

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VALDARNO



Dipartimento di Scienze Biologiche e Naturali

Corso di Laurea in Scienze Biologiche

TESI DI LAUREA

Plasticità a corto-medio termine dell'*Apis mellifera*: implicazione del disorientamento

Laureando

Alessandro Fabbri

Relatrice

Prof.ssa Elena Neri

Anno Accademico 2025/2026

ABSTRACT

La comunità di un alveare è dipendente dalla capacità di comunicare dei singoli individui. Una complessa rete di comunicazione avviene all'interno dell'alveare ad esempio il comportamento meglio noto è quello della danza waggle dove attraverso una comunicazione simbolica viene trasferita tra individui le informazioni relative alla posizione di una area da bottinare nuova o già visitata. Particolare rilevante è l'elaborazione olfattiva che le api utilizzano per soddisfare non solo la ricerca del cibo, ma anche per la vita sociale e l'accoppiamento. L'*Apis mellifera* presenta comportamenti di apprendimento pavloviano e una complessa neurobiologia è stata osservata durante l'induzione di questo apprendimento. La mia tesi ha voluto descrivere alcuni processi di apprendimento in particolare il riflesso incondizionato di estensione della proboscide (PER) con gli stimoli olfattivi. Inoltre la ricerca bibliografica ha voluto evidenziare che l'azione di alcuni inquinanti, chimici soprattutto, possono alterare il processo di plasticità sinaptica alla base dell'apprendimento pavloviano.

Dediche e Ringraziamenti

INDICE

Nessuna voce di sommario trovata.

Indice delle Figure

INTRODUZIONE

L'apis mellifera è uno degli insetti più importanti per l'ecosistema a livello mondiale, a loro è attribuito il lavoro di impollinazione entomofila. Questi sono definiti insetti pronubi, molti insetti sono definiti così, ma i più importanti sono le api che trasportano il polline da un fiore all'altro permettendo l'impollinazione che porta alla formazione del frutto, questo implica anche una garanzia di biodiversità. Le api sono messe in pericolo sia dai loro predatori, che dall'uomo che rappresenta il maggior pericolo attraverso l'inquinamento atmosferico, con l'uso di pesticidi, l'abbattimento di piante, l'elettrosmog, ecc. La produzione alimentare dell'uomo dipende da questi insetti impollinatori per il 70% (coltivazioni a scopo alimentare) inoltre sono molto importanti anche a livello monetario nell'apicoltura, la morte di questi alveari porta ad una perdita di circa 30mln/anno solo in Italia, e altri 20mln/ per perdita di produzione, in agricoltura la mancata impollinazione porta a 250mln/ anno di danni. Le api comunicano tra di loro la posizione del nettare attraverso una danza che può essere circolare oppure a forma di 8, viene indicata la direzione se questa sarà verso il sole oppure contro, se l'ape taglia il cerchio formando un angolo indicherà se volare a destra o a sinistra a seconda della direzione dell'angolo. Insetticidi, pesticidi ed onde elettromagnetiche possono portare ad un disorientamento dell'ape e ad un difetto dell'apparato olfattivo. In associazione all'uso di pesticidi molti scienziati attribuiscono il rischio medio di non rientro negli alveari del 3% con temperature intorno ai 28°C, al 26% con temperature fra i 15°C ed i 20°C quindi con l'abbassarsi delle temperature aumenta il rischio di non rientro negli alveari. Poiché le api si orientano attraverso punti di riferimento come alberi ed oggetti ed il sole un possibile collegamento con l'insetticida porta al mancato ricordo, cioè non possano ricorrere alle memorie spaziali e quindi trovare i punti di riferimento. Sia i neonicotinoidi che gli organofosfati interferiscono con i segnali colinergici che comprendono la maggior parte delle neurotrasmissioni eccitatorie del sistema nervoso centrale degli insetti. Questi vanno ad inibire la acetilcolinesterasi che interrompe l'azione dell'ACH rilasciato simpaticamente a livello dei recettori. Quindi vanno a intaccare i corpi fungiformi che sono la struttura celebrale che presiede l'apprendimento e la memoria.

Il ruolo del sistema olfattivo è quello di decodificare i complessi vortici di molecole nell'ambiente e modellarli in informazioni rilevanti che consentiranno all'animale di prendere decisioni e impegnarsi in comportamenti adattati. I compiti principali del sistema olfattivo sono

ad esempio l'identificazione delle fonti di cibo, l'individuazione di possibili pericoli (come incendi o predatori), il riconoscimento di potenziali compagni e consentire interazioni sociali. Il modo in cui il sistema nervoso opera questa trasformazione dalla rilevazione di molecole chimiche attraverso la formazione di rappresentazioni neurali fino alla creazione di percetti è stato al centro di intense ricerche soprattutto sui vertebrati e negli insetti. Un risultato generale di questi studi è che le regole di base alla base dell'elaborazione olfattiva in queste diverse classi di animali sono molto simili. Per la maggior parte, si pensa che questa somiglianza derivi da una convergenza evolutiva dovuta a vincoli simili. L'olfatto consiste in una serie di trasformazioni dal mondo chimico delle molecole di odore a modelli spaziotemporali di attività neurale nel cervello dell'animale, dando luogo infine a una rappresentazione percettiva dell'odore. Le molecole di odore esistono in una miriade di composizioni chimiche, forme tridimensionali e proprietà di vibrazione, per citare solo alcune delle loro caratteristiche. Non possono essere facilmente descritti sulla base di dimensioni semplici come la lunghezza d'onda e l'intensità della luce dello stimolo quando si studia la visione dei colori. Pertanto, solo più descrittori possono descrivere adeguatamente una molecola odorante. Nell'olfatto, la prima trasformazione è quindi la rilevazione di particolari caratteristiche delle molecole da parte di proteine recettoriali dedicate (e associate), che portano attraverso una trasduzione del segnale all'attivazione di un sottoinsieme di cellule recettoriali. Questo codice combinatorio verrà quindi convogliato in una serie di strutture cerebrali. Questa elaborazione darà quindi origine a una rappresentazione percettiva utilizzata per la decisione comportamentale e può collegare la qualità dell'odore con il valore edonico e le relazioni apprese tra l'odore e gli esiti probabili. Per un secolo, l'ape *Apis mellifera* è stata un modello di insetto chiave in cui sono stati eseguiti approcci comportamentali, neuroanatomici e neurofisiologici per svelare le basi dell'olfatto e dell'apprendimento olfattivo. Le api sono insetti sociali che presentano un'ampia gamma di comportamenti basati sull'olfatto sia all'interno che all'esterno della colonia. In questa tesi approfondirò il concetto di apprendimento e condizionamento delle api con lo scopo di capire le basi di una possibile interferenza dei processi di memoria da parte dei pesticidi.

1 - I processi di apprendimento

Per spiegare il concetto di condizionamento bisogna introdurre il concetto di apprendimento. L'apprendimento è un processo che attraverso le informazioni sensoriali e l'esperienza, trasforma e adatta l'attività del sistema nervoso, per cui modifica il comportamento.

Possiamo classificare le forme di apprendimento in “ apprendimento associativo” e “apprendimento non associativo”. Quest'ultimo è un processo dove il singolo stimolo è dato ripetutamente e il sistema nervoso apprende e dà una risposta comportamentale. La forma più semplice è l'abitudine ed ha una valenza adattiva, dove il soggetto impara a riconoscere le proprietà di un nuovo stimolo e lo classifica come innocuo o privo di vantaggi per cui impara a ignorarlo. Il fenomeno opposto è la sensibilizzazione cioè quando un soggetto è esposto a uno stimolo nocivo, e di conseguenza si avranno riflessi difensivi.

L'apprendimento di nostro interesse è quello associativo, dove il soggetto impara ad associare uno stimolo con un altro, o con un comportamento, e possiamo distinguere un condizionamento operante o chiamato “apprendimento stimolo-risposta” che associa uno stimolo con una risposta specifica comportamentale e un condizionamento classico dove si associa uno stimolo con un altro.

I condizionamento pavloviano. Il condizionamento associativo può essere definito anche pavloviano, dal nome di Pavlov Ivan (1849-1936), medico, fisiologo ed etologo russo.

In questo tipo di apprendimento opera una associazione tra due stimoli: in genere tra uno stimolo definito condizionato che è di tipo sensoriale, caratterizzato dal fatto che da solo non produce una risposta oppure si ha una risposta debole o trascurabile; invece il secondo stimolo è incondizionato e produce una risposta che è innata, prodotta senza apprendimento.

Quando i due stimoli vengono associati si produce il condizionamento classico, in modo tale che lo stimolo condizionato è in grado di produrre la stessa risposta innata dello stimolo incondizionato, possiamo così definirla risposta condizionata. Per far sì che ci sia la risposta condizionata sono fondamentali due condizioni, la prima è l'ordine di presentazione degli stimoli: lo stimolo condizionato deve sempre precedere quello incondizionato. Invece la seconda riguarda la finestra temporale cioè la tempistica della presentazione dei due stimoli, secondo il principio di contiguità i due stimoli si devono verificare molto vicini per essere associati. Stabilità la risposta condizionata, il condizionamento classico persiste per un certo tempo poi si indebolisce progressivamente, e questo è chiamato processo di estinzione che può

essere contrastato ripetendo periodicamente l'associazione tra stimolo condizionato e incondizionato, questo è un processo di rinforzo.

Esperimento con il quale Pavlov, premio il nobel nel 1904, dimostrò il condizionamento classico (Figura 1).



Figura 1 - Esperimento di Pavlov

Nella prima immagine al cane viene mostrato del cibo che rappresenta lo stimolo **incondizionato che causa salivazione** (risposta incondizionata). Successivamente Pavlov propose uno stimolo condizionato, il suono della campanella, che non evocò nessuna risposta nel cane. Nella terza immagine prima viene presentato lo stimolo condizionato poi entro un breve periodo di tempo lo stimolo incondizionato, questa associazione fu ripetuta più volte. Il condizionamento classico è stabilito quando presentando all'animale la campanella, il suono ne induce una risposta condizionata, la salivazione. Anche nell'*Apis mellifera* è possibile il condizionamento pavloviano tra lo stimolo incondizionato legato all'allungamento e lo stimolo derivante dalla percezione olfattiva.

I condizionamento pavloviano nella *Apis mellifera*. Molti studio comportamentali delle Api sono stati costruiti intorno al riflesso incondizionato di estensione della proboscide (PER)¹ sia condizioni di cattività che in laboratorio (trattenute). Partendo dallo stimolo incondizionato, l'ape attraverso l'apparato boccale rileva del saccarosio ed estende la proboscide in modo naturale (Figura 2).

¹ Frings, H. (1944). The loci of olfactory end-organs in the honey-bee, *Apis mellifera* Linn. *J. Exp. Zool.* 97, 123–134.



Figura 2 - PER indotta da saccarosio

Grazie alle antenne avviene l'elaborazione olfattiva che è costituita di tre fasi principali, gli odori sono rilevati dai neuroni olfatti nelle antenne e le informazioni sotto forma di impulsi nervosi vengono ai corpi fungiformi e al corno laterale. Questo stimolo sensoriale (non condizionato) può essere associato in maniera pavloviana con il PER.

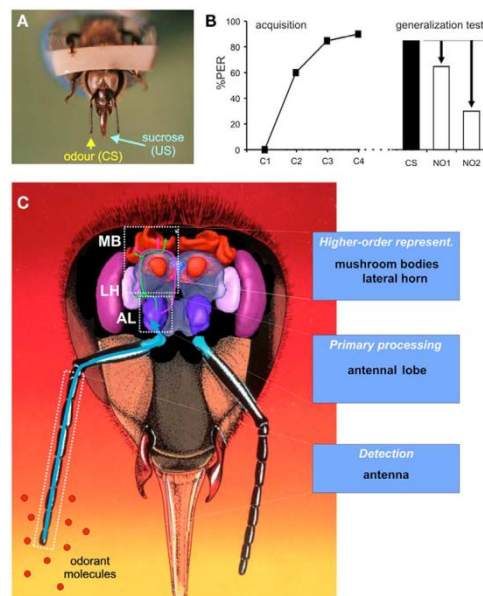


Figura 3 - Tratta da Brandt et al., 2005

Un vantaggio del modello delle api per la comprensione dell'olfatto e dell'apprendimento olfattivo è che la neuroanatomia del suo percorso olfattivo è nota in grande dettaglio.^{2,3,4,5,6}

² Kenyon, F. C. (1896). The brain of the bee – a preliminary contribution to the morphology of the nervous system of the Arthropoda. J. Comp. Neurol. 6, 134–210.

³ Suzuki, H. (1975). Convergence of olfactory inputs from both antennae in the brain of the honeybee. J. Exp. Biol. 62, 11–26.

⁴ Abel, R., Rybak, J., and Menzel, R. (2001). Structure and response patterns of olfactory interneurons in the honeybee, *Apis mellifera*. J. Comp. Neurol. 437, 363–383.

⁵ Strausfeld, N. J. (2002). Organization of the honey bee mushroom body: representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. J. Comp. Neurol. 450, 4–33.

⁶ Kirschner, S., Kleineidam, C. J., Zube, C., Rybak, J., Grunewald, B., and Rössler, W. (2006). Dual olfactory pathway in the honeybee, *Apis mellifera*. J. Comp. Neurol. 499, 933–952.

Il sistema nervoso degli insetti è composto dal cervello e da molteplici gangli segmentali della corda ventrale nel torace e nell'addome. Il cervello elabora input provenienti da tutti gli organi sensoriali e coordina l'output comportamentale attraverso i neuroni premotori o interneuroni discendenti. Sebbene il cervello dell'ape sia piccolo da circa 0,4 a 0,6 mm³ con circa 1 milione di neuroni, svolge molti compiti ed elabora, immagazzina molte informazioni. L'elaborazione olfattiva segue diversi passaggi, dal rilevamento di molecole alla periferia, tramite l'elaborazione primaria, fino all'istituzione di rappresentazioni olfattive nei centri cerebrali di ordine superiore (Figura 4).

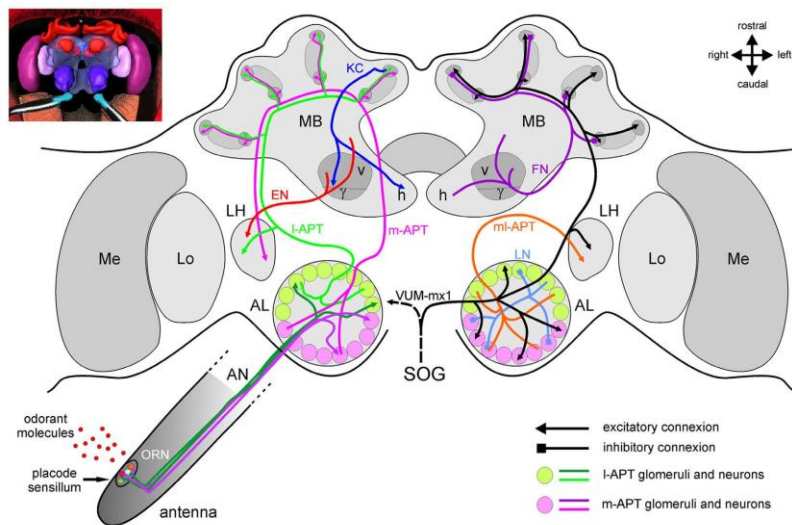


Figura 4 - Tratta da Brandt et al., 2005

Con questa immagine si illustra il cervello dell'ape a sinistra si possono notare le vie eccitatorie mentre che sono coinvolte nella trasmissione delle informazioni olfattive, mentre a destra sono rappresentate le connessioni inibitorie ed i neuroni modulatori. Il lobo antennale, riceve input da circa 60.000 neuroni del recettore olfattivo (ORN) che rilevano gli odoranti all'interno del placode sensilla sull'antenna. All'interno delle unità anatomiche e funzionali dell'AL si notano i 165 glomeruli. Gli ORN contattano circa 4000 neuroni inibitori locali che eseguono calcoli locali e circa 800 neuroni di proiezione che trasmettono ulteriormente le informazioni elaborate tramite diversi tratti.

Il rilevamento degli odori periferici inizia dai neuroni recettori (ORN), che si trovano al di sotto delle strutture cuticolari delle antenne, chiamate sensilla⁷. Ci sono diversi tipi morfologici di sensilla sull'antenna dell'insetto, la sensilla placodea è la principale sensilla olfattiva nell'ape⁸.

⁷ Kaissling, K. E. (1987). R. H. Wright Lectures on Insect Olfaction. Burnaby, BC: Simon Fraser University.

⁸ Esslen, J., and Kaissling, K. E. (1976). Zahl und Verteilung antennaler Sensillen bei der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). *Zoomorphologie* 83, 227–251.

Questa è formata da una sottile placca cuticolare di forma ovale con molti pori ed è innervata da cinque a 35 ORN^{9,10}. Le molecole odoranti raggiungono i dendriti degli ORN diffondendosi attraverso un fluido extracellulare, chiamato linfa recettore, riempiendo la cavità del sensillum.¹¹ In questo liquido ci sono proteine leganti gli odori (OBP) possono aiutare a trasportare gli odoranti agli ORN. Quando raggiunge la membrana ORN, la molecola odorosa interagisce con la proteina del recettore olfattivo (OR). Gli OR di insetti appartengono a una famiglia di proteine altamente divergenti con sette domini transmembrana, che sono diversi dalla famiglia OR dei vertebrati¹².

Gli assoni ORN formano il nervo antennale e proiettano verso un centro olfattivo primario nel cervello, l'AL è compartimentata in 165 unità neurofile sferoidali chiamate glomeruli. In un classico esperimento di condizionamento viene presentato un odore (stimolo condizionato, CS) in associazione temporale con una soluzione di saccarosio (stimolo incondizionato, US), in modo che l'odore acquisisca progressivamente il controllo sul PER, l'intervallo di tempo ottimale tra l'inizio dello stimolo condizionato e lo stimolo incondizionato nelle api è di 2-4 secondi. Nel grafico "B" della Figura 3 si può notare che l'acquisizione avviene già dopo quattro cicli di condizionamento ed è prossima ad un 100%. Successivamente la sola presentazione dell'odore innesca il PER, durante l'acquisizione, le api imparano ad associare il CS al rinforzo di saccarosio e rispondono con un PER al CS. Questo studio fu la prova che le api reagivano positivamente al condizionamento pavloviano.

L' apprendimento associativo e la formazione della memoria nelle api mellifere può essere studiata in laboratorio. Le api imbrigliate imparano ad associare uno stimolo condizionato con uno stimolo gratificante di saccarosio (incondizionato). Le api affamate estendono la proboscide quando vengono stimolati i recettori del saccarosio sulle antenne. Dopo il condizionamento e le varie ripetizioni, le api rispondono con l'estensione della proboscide allo stimolo condizionato. Sono state testate molteplici procedure di condizionamento, inclusi gli effetti con intervalli di tempi diversi tra le prove. Ognuno di loro dimostra che l'apprendimento associativo in queste condizioni di laboratorio assomiglia a forme consolidate di

⁹ Schneider, D., and Steinbrecht, R. A. (1968). Checklist of insect olfactory sensilla. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 23, 279–297

¹⁰ Kelber, C., Rössler, W., and Kleineidam, C. J. (2006). Multiple olfactory receptor neurons and their axonal projections in the antennal lobe of the honeybee *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.* 496, 395–405.

¹¹ Masson, C., and Mustaparta, H. (1990). Chemical information processing in the olfactory system of insects. *Physiol. Rev.* 70, 199–245.

¹² Touhara, K., and Vosshall, L. B. (2009). Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 307–332

condizionamento classico nei mammiferi (Figura 5).



Figura 5 - Setup sperimentale in laboratorio per lo studio del comportamento delle *Apis m.*

La discriminazione e la generalizzazione dello stimolo sono due abilità cruciali per le api. La descrizione è la proprietà di poter discriminare due stimolo odorosi differenti. Per studiare la discriminazione, i ricercatori utilizzano procedure di condizionamento differenziale: alle api vengono ripetutamente presentati due odori, uno (CS+), mentre l'altro è il (CS-). Se le api rispondono significativamente più al CS+ che al CS-, si può quindi concludere che possono discriminarle. La somiglianza percepita tra il CS e ogni nuovo odore viene misurata come il livello di risposta a questo odore rispetto al CS.

Una questione importante nelle neuroscienze sensoriali è come gli animali misurano la somiglianza tra gli stimoli e questo è legato alla capacità del soggetto di poter differenziare gli stimoli stessi attraverso l'uso dei suoi organi di senso. Vareschi nel 1971 è stato il primo ad utilizzare il condizionamento (Proboscis Extension Reflexion) PER per studiare le capacità di discriminazione delle api mellifere con un'ampia gamma di odori. Grazie alla forte caratterizzazione degli odori, e al loro sistema neurologico l'ape è in grado di immagazzinare i vari stimoli indotti. Nelle api, come nei vertebrati, le molecole di odorose alifatiche possono essere descritte da due caratteristiche principali: la natura dei gruppi chimici e la loro distanza in termini di unità di carbonio¹³. Negli anni passati è stato studiato sistematicamente il comportamento di generalizzazione delle api mediante l'uso di 16 odoranti che presentano tutte le combinazioni possibili dei quattro gruppi funzionali presenti, che sono alcoli primari e secondari, aldeidi e chetoni, e lunghezze di catena che vanno da sei a nove atomi di carbonio. Si è visto che il fattore determinate il comportamento odoroso delle api è la lunghezza della

¹³ Laska, M., Galizia, C. G., Giurfa, M., and Menzel, R. (1999). Olfactory discrimination ability and odor structure-activity relationships in honeybees.

catena di una molecola, seguita dal suo gruppo funzionale. Le api mellifere sono in grado di apprendere le concentrazioni assolute degli odori, e questo è stato dimostrato da Kramer (1976), che ha addestrato singole api operaie con gradienti di odori simulati. Questa capacità di discriminare la concentrazione è sfruttata dalle api che volano libere per indirizzare altre api verso la fonte alimentare¹⁴. In contrasto con la situazione di volo libero, il condizionamento differenziale con due concentrazioni dello stesso odore è difficile nelle api imbrigliate in laboratorio¹⁵. La capacità sensoriale delle api può essere diversa in questa situazione. Per quanto riguarda la vista, ad esempio, le api associano facilmente colori o motivi alla ricompensa del saccarosio quando volano liberamente, ma mostrano prestazioni molto inferiori quando sono trattenute in laboratorio¹⁶. La concentrazione dell'odore influenza fortemente la rilevanza degli stimoli olfattivi. Generalmente, gli odori vengono appresi più rapidamente a concentrazioni più elevate e supportano un migliore consolidamento della memoria. Inoltre, le risposte condizionate a un'alta concentrazione vengono prodotte più rapidamente, suggerendo che il sistema olfattivo ha bisogno di meno tempo per determinare la qualità dell'odore con un'alta concentrazione rispetto a una bassa concentrazione ¹⁷,

Gli odori floreali presenti in natura incontrati dalle api esploratrici non sono singole molecole ma miscele complesse¹⁸. Le api devono quindi affrontare il problema di discriminare tra miscele complesse. Alcuni autori hanno tentato di comprendere l'elaborazione di miscele complesse in esperimenti di apprendimento con estratti floreali naturali o con miscele sintetiche che presentano da sei a 14 componenti. Si è scoperto che quando le api imparano a riconoscere una miscela e vengono successivamente testate con i singoli componenti, di solito rispondono ad alcuni componenti più fortemente che ad altri. Tali componenti sono stati chiamati composti chiave. Inoltre, la risposta di apprendimento di un componente è dipendente dalla presenza di altri componenti¹⁹. Pertanto, l'elaborazione di diversi odoranti produce simultaneamente risultati

¹⁴ Ditzen, M., Evers, J. F., and Galizia, C. G. (2003). Odor similarity does not influence the time needed for odor processing.

¹⁵ Bhagavan, S., and Smith, B. H. (1997). Olfactory conditioning in the honey bee *Apis mellifera*: effects of odor intensity

¹⁶ Mota, T., Giurfa, M., and Sandoz, J. C. (2011). Color modulates olfactory learning in honeybees by an occasion-setting mechanism.

¹⁷ Wright, G. A., Carlton, M., and Smith, B. H. (2009). A honeybee's ability to learn, recognize, and discriminate odors depends upon odor sampling time and concentration.

¹⁸ Knudsen, J. T., Tollsten, L., and Bergström, L. G. (1993). Floral scents – a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques.

¹⁹ Sandoz, J. C., Laloi, D., Odoux, J. F., and Pham-Delègue, M. H. (2000). Olfactory information transfer in the honeybee: compared efficiency of classical conditioning and early exposure

imprevedibili, un fenomeno chiamato "interazione della miscela". A causa dell'apparente complessità dell'elaborazione delle miscele, la ricerca sulle interazioni delle miscele si è concentrata sulle miscele binarie²⁰. Generalmente un odore viene appreso meglio se presentato da solo, rispetto a quando è insieme a un secondo odorizzante. Di solito, quando apprendono una miscela AB, le api possono riconoscere i componenti. Tuttavia, una componente viene spesso appresa meglio dell'altra, un fenomeno chiamato "overshadowing". Inoltre esiste il fenomeno del "blocco", dove l'apprendimento iniziale di un odorizzante A blocca l'apprendimento dell'odorante B quando la miscela AB viene successivamente addestrata. Sebbene questo effetto sia stato osservato in diversi studi^{21,22}, rimane controverso. A livello teorico sono stati utilizzati concetti estrapolati da teorie psicofisiche per tentare di capire come una miscela è elaborata dal cervello dell'ape.

La danza Waggle. Quando parliamo di comunicazione nell'ape possiamo suddividerla in comunicazione a livello olfattivo o visivo. Per quanto riguarda l'olfatto le api hanno un ricco repertorio di feromoni per garantire la comunicazione nei vari contesti²³.

La maggior parte dei feromoni sono miscele prodotte dalla regina, ma anche dalle api operaie, le miscele di feromoni emesse sono in componenti ben bilanciate e precise ogni volta, poiché una piccola variazione di queste potrebbe portare scompigli all'interno dell'alveare.

La regina unica del genere femminile fertile comunica al suo alveare attraverso un miscuglio di feromoni rilasciati dalle sue ghiandole mandibolari. Il feromone della regina inizialmente venne considerato come un'unica sostanza, l'acido 9-oxo-(E)-2-decenoico (9-ODA)²⁴ però in seguito vari studi rilevarono che il feromone effettivo contiene diversi componenti aggiuntivi.²⁵ Il feromone della regina rafforza la coesione sociale dell'alveare, inoltre inibisce lo sviluppo ovarico delle operaie, inoltre il 9-ODA agisce anche sui maschi e ha un ruolo per quanto riguarda l'accoppiamento in volo, attirandoli fino a 60 m. Altra classe di feromoni sono quelli di allarme i quali vengono rilasciati quando si affrontano potenziali nemici, dopo la puntura

²⁰ Getz, W. M., and Smith, K. B. (1987). Olfactory sensitivity and discrimination of mixtures in the honeybee *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol*

²¹ Hosler, J. S., and Smith, B. S. (2000). Blocking and the detection of odor components in blends.

²² Linstner, C., and Smith, B. H. (1997). A computational model of the response of honey bee antennal circuitry to odor mixtures: overshadowing, blocking and unblocking can arise from lateral inhibition.

²³ Slessor, K. N., Winston, M. L., and Le Conte, Y. (2005). Pheromone communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. Chem. Ecol.* 31, 2731–2745.

²⁴ Barbier, M., and Lederer, E. (1960). Structure chimique de la substance royale de la reine d'abeille *Apis mellifera* L. *C. R. Acad. Sci. Paris* 251, 1131–1135.

²⁵ Keeling, C. I., Slessor, K. N., Higo, H. A., and Winston, M. L. (2003). New components of the honey bee (*Apis mellifera* L.) queen retinue pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4486–4491.

dell'ape vengono rilasciati più di 40 composti altamente volatili, il principale è isopentile acetato (IPA)²⁶. Il rilascio di questo feromone attira altre api e le fa pungere e attaccare in automatico, altro feromone di allarme, il 2-eptanone, viene rilasciato dalle ghiandole mandibolari²⁷ ha un'azione repellente su potenziali intrusi e ladri di altri alveari. Questi sono alcuni esempi per quanto riguarda la comunicazione nell'alveare a livello olfattivo, ma abbiamo anche un altro tipo di comunicazione che è visiva e olfattiva molto complessa denominata waggle dance.

La comunicazione tra le api avviene attraverso movimenti ritualizzati, la cosiddetta danza waggle che va a codificare la direzione, la distanza, gli aspetti qualitativi e quantitativi dell'obiettivo. Questa forma simbolica di comunicazione si adatta alle esigenze della colonia ed è influenzata dalle risposte delle api riceventi. La danza delle api è un sistema di comunicazione unico e non è nota in nessun'altra specie animale in una forma così avanzata (Figura 6). Il processo di comunicazione prevede molteplici forme di apprendimento condizionato da parte dell'ape reclutata dal ballerino.



Figura 6 - Tratta da Brandt et al., 2005

L'ape reclutata apprende l'odore della fonte di cibo sul corpo del ballerino e, poiché potrebbe aver avvertito lo stesso odore durante il foraggiamento, l'attivazione della memoria la guiderà anche nel luogo precedentemente visitato, in queste condizioni la recluta assisterà al ballo solo per un breve periodo. Se il ballerino non comunica alcun odore già conosciuto le reclute

²⁶ Collins, A. M., and Blum, M. S. (1982). Bioassay of compounds derived from the honeybee sting. *J. Chem. Ecol.* 8, 463–470.

Pickett, J. A., Williams, I. H., and Martin, A. P. (1982). (Z)-11-eicosen-1-ol, an important new pheromonal component from the sting of the honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). *J. Chem. Ecol.* 8, 163–175.

²⁷ Shearer, D. A., and Boch, R. (1965). 2-heptanone in the mandibular gland secretion of the honey-bee. *Nature* 206, 530.

partecipano al ballo per più round, apprendendo i parametri spaziali e questo messaggio non riguarda solo la direzione di volo verso l'obiettivo, ma indica anche il luogo comunicato dal ballo in relazione spaziale a quei luoghi neo esplorati. L'ape volerà direttamente nel luogo indicato dalla danza o nel luogo precedentemente visitato. Una volta arrivata lì può prendere una scorciatoia diretta tra questi due luoghi: cioè il luogo precedentemente sperimentato e il luogo indicato dalla danza.

Questi e altri dati sono presi come prova che i molteplici meccanismi di navigazione utilizzati dalle api sono integrati e formano una rappresentazione simile a una mappa dell'ambiente, che consente loro di navigare lungo nuove scorciatoie tra più posizioni senza dover implementare strumenti di navigazione di base come l'orientamento, abbinandolo a memorie di immagini. Anche le api danzanti imparano l'importanza della loro posizione comunicata alla colonia dal feedback delle reclute. Nel contesto di uno sciame partecipano anche ad altri balli e possono inviare un segnale di stop a un'altra ape danzante per un sito di nidificazione diverso considerato meno attraente.

Presi insieme, la complessità della comunicazione della danza e la ricchezza del trasferimento di informazioni dimostrano che anche un cervello minuscolo come quello dell'ape consente processi cognitivi, inclusa l'estrazione di relazioni spaziali, il confronto dei valori degli obiettivi rappresentati e la decisione da fare rappresentazioni. E chiaramente i processi di apprendimento pavloviani risultano basilari per poter instaurare questi processi memonici.

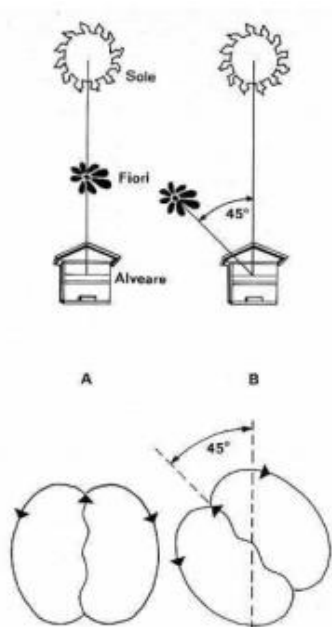


Figura 7 - <https://appuntidimiele.com/danza-delle-api-informazioni-utili>

Inoltre le api hanno più tipi di danze: una danza attraverso la quale comunicano la lunghezza

da percorrere per arrivare alla fonte di cibo, ad esempio se faranno una danza circolare diciamo che il cibo è in prossimità di più o meno 100 metri, mentre altro tipo di danza con oscillazioni dell'addome va ad indicare gli altri parametri, cioè la distanza in lunghezza in metri, l'ampiezza della fonte e l'angolo di partenza per partire dall'alveare, cioè in base alla direzione se ruoteranno verso destra o sinistra e in base all'ampiezza dell'angolo che formano perpendicolarmente al favo con il sole faranno capire la direzione. inoltre come già detto anche in precedenza le api sono in grado attraverso la loro memoria di creare delle scorciatoie aver ripetuto più di una volta il tragitto attraverso vari punti di riferimento (Figura 7).

L'apprendimento durante lo sviluppo. Nelle api l'elaborazione olfattiva non è un fenomeno statico, ma in funzione dell'età ed esperienza ed è soggetto a plasticità. Il sistema olfattivo rimane molto plastico per tutta l'età adulta: si può osservare che alcune regioni del cervello della ape cambia di volume in funzione dell'età e all'esperienza,^{28,29} ad esempio la densità dei complessi microglomerulari (Figura 4) olfattivi cambiano sia con l'età che con l'esperienza.

All'interno dell'alveare sono presenti molti odori quindi le api sono soggette a una costante stimolazione olfattiva a tutte le età attraverso ad esempio miele, il polline o i feromoni prodotti dalla regina. Uno dei primi studi svolti fa notare che un odore associato alla ricompensa del saccarosio quando le api hanno 5-8 giorni ha comportato una migliore ritenzione olfattiva nella fase adulta rispetto a quando la stessa esposizione è stata eseguita prima 1-4 giorni, questo ci fa capire quanto sia importante lo sviluppo giorno per giorno dell'ape. Recentemente è stato dimostrato uno specifico aumento del volume glomerulare in un sottoinsieme di glomeruli come risultato della formazione di una memoria olfattiva appetitiva a lungo termine dopo 72 ore³⁰. Quindi la plasticità indotta dall'apprendimento può assumere forme diverse in diversi momenti dopo l'evento associativo. Studi elettrofisiologici, di imaging funzionale o neuroanatomici trovano una forte plasticità neurale all'interno dei circuiti olfattivi, specialmente dopo il condizionamento associativo. Tuttavia, è spesso difficile mettere in relazione tale plasticità neurale con la sua esatta funzione, poiché i cambiamenti osservati sono legati a modifiche dell'elaborazione degli odori.

²⁸ Withers, G. S., Fahrbach, S. E., and Robinson, G. E. (1993). Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. *Nature* 364, 238–240.

²⁹ Ismail, N., Robinson, G. E., and Fahrbach, S. E. (2006). Stimulation of muscarinic receptors mimics experience-dependent plasticity in the honey bee brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 207–211.

³⁰ Hourcade, B., Perisse, E., Devaud, J. M., and Sandoz, J. C. (2009). Long-term memory shapes the primary olfactory center of an insect brain. *Learn. Mem.* 16, 607–615.

2 - L'azione dei pesticidi sul comportamento della apis m.

Il disorientamento è uno dei casi maggiori di moria delle api in tutto il mondo, questo va collegarsi con più fattori, come per esempio la varroa, l'elettrosmog ed i pesticidi. Quest'ultimi sono i più dannosi e pericolosi da un punto di vista neurologico per l'ape. Alcuni studi dimostrano come i neonicotinoidi ad esempio vanno ad incidere sullo sviluppo del ricordo dell'ape con conseguente non rientro all'arnia. Negli ultimi anni c'è stato un aumento nell'uso dei neonicotinoidi che sono insetticidi sistemici. Gli impollinatori possono essere influenzati negativamente dal consumo di nettare e polline contaminati da questi pesticidi ^{31,32}. Un numero crescente di studi sia di laboratorio che sul campo ha dimostrato che l'esposizione delle api a livelli appena al di sotto della dose letale di neonicotinoidi provoca cambiamenti nel comportamento che vanno ad incidere sulla sopravvivenza, compromissione dell'apprendimento e della memoria, navigazione interrotta e ridotta attività di foraggiamento^{33,34}. Inoltre, gli effetti dei neonicotinoidi possono essere sommati anche agli effetti di altri pesticidi, come i miticidi usati dagli apicoltori per combattere le infestazioni da *varroa* (ad esempio per quanto riguarda la competizione per gli enzimi metabolici).

Sia i neonicotinoidi che gli organofosfati, come il miticida cumaphos, mirano ai segnali colinergici, che comprendono la maggior parte della neurotrasmissione eccitatoria nel sistema nervoso centrale degli insetti. Gli organofosfati inibiscono l'acetilcolinesterasi (AChE), che disregola l'azione dell'ACh rilasciato sinapticamente a livello dei recettori nicotinici (nAChR) e muscarinici. I neonicotinoidi agiscono da agonisti del recettore nicotinico dell'acetilcolina (ACh). I corpi fungiformi sono una struttura cerebrale dell'insetto che mediano l'integrazione multisensoriale, l'apprendimento e la memoria, le funzioni cognitive che vengono interrotte dai neonicotinoidi. Tuttavia, l'effetto dell'attivazione prolungata dei nAChR da parte dei pesticidi colinergici sulla funzione KC non è noto. L'uso di pesticidi porta a paralisi delle ali, perdita di energia, spasmi nervosi e disorientamento, ed impediscono alle api il volo e quindi il ritorno in

³¹ Halm, M. P., Rortais, A., Arnold, G., Tasei, J. N. & Rault, S. . New risk assessment approach for systemic insecticides: the case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). Environ. Sci. Technol. 40, 2448–2454 (2006).

³² Cresswell, J. E. . A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. Ecotoxicology 20, 149–157 (2011).

³³ Belzunces, L. P., Tchamitchian, S. & Brunet, J. L. . Neural effects of insecticides in the honey bee. Apidologie 43, 348–370 (2012).

³⁴ Schneider, C. W., Tautz, J., Grunewald, B. & Fuchs, S. . RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. PLoS One 7, e30023 (2012)

alveare.

Tutto ciò si traduce in un lento e progressivo spopolamento dell'alveare fino ai casi più gravi, che consistono nella completa estinzione della colonia. Gli effetti degli insetticidi sul gusto dell'ape possono essere indagati studiando la modulazione della soglia gustativa, che può essere definita come la concentrazione più bassa di una soluzione di saccarosio applicato all'antenna in grado di suscitare un PER (riflesso dell'estensione della proboscide). Api trattate localmente con l'imidacloprid, un neonicotinoide inibitore in modo irreversibile del recettore nicotinico dell'acetilcolina negli insetti (mentre è molto meno attivo sul recettore dei mammiferi) mostra un aumento della soglia gustativa³⁵. Parte di questi risultati è in conflitto con l'azione della dei nicotinoidi, che provoca una rapida diminuzione della soglia di saccarosio dopo l'iniezione nei lobi antennali³⁶. Modifiche del comportamento delle api indotte dai pesticidi possono essere considerate come il risultato di combinazioni di cambiamenti che si verificano a livello neurologico ed a livello fisiologico. A livello neuronale, sembra ovvio che possano farlo gli insetticidi neurotossici compromettendo il corretto funzionamento delle cellule neuronali e soprattutto con ripercussioni sulle attività fisiologiche come la secrezione, l'attività muscolare, le funzioni cognitive, la respirazione e la digestione e soprattutto l'apprendimento. Tuttavia, l'azione degli insetticidi può essere esercitata attraverso un disturbo neuronale dei ricordi che regolano la vita delle api, ad esempio la valutazione della distanza e comunicazione. A livello fisiologico, il cambiamento del comportamento può derivare dall'incapacità delle api di raggiungere un'adeguata omeostasi metabolica o di regolare efficacemente le vie metaboliche in risposta ai cambiamenti ambientali oppure ai cambiamenti dell'attività fisiologica, come è stato indicato per l'ape mellifera e altre specie^{37,38}. Il foraggiamento controlla le risorse alimentari della colonia di api mellifere e, quindi, è strettamente importante riguardo il destino delle popolazioni di api mellifere. Pesticidi repellenti o antifeedant possono alterare il comportamento di foraggiamento delle api ed hanno effetti che durano a lungo, questi

³⁵ Lambin, M., Armengaud, C., Raymond, S., Gauthier, M. (2001) Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Arch. Insect Biochem. Physiol*

³⁶ Thany, S.H., Gauthier, M. (2005) Nicotine injected into the antennal lobes induces a rapid modulation of sucrose threshold and improves short-term memory in the honeybee *Apis mellifera*. *Brain Res*

³⁷ Bounias, M., Dujin, N., Popeskovic, D.S. (1985) Sublethal effects of a synthetic pyrethroid, deltamethrin, on the glycemia, the lipemia, and the gut alkaline phosphatases of honeybees. *Pestic. Biochem. Physiol*

³⁸ Ruzzin, J., Petersen, R., Meugnier, E., Madsen, L., Lock, E.-J., Lillefosse, H., Ma, T., Pesenti, S., Sonne, S.B., Marstrand, T.T., Malde, M.K., Du, Z.-Y., Chavey, C., Fajas, L., Lundebye, A.-K., Brand, C.L., Vidal, H., Kristiansen, K., Frøyland, L. (2009) Persistent Organic Pollutant Exposure Leads to Insulin Resistance Syndrome. *Environ. Health Perspect.*

indurranno uno stato di fame o di nutrizione carente sia dell'individuo che della colonia. I pesticidi possono anche agire interrompendo le funzioni neuronali, causando un'errata interpretazione degli stimoli. Questo può portare a una raccolta insufficiente di cibo e di conseguenza ad un'alterazione delle funzioni olfattive.

Gli effetti dei pesticidi sui muscoli degli insetti, in particolare delle api mellifere, ad esempio impediscono il raggiungimento di un volo coordinato e rendono l'individuo più vulnerabile al suo ambiente. Nel miele delle api, sono stati trovati per la prima volta sia un'insetticida, la deltametrina, che un fungicida, il procloraz^{39, 40}.

In uno studio che prese in esame il cuore, si vide che il procloraz e la deltametrina diminuiscono rapidamente la frequenza e la forza delle contrazioni cardiache. In questo studio, il procloraz appare più cardiotossico della deltametrina, e questo è molto sorprendente poiché la deltametrina è una sostanza neurotossica mentre il procloraz un inibitore e un induttore degli enzimi dei citocromi P450, che sono coinvolti nella disintossicazione da xenobiotici e metabolismo di sostanze endogene come gli steroidi. Il battito cardiaco dell'ape non è influenzato solo dagli insetticidi ma anche dall'erbicida fenossiacetico 2,4-D.

Al contrario, gli erbicidi triazinici contribuiscono al rilascio di neurotrasmettitori che si traduce in un aumento della frequenza e della forza di contrazioni cardiache⁴¹.

Inoltre i fungicidi e insetticidi possono produrre un'azione congiunta interagendo con gli stessi bersagli molecolari, come le ATPasi e i canali del potassio e del calcio, che sono particolarmente efficaci su parti neurali indotti nell'attività muscolare e nervosa^{42,43}.

L'attività neurale in uno o più neuroni misurati mediante imaging Ca^{2+} o registrazioni intracellulari o extracellulari consente di determinare i correlati neurali di molteplici forme di

³⁹ Colin, M.E., Belzunces, L.P. (1992) Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin in *Apis mellifera* L.—A convenient biological approach. *Pestic. Sci.* 36

⁴⁰ Vandame, R., Belzunces, L.P. (1998) Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation

⁴¹ Papaefthimiou, C., Zafeiridou, G., Topoglidi, A., Chaleplis, G., Zografou, S., Theophilidis, G. (2003) Triazines facilitate neurotransmitter release of synaptic terminals located in hearts of frog (*Rana ridibunda*) and honeybee (*Apis mellifera*) and in the ventral nerve cord of a beetle (*Tenebrio molitor*). *Comp. Biochem. Physiol.*

⁴² Abbadie, C., McManus, O.B., Sun, S.-Y., Bugianesi, R.M., Dai, G., Haedo, R.J., Herrington, J.B., Kaczorowski, G.J., Smith, M.M., Swensen, A.M., Warren, V.A., Williams, B., Arneric, S.P., Eduljee, C., Snutch, T.P., Tringham, E.W., Jochnowitz, N., Liang, A., MacIntyre, D.E., McGowan, E., Mistry, S., White, V.V., Hoyt, S.B., London, C., Lyons, K.A., Bunting, P.B., Volksdorf, S., Duffy, J.L. (2010) Analgesic effects of a substituted N-triazole oxindole (TROX-1). A state-dependent, voltagegated calcium channel 2 blocker. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*

⁴³ Li, H., Feng, T., Liang, P., Shi, X., Gao, X., Jiang, H. (2006a) Effect of temperature on toxicity of pyrethroids and endosulfan, activity of mitochondrial Na^{+} - K^{+} -ATPase and Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase in *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*

apprendimento associativo. L'apprendimento è una rappresentazione della conoscenza immagazzinata che può essere recuperata per operazioni mentali e controllo comportamentale. La neuroscienza contemporanea considera l'apprendimenti come immagazzinato nei cambiamenti duraturi della forza sinaptica in posizioni specifiche all'interno dei circuiti neurali che sono coinvolti in tutti gli aspetti della percezione, integrazione, elaborazione mentale e controllo motorio. Idealmente, si vorrebbe chiarire l'intera neurobiologia durante la formazione e l'attivazione della memoria, che richiede la risoluzione simultanea dell'attività all'interno di più strutture cerebrali con risoluzione subcellulare. Sebbene un approccio molto specifico non sia ancora possibile per l'ape, è stato ottenuta una prima analisi elettrofisiologica dell'apprendimento olfattivo mediante studi di imaging sui neuroni. Durante la fase di apprendimento, in cui le api vengono addestrate ad associare un particolare odore come stimolo condizionante con una ricompensa (stimolo incondizionato), più neuroni intrinseci hanno mostrato una plasticità sinaptica. Al contrario, quando le api sono esposte a un odore che non era accompagnato da una ricompensa, la maggior parte di queste strutture mostrava una diminuzione dell'attività. Questi considerazioni devono inoltre comprendere i processi di apprendimento che avvengono nel breve (corto) medio termine.

PROSPETTIVE FUTURE

La comunità di un alveare è dipendente dalla capacità di comunicare dei singoli individui. Una complessa rete di comunicazione avviene all'interno dell'alveare ad esempio il comportamento meglio noto è quello della danza waggle dove attraverso una comunicazione simbolica viene trasferita tra individui le informazioni relative ad esempio alla posizione di una area da bottinare nuova o già visitata. Particolare rilevante è l'elaborazione olfattiva che le api utilizzano per soddisfare non solo la ricerca del cibo, ma anche per la vita sociale e l'accoppiamento. L'*Apis mellifera* presenta comportamenti di apprendimento pavloviano e una complessa neurobiologia è stata osservata durante l'induzione di questo apprendimento. La mia tesi ha voluto descrivere alcuni processi di apprendimenti in particolare il riflesso incondizionato di estensione della proboscide (PER) e gli stimoli olfattivi. Inoltre la ricerca bibliografica ha voluto evidenziare che l'azione di alcuni inquinanti, chimici soprattutto, possono alterare il processo di plasticità sinaptica alla base dell'apprendimento pavloviano. Un'ipotesi che vorrei approfondire sperimentalmente è che il disorientamento delle api osservato possa derivare dall'alterazione di dei processi di apprendimenti di corto e medio termine che sono necessari per l'orientamento e la navigazione dell'insetto. Nello specifico sarebbe opportuno implementare esperimenti di elettrofisiologia e calcio imaging durante il processo di apprendimento a breve e medio termine in condizioni fisiologiche e durante il contatto acuto e cronico con agenti inquinanti come pesticidi, campi elettromagnetici etc. Purtroppo questo aspetto non è ancora pianamente investigato.

BIBLIOGRAFIA

- Abbadie, C., McManus, O.B., Sun, S.-Y., Bugianesi, R.M., Dai, G., Haedo, R.J., Herrington, J.B., Kaczorowski, G.J., Smith, M.M., Swensen, A.M., Warren, V.A., Williams, B., Arneric, S.P., Eduljee, C., Snutch, T.P., Tringham, E.W., Jochnowitz, N., Liang, A., MacIntyre, D.E., McGowan, E., Mistry, S., White, V.V., Hoyt, S.B., London, C., Lyons, K.A., Bunting, P.B., Volksdorf, S., Duffy, J.L. (2010) Analgesic effects of a substituted N-triazole oxindole (TROX-1). A state-dependent, voltagegated calcium channel 2 blocker. *J. Pharmacol. Exp. Ther*
- Abel, R., Rybak, J., and Menzel, R. (2001). Structure and response patterns of olfactory interneurons in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.*
- Barbara, G. S., Zube, C., Rybak, J., Gauthier, M., and Grunewald, B. (2005). Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol. A* 191, 823–836.
- Barbier, M., and Lederer, E. (1960). Structure chimique de la substance royale de la reine d'abeille *Apis mellifera* L. *C. R. Acad. Sci. Paris* 251, 1131–1135.
- Belzunces, L. P., Tchamitchian, S. & Brunet, J. L. . Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie* 43, 348–370 (2012).
- Bhagavan, S., and Smith, B. H. (1997). Olfactory conditioning in the honey bee *Apis mellifera*: effects of odor intensity
- Bicker, G. (1999). Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. *Microsc. Res. Tech.* 45, 174–183.
- Bounias, M., Dujin, N., Popeskovic, D.S. (1985) Sublethal effects of a synthetic pyrethroid, deltamethrin, on the glycemia, the lipemia, and the gut alkaline phosphatases of honeybees. *Pestic. Biochem. Physiol*
- Cano Lozano, V., Armengaud, C., Gauthier, M. (2001) Memory impairment induced by cholinergic antagonists injected into the mushroom bodies of the honeybee. *J. Comp. Physiol.*
- Colin, M.E., Belzunces, L.P. (1992) Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin in *Apis mellifera* L—A convenient biological approach. *Pestic. Sci.* 36
- Collins, A. M., and Blum, M. S. (1982). Bioassay of compounds derived from the honeybee sting. *J. Chem. Ecol.* 8, 463–470.

- Cresswell, J. E. . A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology* 20, 149–157 (2011).
- Deisig, N., Lachnit, H., Hellstern, F., and Giurfa, M. (2001). Configural olfactory learning in honeybees: negative and positive patterning discrimination
- Ditzen, M., Evers, J. F., and Galizia, C. G. (2003). Odor similarity does not influence the time needed for odor processing.
- Durst, C., Eichmüller, S., and Menzel, R. (1994). Development and experience lead to increased volume of subcompartments of the honeybee mushroom body. *Behav. Neural Biol.* 62, 259–263.
- Esslen, J., and Kaissling, K. E. (1976). Zahl und Verteilung antennaler Sensillen bei der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). *Zoomorphologie* 83, 227–251.
- Flanagan, D., and Mercer, A. R. (1989a). An atlas and 3-D reconstruction of the antennal lobes in the worker honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 18, 145–159.
- Fonta, C., Sun, X. J., and Masson, C. (1993). Morphology and spatial distribution of bee antennal lobe interneurons responsive to odours. *Chem. Senses* 18, 101–119.
- Frings, H. (1944). The loci of olfactory end-organs in the honey-bee, *Apis mellifera* Linn. *J. Exp. Zool.* 97, 123–134.
- Gascuel, J., and Masson, C. (1991). Developmental study of afferented and deafferented bee antennal lobes. *J. Neurobiol.* 22, 795–810
- Getz, W. M., and Smith, K. B. (1987). Olfactory sensitivity and discrimination of mixtures in the honeybee *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol*
- Giurfa, M. (2007). Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. *J. Comp. Physiol. A* 193, 801–824.
- Grünewald, B. (1999). Morphology of feedback neurons in the mushroom body of the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.* 404, 114–126.
- Goldberg, F., Grünewald, B., Rosenboom, H., Menzel, R. (1999) Nicotinic acetylcholine currents of cultured Kenyon cells from the mushroom bodies of the honey bee *Apis mellifera*. *J. Physiol*
- Halm, M. P., Rortais, A., Arnold, G., Tasei, J. N. & Rault, S. . New risk assessment approach for systemic insecticides: the case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). *Environ. Sci. Technol.* 40, 2448–2454 (2006).

- Hähnel, I., and Bicker, G. (1997). Glial patterning during postembryonic development of central neuropiles in the brain of the honeybee. *Dev. Genes Evol.* 207, 29–41.
- Hori, S., Takeuchi, H., Arikawa, K., Kinoshita, M., Ichikawa, N., Sasaki, M., and Kubo, T. (2006). Associative visual learning, color discrimination, and chromatic adaptation in the harnessed honeybee *Apis mellifera* L.
- Hosler, J. S., and Smith, B. S. (2000). Blocking and the detection of odor components in blends.
- Hourcade, B., Perisse, E., Devaud, J. M., and Sandoz, J. C. (2009). Long-term memory shapes the primary olfactory center of an insect brain. *Learn. Mem.* 16, 607–615.
- Strube-Bloss, M. F., Nawrot, M. P., and Menzel, R. (2011). Mushroom body output neurons encode odor-reward associations. *J. Neurosci.* 31, 3129–3140.
- Ismail, N., Robinson, G. E., and Fahrbach, S. E. (2006). Stimulation of muscarinic receptors mimics experience-dependent plasticity in the honey bee brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 207–211.
- Kaissling, K. E. (1987). *R. H. Wright Lectures on Insect Olfaction*. Burnaby, BC: Simon Fraser University.
- Keeling, C. I., Slessor, K. N., Higo, H. A., and Winston, M. L. (2003). New components of the honey bee (*Apis mellifera* L.) queen retinue pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4486–4491.
- Kelber, C., Rössler, W., and Kleineidam, C. J. (2006). Multiple olfactory receptor neurons and their axonal projections in the antennal lobe of the honeybee *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.* 496, 395–405.
- Kenyon, F. C. (1896). The brain of the bee – a preliminary contribution to the morphology of the nervous system of the Arthropoda. *J. Comp. Neurol.* 6, 134–210.
- Kirschner, S., Kleineidam, C. J., Zube, C., Rybak, J., Grunewald, B., and Rössler, W. (2006). Dual olfactory pathway in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.* 499, 933–952.
- Knudsen, J. T., Tollsten, L., and Bergström, L. G. (1993). Floral scents – a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques.
- Li, H., Feng, T., Liang, P., Shi, X., Gao, X., Jiang, H. (2006a) Effect of temperature on toxicity of pyrethroids and endosulfan, activity of mitochondrial Na⁺-K⁺-ATPase and

Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase in *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). Pestic. Biochem. Physiol

- Lambin, M., Armengaud, C., Raymond, S., Gauthier, M. (2001) Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. Arch. Insect Biochem. Physiol
- Laska, M., Galizia, C. G., Giurfa, M., and Menzel, R. (1999). Olfactory discrimination ability and odor structure-activity relationships in honeybees.
- Linster, C., and Smith, B. H. (1997). A computational model of the response of honey bee antennal circuitry to odor mixtures: overshadowing, blocking and unblocking can arise from lateral inhibition.
- Marstrand, T.T., Malde, M.K., Du, Z.-Y., Chavey, C., Fajas, L., Lundebye, A.-K., Brand, C.L., Vidal, H., Kristiansen, K., Frøyland, L. (2009) Persistent Organic Pollutant Exposure Leads to Insulin Resistance Syndrome. Environ. Health Perspect.
- Masson, C., and Arnold, G. (1984). Ontogeny, maturation and plasticity of the olfactory system in the workerbee. J. Insect Physiol. 30, 7–14.
- Masson, C., and Mustaparta, H. (1990). Chemical information processing in the olfactory system of insects. Physiol. Rev. 70, 199–245.
- Mobbs, P. G. (1982). The brain of the honeybee *Apis mellifera* I. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B 298, 309–354.
- Mobbs, P. G. (1984). Neural networks in the mushroom bodies of the honeybee. J. Insect Physiol. 30, 43–58
- Mota, T., Giurfa, M., and Sandoz, J. C. (2011). Color modulates olfactory learning in honeybees by an occasion-setting mechanism.
- Okada, R., Sakura, M., and Mizunami, M. (2003). Distribution of dendrites of descending neurons and its implications for the basic organization of the cockroach brain. J. Comp. Neurol. 459, 158–174.
- Papaefthimiou, C., Zafeiridou, G., Topoglidi, A., Chaleplis, G., Zografou, S., Theophilidis, G. (2003) Triazines facilitate neurotransmitter release of synaptic terminals located in hearts of frog (*Rana ridibunda*) and honeybee (*Apis mellifera*) and in the ventral nerve cord of a beetle (*Tenebrio molitor*). Comp. Biochem. Physiol.

- Pham-Delègue, M. H., Masson, C., Etiévant, P., and Azar, M. (1986). Selective olfactory choices of the honeybee among sunflower aromas: a study by combined olfactory conditioning and chemical analysis.
- Rybak, J., and Menzel, R. (1993). Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain: the neuronal connections of the alpha-lobe. *J. Comp. Neurol.* 334, 444–465.
- Ruzzin, J., Petersen, R., Meugnier, E., Madsen, L., Lock, E.-J., Lillefosse, H., Ma, T., Pesenti, S., Sonne, S.B.,
- Sachse, S., Peele, P., Silbering, A. F., Guhmann, M., and Galizia, C. G. (2006). Role of histamine as a putative inhibitory transmitter in the honeybee antennal lobe. *Front. Zool.* 3:22. doi:10.1186/1742-9994-3-22
- Sandoz, J. C., Laloi, D., Odoux, J. F., and Pham-Delègue, M. H. (2000). Olfactory information transfer in the honeybee: compared efficiency of classical conditioning and early exposure
- Schäfer, S., and Bicker, G. (1986). Distribution of GABA-like immunoreactivity in the brain of the honeybee. *J. Comp. Neurol.* 246, 287–300.
- Schneider, D., and Steinbrecht, R. A. (1968). Checklist of insect olfactory sensilla. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 23, 279–297
- Schneider, C. W., Tautz, J., Grunewald, B. & Fuchs, S. . RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS One* 7, e30023 (2012)
- Shearer, D. A., and Boch, R. (1965). 2-heptanone in the mandibular gland secretion of the honey-bee. *Nature* 206, 530.
- Slessor, K. N., Winston, M. L., and Le Conte, Y. (2005). Pheromone communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. Chem. Ecol.* 31, 2731–2745
- Smith, B. H., and Menzel, R. (1989). The use of electromyogram recordings to quantify odourant discrimination in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.*
- Strausfeld, N. J. (2002). Organization of the honey bee mushroom body: representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. *J. Comp. Neurol.* 450, 4–33.
- Suzuki, H. (1975). Convergence of olfactory inputs from both antennae in the brain of the honeybee. *J. Exp. Biol.* 62, 11–26.

- Thany, S.H., Gauthier, M. (2005) Nicotine injected into the antennal lobes induces a rapid modulation of sucrose threshold and improves short-term memory in the honeybee *Apis mellifera*. *Brain Res*
- Touhara, K., and Vosshall, L. B. (2009). Sensing odorants and pheromones with chemosensory receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 307–332
- Vandame, R., Belzunces, L.P. (1998) Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation
- Vareschi, E. (1971). Duftunterscheidung bei der Honigbiene – Einzelzell-Ableitungen und Verhaltensreaktionen. *Zeit. Vergl. Physiol.* 75, 143–173.
- Whitlow, J. W., and Wagner, A. R. (1972). Negative patterning in classical conditioning: summation of response tendencies to isolable and configural components. *Psychon*
- Withers, G. S., Fahrbach, S. E., and Robinson, G. E. (1993). Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. *Nature* 364, 238–240.
- Wright, G. A., Carlton, M., and Smith, B. H. (2009). A honeybee's ability to learn, recognize, and discriminate odors depends upon odor sampling time and concentration.
- Pickett, J. A., Williams, I. H., and Martin, A. P. (1982). (Z)-11-eicosen-1-ol, an important new pheromonal component from the sting of the honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). *J. Chem. Ecol.* 8, 163–175..