای رونویسی و ترجمه باشد که نیاز به مطالعات تکمیلی دارد. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که کاهش فعالیت کاتالاز به دلیل مهار فعالیت این آنزیم پس از القای استرس اکسیداتیو در زنبورعسل بوده است. به‌طورکلی می‌توان گفت که کاهش سطح کاتالاز ناشی از نقش داشتن این آنزیم در روند سم‌زدایی است. سطح ناکافی این آنزیم باعث آسیب سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو می‌شود (Weirich و همکاران، ۲۰۰۲).

در برخی از موجودات زنده، آنزیم گلوتاتیون اس-ترنسفراز نیز می‌تواند در رفع آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو وارد عمل شود. یک عملکرد شناخته شده گروه آنزیمی گلوتاتیون اس-ترنسفراز (GST)، مشارکت آنها در واکنشهای آنتی اکسیدانی همراه با فعالیت آنتی اکسیدان سلولی گلوتاتیون احیاشده (GSH^{6}) به منظور از بین بردن ROS و هیدروپراکسیدهای لیپیدی است که در بافتهای آلوده تجمع می یابد (Weirich و همکاران، ۲۰۰۲). مکانیسم عمل GSTها به این صورت است که این آنزیمها از طریق اتصال به گروه تیول گلوتاتیون احیاشده به حضور گونه های اکسیژن فعال و طیف گسترده‌ای از زنوبیوتیک‌ها واکنش نشان می‌دهند (Rand و همکاران، ۲۰۱۵). این خانواده آنزیمی در سم-زدایی حشره‌کش‌ها و متابولیت‌های ثانویه و هم‌چنین در محافظت در برابر استرس اکسیداتیو نقش مهمی دارند (Badiou-Beneteau و همکاران، ۲۰۱۲). در سطح متابولیسم، مکانیسم-های مقاومت حشرات نسبت به سموم گیاهی و آفتکشهای شیمیایی شامل القای آنزیم‌های سم‌زدایی است که مواد سمی را به ترکیبات کم سمیت و محلول قابل دفع تبدیل میکند. مشخص شده که در حشرات، افزایش تولید ROS نیز با فرآیندهای سم زدایی همراه است (Rand و همکاران، ۲۰۱۵). با توجه به نتایج پژوهش حاضر، دلیل افزایش فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز در زنبورهای عسل تیمار شده با تیمول و ترانس آنتول را می‌توان این-گونه بیان کرد که این آنزیم در سم‌زدایی دو متابولیت ثانویه فوق-الذکر از طریق افزایش میزان فعالیت، به‌طور موفقیت آمیزی عمل نموده است. در راستای این نتایج، Staron و همکاران (۲۰۱۷) بیان کردند که افزایش میزان فعالیت GST می‌تواند به دلیل القای استرس اکسیداتیو باشد. هم‌چنین Strachecka و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که کافئین باعث شده که میزان فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز در زنبورهای عسل افزایش یابد. مطالعات اندکی درخصوص تغییرات آنزیمی گلوتاتیون اس-ترنسفرازها در زنبورهای تیمارشده با سموم گیاهی انجام شده است اما بررسیهای مشابهی با سموم شیمیایی مختلف نشان داد که که زنبورهای عسل تیمار شده با آفت‌کش‌های مختلف باعث افزایش فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز در زنبورهای عسل شده است (Staron و همکاران،۲۰۱۷؛ Zhu و همکاران، ۲۰۲۰). علاوه براین مطالعه Badawy و همکاران (۲۰۱۵)، نشان داد که دوزهای پایین

[6] reduced glutathione

آفتکشها باعث افزایش قابل توجهی در فعالیت گلوتاتیون اس-ترانسفراز در زنبورهای عسل شده، در حالی‌که این آنزیم در دوزهای بالاتر این سموم به‌طور قابل توجهی مهار شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که کاهش گلوتاتیون اس-ترانسفراز در زنبورهای عسل تیمار شده با دی‌آلیل‌دی‌سولفاید به‌علت مهار فعالیت این آنزیم توسط دی‌آلیل‌دی‌سولفاید است. از عوارض کاهش گلوتاتیون اس-ترانسفراز می‌توان به آسیب سلولی ایجاد شده از طریق استرس اکسیداتیو اشاره کرد (Felton and Summers 1995؛ Chakrabarti و همکاران، ۲۰۱۵؛ Balieira و همکاران، ۲۰۱۸) که می‌تواند فیزیولوژی و به تبع آن بقای حشره را تحت تاثیر قرار دهد، بنابراین پاسخ سلولی در هنگام تیمار زنبورهای عسل با دی‌آلیل‌دی‌سولفاید نیاز به بررسیهای تکمیلی دارد.

با توجه به این ارتباط، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان مالون‌دی‌آلدهید در زنبورهای عسل تیمار شده با هر سه متابولیت ثانویه استفاده شده در این پژوهش، کاهش معنی‌داری داشت. در مطالعه‌ای مشابه مشخص شد که حتی کاهش بسیاراندک در میزان پراکسیداسیون لیپید در زنبورهای تیمارشده با پاراکوآت باعث از بین رفتن افراد با قدرت بدنی ضعیف شده و مقدار کمّی MDA شاید باعث از بین رفتن زنبور عسل نشود، اما می‌تواند بعنوان ملاکی برای بیان میزان استرس اکسیداتیو وارد شده به این حشره باشد که در طولانی مدت باعث تحت تاثیرقراردادن بقای زنبورعسل گردد (Li-Byarlay و همکاران، ۲۰۱۶). به‌طورکلی مشخص شده که گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌تواند با اسیدچرب اشباع نشده غشاء لیپیدی واکنش داده و باعث القای پراکسیداسیون لیپیدها شوند که بر عملکرد فیزیولوژیکی سلول‌های غشا اثر می‌گذارد و محصول نهایی که همان مالون دی‌آلدهید است را تولید نمایند (Seehuus و همکاران، ۲۰۰۶). در راستای نتایج پژوهش حاضر مبنی بر کاهش سطح مالون دی آلدهید در زنبورهای عسل تیمار شده با هر سه متابولیت ثانویه استفاده شده، میتوان بیان کرد که سطح پایین یا فقدان پراکسیداسیون لیپیدی نشاندهنده اثرات محافظتی آنزیم های آنتی اکسیدانی می‌باشد (Del Rio و همکاران، ۲۰۰۵). کاهش سطح مالون دی آلدهید در زنبورهای عسل، تحت تاثیر ترکیب دی‌آلیل‌دی‌سولفاید در مطالعه حاضر به اثبات رسید که در همین راستا، بررسی Shaarawy و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان داد که کاهش میزان پراکسیداسیون لیپید با اسانس سیر، به دلیل توانایی در مهار رادیکال‌های هیدروکسیل و پروکسیل می‌باشد.

در مطالعه Balieira و همکاران (۲۰۱۸)، ایمیداکلوپراید به‌طور قابل توجهی میزان پراکسیداسیون لیپید را در زنبورهای عسل بالا برده و باعث افزایش مالون دی‌آلدهید شد که این نتایج با مطالعه حاضر مغایرت دارد. در زنبورعسل بسته به نوع تغذیه، تخم‌های ماده تبدیل به کارگر یا ملکه می‌شوند. اگرچه ملکه‌ها و کارگران از یک ژنوم مشترک برخوردار هستند اما حداکثر طول عمر ملکه-ها بسیار بیشتر از کارگران است. کارگران تازه متولد شده دارای ترکیب اسیدهای چرب غشایی مشابه به ملکه‌ها هستند اما در هفته اول زندگی عمر آنها، محتوای اسیدهای چرب غیر اشباع دارای چند پیوند دوگانه، در این افراد زیاد شده، در حالی‌که به موازات آن محتوای اسیدهای چرب غیر اشباع تک پیوندی کاهش معنی-داری یافته که احتمالاً به دلیل مصرف گرده توسط این گروه از زنبورهای عسل است. این بدان معناست که غشای سلولی زنبورهای عسل به احتمال زیاد در هفته اول تولد، مستعد پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند (Haddad و همکاران، ۲۰۰۷) با این وجود، نیاز است که میزان پراکسیداسیون لیپیدی طی مراحل مختلف رشدی زنبورعسل در شرایط تنشی مختلف مورد مطالعه جامع قرار گیرد.

نتایج پژوهش حاضر بیان‌گر افزایش میزان پروتئین تحت تاثیر ترکیبات مورد مطالعه می‌باشد که می‌تواند به دلیل مقابله با اثرات ناشی از تنش اکسیداتیو در زنبورهای عسل تیمار شده‌باشد. در راستای نتایج بدست آمده از این پژوهش، Schoonhoven (۱۹۸۲)، افزایش میزان پروتئین را به دلیل مصرف بیشتر مواد غذایی و تولید بیشتر مواد ذخیره‌ای بیان کرده است. علاوه بر این، مطالعات سایر محققین نیز بیان می‌کند که افزایش محتوای پروتئین کل می‌تواند در ارتباط با افزایش بیوسنتز پروتئین برای تحمل تنش

ایجاد شده باشد. همچنین مشخص شده که بطور کلی غلظت پروتئین تا روز چهاردهم زندگی زنبورهای کارگر افزایش یافته و سپس در مرحله جستجوگری آنها کاهش می یابد که میتواند در ارتباط مستقیم با متابولیسم کربوهیدراتها و چرخه کوری در این حشره باشد (Strachecka و همکاران، ۲۰۱۹).

نتیجه‌گیری

ترکیبات ثانویه شامل تیمول، ترانس آنتول و دی‌آلیل‌دی‌سولفاید برای زنبورهای عسل سمیت تنفسی هرچند اندک ایجاد می‌کنند که تیمول نسبت به دو ترکیب دیگر سمیت تنفسی بیشتری را از خود نشان داد. هم‌چنین با افزایش غلظت این ترکیبات، میزان مرگ‌و میر زنبورهای عسل افزایش یافت. ترکیبات مورد مطالعه در این پژوهش، باعث تغییراتی در میزان بقای زنبورهای عسل گردید، به‌طوری‌که دی‌آلیل‌دی‌سولفاید نسبت به دو ترکیب دیگر کاهش بقای بیشتری را بر زنبورهای عسل نشان داد. هم‌چنین ترکیبات مورد مطالعه در این تحقیق، باعث تغییرات معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در زنبورهای عسل شد. به‌طوری‌که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز وگلوتاتیون اس-ترانسفراز، تحت تاثیر تیمول و ترانس آنتول، افزایش یافت. در حالی‌که دی‌آلیل‌دی‌سولفاید اثر مهارکنندگی بر فعالیت این آنزیم‌ها داشت. همچنین میزان سطح پراکسیداسیون لیپیدها تحت تاثیر هر سه ترکیب ثانویه مورد بررسی، کاهش یافت. ترکیبات مورد بررسی در این مطالعه، باعث افزایش میزان پروتئین کل در زنبورهای عسل شد که این افزایش مقدار می‌تواند در نتیجه‌ی مصرف بیشتر مواد غذایی و تولید مواد ذخیره‌ای بیشتر، جهت مقابله با استرس اکسیداتیو ایجاد شده، بوده باشد.

به‌طور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که علی‌رغم ایجاد تلفات نسبتاً کم توسط متابولیت‌های ثانویه مورد مطالعه (تیمول، ترانس آنتول و دی‌آلیل‌دی‌سولفاید)، غلظت‌هایی با کشندگی کم از آن‌ها، قادر به القای استرس اکسیداتیو در زنبورعسل بوده که می‌تواند بقای حشره را تحت تاثیر قرار دهد. لذا توصیه می‌شود که استفاده از این ترکیبات به‌منظور مبارزه با واروآ در کندوهای زنبورعسل با احتیاط صورت گیرد.

قدردانی

از دانشگاه زابل و بخصوص آزمایشگاه گروه گیاهپزشکی جهت تامین تجهیزات مورد نیاز این مطالعه قدردانی می گردد. هزینه اجرای این مطالعه که برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد حشره شناسی نویسنده اول می باشد، با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه زابل و از منابع مالی پژوهانه نویسنده مسئول (UOZ GR-9517-78) تامین شده‌است.

منابع

Aboushaara, H., Staron, M. and Cermakova, T. (2017). Impacts of oxalic acid, thymol, and potassium citrate as Varroa control materials on some parameters of honey bees. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 41(2):238-247.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymology*, 105: 121-126.

Alkassab, A.T., Thorbahn, D., Frommberger, M., Bischoff G. and Pistorius J. (2020). Effect of contamination and adulteration of wax foundations on the brood development of honeybees. *Apidologie*. 51: 642-651.

Badawy, M.E.I., Nasr, H.M. and Rabea, E.I. (2015). Toxicity and biochemical changes in the honey bee *Apis mellifera* exposed to four insecticides under laboratory conditions. *Apidologie*. 46:177-193.

Badiou-Beneteau, A., Carvalho, S.M., Brunet, J., Carvalho, G.A., Bulete, A., Giroud, B. and Belzunces, L.P. (2012). Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 82: 22-31.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils -A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 446-475.

Balieira, K.V.B., Mazzo, M., Bizerra, P.F.V., Guimarães, A.R.D.J.S., Nicodemo, D. and Mingatto, F.E. (2018). Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine. *Apidologie*. 49(5):562-572.

Bonnafe, E., Drouard, F., Hotier, L., Carayon, J.L., Marty, P., Treilhou, M. and Armengaud, C. (2015). Effect of a thymol application on olfactory memory and gene expression levels in the brain of the honeybee *Apis mellifera*. *Environmental Science and Pollution Research*. 22(11):8022-8030.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-54.

Chakrabarti, P., Rana, S., Sarkar, S., Smith, B. and Basu, P. (2015). Pesticide-induced oxidative stress in laboratory and field populations of native honey bees along intensive agricultural landscapes in two Eastern Indian states. *Apidologie*. 46(1):107-129.

Charpentier, G., Vidau, C., Ferdy, J. B., Tabart, J. and Vetillard, A. (2014). Lethal and sub-lethal effects of thymol on honeybee (*Apis mellifera*) larvae reared in vitro. *Pest Management Science*. 70(1): 140-147.

Colin, T., Lim, M.Y., Quarrell, S.R. Allen G.R. and Barron A.B. (2019). Effects of thymol on European honey bee hygienic behaviour. *Apidologie*. 50:141-152.

Colin, T., Plath, J.A., Klein, S., Vine, P., Devaud, J.M., Lihoreau, M. et al. (2020). The miticide thymol in combination with trace levels of the neonicotinoid imidacloprid reduces visual learning performance in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. 51: 499-509.

Colinet, D., Cazes, D., Belghazi, M., Gatti, J. L. and Poirié, M. (2011). Extracellular superoxide dismutase in insects characterization, function, and interspecific variation in parasitoid wasp venom. *Journal of Biological Chemistry*. 286(46): 40110-40121.

Costa, C., Lodesani, M. and Maistrello, L. (2010). Effect of thymol and resveratrol administered its candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honeybees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions. *Apidologie*. 41(2):141-150.

da Cunha, F.A.B., Wallau, G.L., Pinho, A.I., Nunes, M.E.M., Leite, N.F., Tintino, S.R., et al. (2015). *Eugenia uniflora* leaves essential oil induces toxicity in *Drosophila melanogaster*: Involvement of oxidative stress mechanisms. *Toxicology Research*. 4: 634-644.

Del Rio, D., Stewart, A.J. and Pellegrini N. (2005). A review of studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. Nutrition, *Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 15(4):316-328.

Dickel, F., Munch, D., Amdam, G.V., Mappe, S.J. and Freitak, D. (2018). Increased survival of honeybees in the laboratory after simultaneous exposure to low doses of pesticides and bacteria. *PLoS ONE*. 13 (1): e0191256.

Ebert, T.A., Kevan, P.G., Bishop, B.L., Kevan, S.D. and Downer, R.A. (2007). Oral toxicity of essential oils and organic acids fed to honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*. 46(4): 220-224.

Eliash, N. and Mikheyev, A. (2020). Varroa mite evolution: A neglected aspect of worldwide bee collapses?. *Current Opinion in Insect Science*. 39: 21-26.

Ellis, M.D. and 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.

Felton, G.W. and Summers, C.B. (1995). Antioxidant system in insect. *Archieve of Insect Biochemical and Physiology*. 29(2):187-197.

Floris, I., Satta, A., Cabras, P., Garau, V.L. and 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.

Fujiyuki, T., Matsuzaka, E., Nakaoka, T., Takeuchi, H., Wakamoto, A., Ohka, S. et al. (2009). Distribution of Kakugo virus and its effects on the gene expression profile in the brain of the worker honeybee *Apis mellifera* L. *Journal of Virology*. 83(22):11560-11568.

Gashout, H.A., Guzman-Novoa, E. and Goodwin, P.H. (2020). Synthetic and natural acaricides impair hygienic and foraging behaviors of honey bees. *Apidologie*. 51:1155-1165.

Glavan, G., Novak, S., Božič, J. and Kokalj, A.J. (2020). Comparison of sublethal effects of natural acaricides carvacrol and thymol on honeybees. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 166: 1-9.

Haddad, L.S., Kelbert, L. and Hulbert, A.J. (2007). Extended longevity of queen honey bees compared to workers is associated with peroxidation-resistant membranes. *Experimental Gerontology*, 42(7):601-609.

Hodgson, E.K. and Fridovich, I. (1975). The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of enzyme. *Biochemistry*.14(24):5294-5949.

Hogeboom, A. (2019). Plant Secondary Metabolites Enhance Survival and Pathogen Tolerance in the European Honey Bee: A Structure-Function Study (Doctoral dissertation, *Colorado State University*. Libraries).

Isman, M.B. (2020). Botanical Insecticides in the Twenty-First Century-Fulfilling Their Promise? *Annual Review of Entomology*. 65:233-249.

Johnson, R.M., Dahlgren, L., Siegfried, B.D. and Ellis, M.D. (2013). Effect of in-hive miticides on drone honeybee survival and sperm viability. *Journal of Apicultural Research*. 52(2):88-95.

Klouceka, P., Smida, J., Flesarb, J., Havlikb, J., Titerac, D., Radab, V., Drabekd, O. and Kokoska, L. (2012). In vitro inhibitory activity of essential oil vapors against *Ascosphaera apis*. *Natural Product Communications*. 7(2):253-256.

Köhler, A., Nicolson, S.W. and Pirk, C.W.W. (2013). A new design for honey bee hoarding cages for laboratory experiments. *Journal of Apicultural Research*. 52:12-14.

Li, C., Xu, B., Wang, Y., Yang, Z., and Yang, W. (2014). Protein content in larval diet affects adult longevity and antioxidant gene expression in honey bee workers. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 151:19-26.

Li, Z., Hou, M., Qiu, Y., Zhao, B., Nie, H., and Su, S. (2020). Changes in antioxidant enzymes activity and metabolomic profiles in the guts of honey bee (*Apis mellifera*) larvae infected with *Ascosphaera apis*. *Insects*. 11(419): 1-12.

Li-Byarlay, H., Huang, M. H., Simone-Finstrom, M., Strand, M. K., Tarpy, D. R. and Rueppell, O. (2016). Honey bee (*Apis mellifera*) drones survive oxidative stress due to increased tolerance instead of avoidance or repair of oxidative damage. *Experimental Gerontology*. *83*:15-21.

Mengoni Goñalons, C. and Farina, WM. (2015). Effects of sublethal doses of Imidacloprid on young adult honeybee behaviour. *PLoS ONE*. 10(10): e0140814.

Mondet, F., Goodwin, M. and 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.* 197: 1055-1062.

Mossa, A.T.H. (2016). Green pesticides: Essential oils as biopesticides in insect-pest management *Journal of Environmental Science and Technology*. 9(5): 354-378.

Nikolic, T.V., Purać, J., Orčić, S., Kojić, D., Vujanović, D., Stanimirović, Z. and Blagojević, D.P. (2015). Environmental effects on superoxide dismutase and catalase activity and expression in honey bee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. *90*(4):181-194.

Oppenoorth, F.J. (1979). Glutathione S-transferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly and their influence on resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 11:176-178.

Peng, G., Kashio, M., Morimoto, T., Li, T., Zhu, J., Tominaga, M. and Kadowaki, T. (2015). Plant-derived tick repellents activatethe honey bee ectoparasitic mite TRPA1. *Cell Reports*. 12:190-202.

Porrini, M.P., Garrido, P.M., Gende, L.B., Rossini, C., Hermida, L., Marcángeli, J.A., and Eguaras, M.J. 2017. Oral administration of essential oils and main components: Study on honey bee survival and *Nosema ceranae* development. *Journal of Apicultural Research*. 56(5):616-624.

Price, K.L. and Lummis, S.C. (2014). An atypical residue in the pore of *Varroa destructor* GABA-activated RDL receptors affects picrotoxin block and thymol modulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. *55*:19-25.

Rand, E.E., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C.W.W. and Nicolson, S.W. (2015). Detoxication mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Scientific Reports*. 5(1779): 1-11.

Rattan, R.S. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*. 29(9):913-920.

Sabahi, Q., Hamiduzzaman, M.M., Barajas-Pérez, J.S., Tapia-Gonzalez, J.M. and Guzman-Novoa, E. (2018). Toxicity of anethole and the essential oils of lemongrass and sweet marigold to the parasitic mite *Varroa destructor* and their selectivity for honey bee (*Apis mellifera*) workers and larvae. *Psyche*. Article ID *6196289*:1-8.

Sabahi, Q., Morfin, N., Emsen, B., Gashout, H.A., Kelly, P.G., Otto, S. et al. (2020). Evaluation of dry and wet formulations of oxalic acid, thymol, and oregano oil for varroa mite (Acari: Varroidae) control in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of Economic Entomology*. 113(6), 2588-2594.

Sahebzadeh, N. and Lau, W.H. (2017). Expression of heat-shock protein genes in *Apis mellifera meda* (Hymenoptera: Apidae) after exposure to monoterpenoids and infestation by *Varroa destructor* mites (Acari: Varroidae). *European Journalof Entomology*. 114:195-202.

Schoonhoven, L.M. (1982). Biological aspects of antifeedants. *Entomologia Exprimentalis et Applicata*, 31:57-89.

Seehuus, S.C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., and Amdam, G.V. (2006). Reproductive protein protects sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:962-967.

Shaarawy, S.M., Tohamy, A.A., Elgendy, S.M., Abd-Elmageed, Z.Y., Bahnasy, A., Mohamed, M.S. et al. (2009). Protective effects of garlic and silymarin on NDEA-induced rats hepatotoxicity. *International Jpurnal of Biological Sciences.* 5: 549-557.

Shahriari, M. and Sahebzadeh, N. (2017). Effect of diallyl disulfide on physiological performance of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 50(1-2): 33-46.

Shoukry, R.S., Khattaby, A.M., El-Sheakh, A.A., Abo-Ghalia, A.H. and Elbanna, S.M. (2013). Effect of some materials for controlling varroa mite on the honeybee drones (*Apis mellifera* L.). *Egyptian Journal of Agricultural Research*. 91(3):825-834.

Slater, T.F. (1984) Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 105: 283-293.

Slowinska, M., Nynca, J., Wilde, J., Bak, B., Siuda, M. and Ciereszko, A. (2016). Total antioxidant capacity of honeybee haemolymph in relation to age and exposure to pesticide and comparison to antioxidant capacity of seminal plasma. *Apidologie*. 47(2): 227-236.

Staron, M., Sabo, R., Sobeková, A., Sabová, L., Legáth, J., Lohajová, Ľ. and Javorský, P. (2017). Formetanate toxicity and changes in antioxidant enzyme system of *Apis mellifera* larvae. *Environmental Science and Pollution Research*. *24*(16):14060-14070.

Stefanini, M.B., Ming, L.C., Marques, M.O.M., Facanali, R., Meireles, M.A.A., Moura, L.S., Marchese, J.A. and Sousa, L.A. (2006). Essential oil constituents of different organs of fennel (*Foeniculum vulgare* var. vulgare). *The Revista Brasileira de Plantas Medicinais.* 8: 193-198.

Strachecka, A., Grzybek, M., Ptaszynska, A.A., Los, A., Chobotow, J., and Rowinski, R. (2019). Comparison of lactate dehydrogenase activity in hive and forager honeybees may indicate delayed onset muscle soreness-Preliminary studies. *Biochemistry (Moscow*). 84 (4):435-440.

Strachecka, A., Krauze, M., Olszewski, K., Borsuk, G., Paleolog, J., Merska M., Chobotow, J., Bajda, M. and Grzywnowicz, K. (2014). Unexpectedly strong effect of caffeine on the vitality of western honeybees (*Apis mellifera*). *Biochemistry (Moscow*). 79:1192-1201.

Tananaki, C., Goras, G., Huggett, N., Karazafiris, E., Dimou, M. and Thrasyvoulou, A. (2014). Evaluation of the impact of Exomite Pro™ on Varroa mite (*Varroa destructor*) populations and honeybee (*Apis mellifera*) colonies: efficacy, side effects and residues. *Parasitology Research.* 113(4):1251-1259.

Weirich, G.F., Collins, A.M. and Williams, V.P. (2002). Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera. Apidologie*. 33:3-14.

Xavier, V.M., Message, D., Picanco, M.C., Chediak, M., Santana Junior, P.A., Ramos, R.S. and Martins, J.C. (2015). Acute toxicity and sublethal effects of botanical insecticides to honeybees. *Journal of Insect Sciences*. 15(1):1-6.

Xiao, J., He Q., Liu, Q., Wang, Z., Yin, F., Chai, Y., Yang, Q., Jiang, X., Liao, M., Yu, L., Jiang, W., and Cao, H. (2022). Analysis of honey bee exposure to multiple pesticide residues in the hive environment. *Science of The Total Environment*. 805, 150292: 1-10.

Yang, F.L., Zhu, F. and Lei, C.L. (2012). Insecticidal activities of garlic substances against adults of grain moth, *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Insect Sciences*. 19:205-212.

Zhang, Y., Yan, H., Lu, W. Li, Y., Guo, X., and Xu, B. (2013). A novel Omega-class glutathione S-transferase gene in *Apis cerana cerana*: Molecular characterisation of GSTO2 and its protective effects in oxidative stress. *Cell Stress and Chaperones*. 18:503-516.

Zhu, Y.C., Caren, J., Reddy ,G.V.P., Li, W., and Yao, J. (2020). Effect of age on insecticide susceptibility and enzymatic activities of three detoxification enzymes and one invertase in honey bee workers (*Apis mellifera*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 238 (108844): 1-8.