T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Formica clara Forel, 1886 (Hymenoptera, Formicidae) İŞÇİLERİNDE MaLER YANIT TEMELLİ OLFAKTORİYAL KOŞULLANDIRMA

KUBİLAY DUYMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. VOLKAN AKSOY

EDİRNE – 2021

KUBİLAY DUYMAZ'ın hazırladığı "***Formica clara* Forel, 1886 (Hymenoptera, Formicidae) İşçilerinde MaLER Yanıt Temelli Olfaktoriyal Koşullandırma**" başlıklı tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından **Biyoloji Anabilim Dalında** bir **Yüksek Lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Unvan, Ad, Soyad) İmza

Doç. Dr. Volkan AKSOY (Danışman) …….

Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE …….

Prof. Dr. Ahmet DURSUN …….

Tez Savunma Tarihi: 11/02/2021

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Doç. Dr. Volkan AKSOY ……

Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Doç. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

11/02/2021

Kubilay Duymaz

İmza

Yüksek Lisans Tezi

Formica clara Forel, 1886 (Hymenoptera, Formicidae) İşçilerinde MaLER Yanıt Temelli Olfaktoriyal Koşullandırma

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu tez çalışmasında, *Formica clara* türü karınca işçilerinin laboratuvar ortamında kurulan bir düzenek kullanılarak 2 farklı koku uyaranı (limonen ve eugenol) (koşullu uyaranlar) ile bir besin ödülü (sukroz çözeltisi - koşulsuz uyaran) arasında koşullu bir ilişki kurma temeline dayalı öğrenme performanslarının test edilmesi amaçlanmıştır. Karıncaların öğrenme performanslarının bir göstergesi olarak ağız organlarından maksilla ve labiumlarının dışarıya çıkarılması davranışı (MaLER yanıt) kullanılmıştır.

Doğadan alınarak laboratuvar ortamına getirilen *F. clara* işçileri tutsak koşullarda koşullu ve koşulsuz uyaranlar arasında bir ilişki kurmaları yönünde bireysel olarak eğitilmiş ve 3 kez ard arda koşullu yanıt verme olarak belirlenen başarı kriterini sağladıktan sonra besin ödülü olmaksızın kullanılan limonen ve eugenol varlığında MaLER yanıt performansları için test edilmişlerdir. Testler, son koşullanma eğitimini takiben 15, 60 ve 90. dakikalarda gerçekleştirilerek karıncaların kısa süreli koku hafızaları olup olmadığı test edilmiştir.

Sonuçlar karıncaların hem limonen hem de eugenol varlığı ile besin ödülü arasında hızlı bir şekilde başarılı bir ilişki kurduklarını göstermiştir. Eğitim süreci ardından 15. ve 60. dakikalarda gerçekleştirilen hafıza testlerinde karıncaların MaLER+ yanıtları, limonen kullanılan deneylerde görece olarak daha az olsa da, yüksek çıkmıştır. 90. dakikadaki 3. hafıza testinde ise her iki grupta da MaLER+ ve MaLER- yanıtların frekansı arasındaki fark anlamsız hale gelmiştir. Limonen ve eugenolun kullanıldığı

karınca gruplarındaki denek karıncalar 60. dakika sonrasında diğer grubun kimyasalı ile de test edilmişlerdir. Bu çapraz kontrol testlerinde her bir gruptaki karıncalar diğer grubun koşullandırma uyaranına karşı MaLER+ yanıt vermemişlerdir. Bu durum karıncaların kullanılan koku uyaranlarını mutlak öğrendiklerini, ortaya çıkan koşullanmalarda bir uyaran genellemesi yapılmadığını ortaya koymuştur.

Yıl : 2021

Sayfa Sayısı : 67

Anahtar Kelimeler : *Formica clara*, ilişkili öğrenme, MaLER yanıt, kısa süreli hafıza, klasik koşullanma.

Master Thesis

MaLER Response Based Olfactorial Conditioning in Formica clara Forel, 1886 (Hymenoptera, Formicidae) Workers

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biology

ABSTRACT

In this study, olfactorial associative learning performances of workers of the ant *Formica clara* were tested in laboratory conditions based on a conditional relationship between 2 different odor stimuli (limonene and eugenol) (conditional stimuli) and a nutritional award (sucrose solution - unconditional stimulus). As an indicator of the learning performances of the ants, the maxilla and labium extension response (MaLER response) was used.

Ants taken from the field and brought to the laboratory were individually trained in harnessed conditions to form an association between the conditioned and unconditioned stimuli and tested for their MaLER responses, after meeting the criteria of positively responding to the associations for three consecutive trials during conditioning, in the presence of conditioned stimuli alone. Short term olfactorial memories of the ants were tested with tests performed on 15, 60 and 90^{th} minutes following the last conditioning trial.

The results showed that ants formed a rapid and strong association between the food reward and limonene and eugenol. The MaLER + responses were significantly high, although relatively low for limonen, during the first 2 memory retention tests. However, the frequencies of MaLER + and MaLER- responses in the last retention test on the 90^{th} minute were not significantly different from each other. Ants of one conditioning group did not positively respond to the conditioned stimulus of the other

group in the generalization tests showing that ants showed an absolute learning outcome for the conditioned stimuli and did not generalize between the two stimuli.

Year : 2021

Number of Pages : 67

Anahtar Kelimeler : *Formica clara*, associative learning, MaLER response, short term memory, classical conditioning.

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitim sürecimde çok dersini aldığım ve almaya da devam ettiğim, akademik ve sosyal yönden çok desteğini hissettiğim, çok iyi bir insan olmasının yanında çok da iyi bir akademisyen olan, bilgi ve birikimlerini özgün bir biçimde yansıtan, kalbi temiz yüzü güler ve sonsuz saygı duyduğum sevgili danışmanım sayın Doç. Dr. Volkan AKSOY'a, bu tezin başlangıcında devamında ve bitiminde bana yol gösterdiği, o yolda hep yanımda olduğu ve desteğini hiçbir zaman esirgemediği için sonsuz teşekkür, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tezde kullandığım karınca türünün teşhisinde yardımcı olan ve okul hayatımda aldığım derslerde hocalık yapıp bilgi ve birikimimi arttıran sayın Prof. Dr. Kadri KIRAN'a ve Doç. Dr. Celal KARAMAN'a çok teşekkür ederim.

Tezde kullanılan kimyasal uyaranların temin edilmesinde yardımı dokunan sayın Ali ÇOKDOĞRU ve İlke ÖZYURT'a teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitim sürecinde tanıştığım ve hem seminer hem de tezimde büyük yardımları dokunan, beni kimi zaman yüreklendirip kimi zaman teşvik eden arkadaşlarım sevgili Nermin TOPTAŞ, Özge GEMİK, Hazal Nurcan AĞIRMAN ve Burak ÇAĞLA'ya çok teşekkür ederim.

Süre gelen öğrencilik hayatımın tamamında madden ve manen yanımda olup sevdiğim bölümü okumamda destek çıkan aileme saygı, teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv
ABSTRACT vi
TEŞEKKÜR viii
İÇİNDEKİLER ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xi
ŞEKİLLER DİZİNİ xii
BÖLÜM 1 1
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2 7
GENEL BİLGİLER 7
2.1. Böceklerde Sinir Sistemi 7
2.2. Pavlov'un Klasik Koşullandırması 9
2.3. Deniz Tavşanları 10
2.4. Sülükler 11
2.5. Hamamböcekleri 13
2.6. Meyve Sinekleri 17
2.7. Bal Arılarında PER Yanıtı 18
2.8. Bal Arılarında SER Yanıtı 22
2.9. Karıncalar 25
2.10. MOR Yanıtı 29
BÖLÜM 3 34
MATERYAL VE METOT 34

3.1. Denek Karıncalar 34
3.2. Denek Karıncaların Hazırlanması 35
3.3. Deneysel Yöntem 36
3.3.1. Koşullanma 36
3.3.2. Testler 39
3.4. Verilerin Analizi 40
BÖLÜM 4 41
SONUÇLAR 41
BÖLÜM 5 44
TARTIŞMA 44
KAYNAKLAR 48
ÖZGEÇMİŞ 53
TEZ İLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER 54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°	: derece
V	: volt
mA	: Miliamper
Hz	: Hertz
dB	: Desibel
STM	: Kısa süreli bellek (short-term memory)
LTM	: Uzun süreli bellek (long-term memory)
NS	: Nötral uyaran (neutral stimulus)
US	: Koşulsuz uyaran (unconditioned stimulus)
UR	: Koşulsuz yanıt (unconditioned response)
CS	: Koşullu uyaran (conditioned stimulus)
CR	: Koşullu yanıt (conditioned response)
PER	: Hortum uzatma yanıtı (proboscis extension response)
SER	: İğne uzatma yanıtı (sting extension response)
MOR	: Mandibul açma yanıtı (mandible opening response)
MaLER	: Maksilla-labium uzatma yanıtı (maxilla-labium extension response)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. *Aplysia californica*'nın verdiği kaçma yanıtı (bir adım).....11
Şekil 2.2. İki farklı NS uygulanması sonucu *Macrobdella ditetra* bireylerinin verdiği yanıtlar.....12
Şekil 2.3. Denek olarak seçilen bir hamamböceğinin tutsak hali 14
Şekil 2.4. Deneyde kullanılan şırınga ve hamamböceğinin konumu 15
Şekil 2.5. Koşullanma öncesinde denek bireylerin nane kokusu tercihleri.....15
Şekil 2.6. Hamamböceklerinin koşullanma testlerinden sonra koku uyaranları arasındaki tercih profilleri 16
Şekil 2.7. Eşleştirilmiş ve eşleştirilmemiş grupların sadece ses uyaranı varlığında verdiği yanıtlar 18
Şekil 2.8. Refleksif bir beslenme davranışı olan PER yanıtı 19
Şekil 2.9. Takeda'nın çalışma sonuçları 20
Şekil 2.10. Bal arılarında yapılan koku genelleme testlerinin sonuçları.....21
Şekil 2.11. Deneysel düzeneğe alınan arının pozisyonu 23
Şekil 2.12. Eşleştirilmiş ve eşleştirilmemiş grupların sadece koku varlığında olan SER yanıtları 24
Şekil 2.13. SER ve PER yanıtlarının ilişkilendirildikleri kokularla sunulduğu zaman oluşan grafikler.....24
Şekil 2.14. Tek bir koku uyaranının kullanıldığı koşullanma eğitimi ve test aşamalarında denek *Camponotus aethiops*'ların verdikleri yanıtlar.....25
Şekil 2.15. Koşullanma aşamasında iki koku karışımı, test aşamasında tek bir koku uyaranı kullanılan denek *Camponotus aethiops*'ların verdikleri yanıtlar.....26
Şekil 2.16. Koşullandırma aşamasında tek bir koku uyaranı ve test aşamasında iki koku karışımı kullanılan denek *Camponotus aethiops*'ların verdikleri yanıtlar.....27
Şekil 2.17. *Camponotus fellah* türü karıncaların eğitim ve deneme aşamalarında verdiği yanıtlar.....28
Şekil 2.18. Karıncaların mandibül çeşitliliği.....29
Şekil 2.19. Karıncanın deney sırasındaki durumu ve MOR yanıtı 30
Şekil 2.20. Denek karınca türlerinin verilen kutikular uyaranlar sonucunda MOR yanıtları 31
Şekil 2.21. *Camponotus aethiops* işçisinin sabitlenmiş hali 32

Şekil 2.22. Güçlendirilmiş ve güçlendirilmemiş gruplardaki karınca işçilerinin verdiği yanıtlar.....33
Şekil 2.23. Eğitimden 10 dakika sonra yapılan testlerde karıncaların eşleştirildikleri ve yeni kokuya verdikleri yanıtlar 33
Şekil 3.1. Karıncaların deney boyunca tutsak kaldıkları taşıyıcılar.....36
Şekil 3.2. Koşullu uyaran olarak kullanılan kimyasalların 2D kimyasal yapıları.....38
Şekil 3.3. Çalışmaların yapıldığı deneysel düzenek 39
Şekil 4.1. Limonen koşullandırması öğrenme eğrisi.....41
Şekil 4.2. Limonen koşullandırması sonrasında karıncaların (n=38) koku hafızası ve koku genellemesi testlerinde sergiledikleri MaLER + yanıt frekansları.....42
Şekil 4.3. Eugenol koşullandırması öğrenme eğrisi.....42
Şekil 4.4. Eugenol koşullandırması sonrasında karıncaların (n=16) koku hafızası ve koku genellemesi testlerinde sergiledikleri MaLER + yanıt frekansları.....43

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Öğrenme, hayvanların davranışlarında deneyimlere bağlı olarak meydana gelen değişim olarak tanımlanmaktadır ve yüksek organizasyonlu omurgalı canlıların yanı sıra aşağı organizasyonlu omurgasızlarda da görülen bir davranıştır (Pearce, 2013). Öğrenme bir hayvanın hayatını birçok açıdan kolaylaştıran evrimsel bir strateji olmasının yanı sıra beslenme, barınma, üreme, predatörlerinden korunma gibi olaylardan bilişsel bir şekilde faydalanmasını da sağlar.

Çoğu omurgasız organizmada olduğu gibi böcekler de robotik olarak davranan, çevresel uyaranlara karşı doğuşsal ve değişmeyen davranışsal yanıtlar veren canlılar olarak düşünülmüşlerse de özellikle bal arısı (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) ile başlayan ve sosyal ya da soliter pek çok böcek grubuna yayılan öğrenme temelli çalışmalar öngörülenin aksine böcek öğrenme başarısının hatırı sayılır derecede yüksek olduğunu göstermiştir (Hollis ve Guillette 2011). Böceklerle ve diğer canlı gruplarıyla yapılan bu çalışmalarda araştırmacılar, özellikle de sinirbilimciler arasında "öğrenme sinir sistemlerinin ortak bir özelliği olabilir, dolayısıyla sinir sistemine sahip her hayvan öğrenebilir" görüşünün kabulüne yol açmıştır. Ancak yine de öğrenme hızı, öğrenmenin meydana geldiği yaşam evresi, öğrenilen koşul ve öğrenmeye yapılan sinirsel yatırım gibi özellikler bakımından organizmalar arasında büyük farklılıklar söz konusudur. Diğer taraftan, bu farklılıklara rağmen, pek çok hayvan grubu için ortak sayılabilecek bir öğrenme şekli vardır ki bu da ilişkili öğrenmedir (Dickinson, 2012). Aslında son dönemde yapılan çalışmalar böceklerin bir uyaran ile bir yanıt arasında ilişki kurmadan

daha fazlasını yapabildiklerini göstermiştir. Daha çok bal arıları (Giurfa, 2003; Horridge 2009), meyve sinekleri (*Drosophila melanogaster*) (Mery ve Kawecki 2005), yaban arıları (Tibbetts ve Sheehan, 2013), bombus arıları (Telles, Corcobado, Trillo & Rodrigues-Girones, 2017) ve karıncalar (Camlitepe ve Aksoy, 2010; Camlitepe, Aksoy, Üren, Yilmaz & Becenen, 2005; Graham, Philippides & Baddeley, 2010) ile yapılan bu çalışmalarda böceklerin çoklu uyaranlar arasında ayırım yapabildikleri, öğrendikleri bilgiyi kısa ya da uzun zaman periyotlarında hafızalarında tutabildikleri, öğrendikleri bilgiyi tamamen yeni koşullara transfer edebildikleri ve genelleme yapabildikleri gösterilmiştir.

Böceklerde öğrenme ve hafıza ile ilgili çalışmaların çoğu Pavlov ile anılmaya başlanan ve klasik koşullanma olarak bilinen basit ilişkili öğrenme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Klasik koşullanmada hayvanlar belirli bir davranışın ortaya çıkmasına neden olan koşulsuz bir uyaran ile bu davranış ile biyolojik açıdan bir ilişkisi olmayan nötral bir uyaran arasında ilişki kurmayı öğrenirler. Son dönemde yeni tekniklerle yapılan çalışmalar neticesinde bu basit ilişkili öğrenme kapsamı dışına çıkılabilmiş ve daha çok bilişsel öğelere odaklanan çalışmaların yapılması mümkün olabilmiştir (Avarguès-Weber, Deisig & Giurfa, 2011; Chittka ve Niven, 2009). Örneğin bal arıları ve meyve sineklerindeki "dikkat" içerikli çalışmalar, arılarda, çekirgelerde ve sineklerde sosyal ilişkilerde görülen gözlemsel öğrenme (Battesti, Moreno, Joly & Mery, 2012; Coolen, Dangles & Casas, 2005; Leadbeater ve Chittka, 2005), yaban arılarında bireysel tanıma (Sheehan ve Tibbetts, 2011) ve arılarda kategorizasyon (Benard, Stach & Giurfa, 2006) ve koşul öğrenme (Giurfa, Zhang, Jennet, Menzel & Srinivadan, 2001) çalışmaları bu tarz bilişsel içerikli çalışmalardır. Her ne kadar bu tarz çalışmalar klasik ilişkili öğrenme çalışmalarına göre görece olarak daha üstün olarak görülebilseler de uyguladıkları davranışsal teknikler ilişkili öğrenme tekniklerinden çok da farklı değildir. İlişkili öğrenme başarısının böceklerin uyum güçlerine katkısı açıktır. Ekolojik olarak önemli uyaranlara karşı verilecek ilişkili öğrenme temelli de olabilen yanıtlar ile böcekler bulundukları ortamlarda yeni ve öngörülebilir ilişkilere uyum sağlamak amacıyla davranışsal yanıtlarını değiştirebilirler (Smith ve Burden 2014). Davranışsal esneklik olarak ele alınabilecek bu uyumsal yeteneğin incelenmesinde ilişkili öğrenme yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır.

Böceklerde klasik koşullandırma ile ilgili çok sayıda teknik tanımlanmış ve kullanılmıştır. Örneğin, *Apis mellifera*'da elemental klasik koşullanma ve ilgili nöral yapıların belirlenmesi amacıyla Proboscis Extension Response (PER) olarak bilinen yanıtın olfaktoriyal koşullandırması çalışmaları sıklıkla kullanılmıştır (Giurfa ve Sandoz 2012). Bu koşullandırmada bireysel olarak tutsak hale getirilmiş arılar antenlerine uygulanan bir besin uyaranına (koşulsuz uyaran) ağız aletlerini dışarıya çıkarmak suretiyle (PER) yanıt verirler. Eğer bir koku uyaranı (koşullu uyaran) bir besin ödülü ile ilişkilendirilirse arılar koku ile besin ödülü arasında bir ilişki kurmayı öğrenirler ve bu ilişkiyi takiben tek başına verildiğinde dahi koku uyaranına karşı koşullu bir PER yanıt sergilerler. Uyaranlar arasında oluşturulan eşleştirme deneme sayısı, uyaranların sunulması arasındaki zamansal fark, denemeler arasındaki zamansal fark gibi çeşitli etkenlere bağlılık göstermektedir (Giurfa ve Sandoz 2012). Tek bir koşullanma ile ortaya çıkan hafıza (zayıf eğitim) zaman içinde yok olur, bu nedenle translasyon ve transkripsiyon süreçlerinden bağımsızdır ve bellek yitirici uygulamalara karşı hassastır (Menzel, 1999). Eşleştirme denemelerinin tekrarı (aralarında 10 dakika olacak şekilde en azından 3 deneme) ise daha stabil ve uzun süreli (> 7 gün), translasyon ve transkripsiyon gerektiren ve bellek yitirici uygulamalardan etkilenmeyen bir hafıza oluşumuna yol açmaktadır.

Arılarda koşullu-koşulsuz uyaranlar arasındaki zamansal aralık ne kadar kısa ise öğrenmenin de o derece etkili bir şekilde gerçekleştiği bilinmektedir ve PER yanıtı için optimal uyaran aralığının 1-3 saniye olduğu tespit edilmiştir (Menzel ve Bittermann, 1983). Bal arısındaki olfaktoriyal koşullanmada antennal lobların ve mantar cisimciğinin rol aldığı bilinmektedir (Caron ve Abbott, 2017). Karıncalarda da mantar cisimciğinin koku ile ilişkili davranışlarda aracı olduğu tespit edilmiştir (Heisenberg 1998). *Camponotus floridanus*'da pupal evreden erginliğe geçişte sahip olunan mantar cisimciği hacminin yaklaşık 10 aylık bir süre içinde yaşlı işçi karıncalarda yaklaşık %50 oranında artış gösterdiği tespit edilmiştir ki bu durum karıncalarda olfaktoriyal temelli davranışlara bağlı sinirsel bir esneklik olduğunun güzel bir kanıtıdır (Gronenberg, Heeren & Hölldobler, 1996).

Sosyal böcekler arasında bal arılarından sonra davranışsal anlamda üzerinde en çok çalışma yapılmış diğer grup karıncalardır. Karıncaların doğal ortamdaki yuva dışı gezileri esnasında feromon temelli koku izi takibi, görsel bilgi kullanımı, polarize ışık

oriyentasyonu, renkli görme, manyetik alan duyarlılığı ve vektörel oriyentasyon gibi çeşitli duysal elemanların iş gördüğü mekanizmaları işlettikleri bilinmektedir (Aksoy ve Çamlıtepe, 2018). Karıncaların bilişsel yetenekleri ile laboratuar ortamında gerçekleştirilmiş çalışmalar da bulunmaktadır ve bu çalışmalarda ele alınan bir özellikleri kimyasal koku hafızalarıdır (Josens, Eschbach, & Giurfa, 2009). Bu çalışmalar neticesinde araştırıcılar arılar için PER koşullanması için kullanılan yöntemi karıncalara da uyarlamak istemiş ve maxilla-labium extension response (MaLER) olarak adlandırılan yanıta dayalı bir yöntem ortaya çıkarılmıştır. MaLER yanıt ilk olarak *Camponotus aethiops* türü karıncada test edilmiştir (Guerrieri ve d'Ettorre, 2010). Araştırıcılar tutsak olarak laboratuar ortamındaki düzeneklerinde işçi karıncaları besin ödülü ve iki koku uyaranı (oktan-1-ol ve hekzanal) arasında bir ilişki kurma yönünde eğitmişler ve besin ödülünün olmadığı test koşullarında eğitimde kullanılan koku uyaranlarına karşı MaLER+ yanıtlar verdiklerini tespit etmişlerdir. Yaklaşık 6 ardışık ilişkilendirme denemesi neticesinde karıncalar besin ödülü ile bir koku arasında ilişki kurabilmiştir. Koku uyaranlarının ayrı ayrı kullanıldığı bu mutlak koşul eğitimi aşamasında karıncaların eğitimdeki koku uyaranına verdikleri MaLER yanıt diğer kokuya verdikleri yanıttan belirgin şekilde daha fazla olmuştur. Kokulardan bir tanesinin besin ödülü diğerinin ise quinine ile ilişkilendirildiği ikili ayırım koşullarında eğitildiklerinde de karıncaların uyaranlar arasında ayırım yaparak MaLER yanıt başarısı sergiledikleri tespit edilmiştir. Her iki deneysel koşulda da karıncaların ilişkili öğrenme neticesinde elde ettikleri hafıza en azından 1 saat süre ile devam etmiştir. *Camponotus aethiops* ile yapılan ve karıncaların MaLER yanıtlarına dayalı diğer bir çalışmada ise araştırıcılar test ettikleri karıncaların bireysel özelliklerinin öğrenme performanslarını etkilediği tespit edilmiştir (Udino, Perez, Carere, & d'Ettorre, 2017). Deneylerde kullanılan karıncalar araştırma davranışı, girişkenlik ve saldırganlık davranışları bakımından test edilerek kişisel özellikleri belirlenmiştir. Bitkisel kaynaklı iki koku uyaranı (oktanol ve hekzanol) kullanılarak gerçekleştirilen koşullandırma deneylerinde aktif olarak araştırma davranışı sergileyen karıncaların koku öğrenme konusunda inaktif karıncalara göre daha yavaş oldukları tespit edilmiştir. Dolayısıyla, en azından karıncalar için, kolonideki farklı davranış modellerine sahip bireylerin bilişsel farklılıklar da sergileyebilecekleri öngörülebilir. MaLER yanıt karıncaların sadece kimyasallara karşı sergiledikleri koşullu bir yanıt değildir. Örneğin *Formica rufa*'da

karıncaların görsel bir ipucu ile şekerli besin ödülü arasında ilişki kurarak MaLER yanıt verebildiği tespit edilmiştir (Fernandes, Buckley & Niven, 2018). Elde edilen sonuçlar bu türde kısa süreli (10 dakika) ve orta uzunluktaki (1 saat) hafızalarının geri çağrılması konusunda analiz yapılmasına da olanak tanımıştır. MaLER temelli olmasa da görsel ilişkili öğrenme çöl karıncası türlerinden olan *Cataglyphis fortis* ve *Melophorus bagoti*'de de test edilmiştir (Schwarz ve Cheng, 2010).

MaLER yanıt temelli ilişkili öğrenme çalışmaları laboratuar koşullarında ve tutsak karıncalarla yapılmak durumunda olduğu için karıncaların doğal ortam ekolojik koşullarındaki yanıtlarını temsil etmemesi ve tutsaklığın getireceği dezavantajlar nedeniyle eleştirilere açık bir yöntem olarak görülebilir. Ancak, iki uzak akraba karınca türü (*F. podzolica* ve *Tapinoma sessile*) ile doğal ortamda yapılan bir besin-bitki kaynaklı koku ilişkilendirmesi deneyinde iki karınca türünün de öğrenme konusunda yüksek performans sergiledikleri belirlenmiştir (Nelson, Zapata, Sentner & Mooney, 2020). Kullanılan bitki kaynaklı koku uyaranlarının da uzak akraba bitkisel taksonlardan elde edilmiş olması da göz önüne alındığında, koku temelli ilişkili öğrenmenin karıncalarda yaygın olabileceği akla gelmektedir.

İlişkili öğrenme çalışmaları neticesinde böcek öğrenme ve hafıza yeteneklerine ilişkin olarak bilinenler büyük oranda bal arıları ile yapılan çalışmalar neticesinde elde edilmiş olsa da başka model organizmaların kullanımı ile böceklerde öğrenme konusunda yeni bilgilerin elde edilebileceği ortadadır. Ekolojik gereksinimleri ve yaşam tarihleri farklı gruplarda hali hazırda kullanılan yöntemlerin modifikasyonu ile elde edilecek yeni deneysel teknikler kullanılarak yapılacak deneyler öğrenme ve hafıza ve böceklerdeki yaygınlığı konusunda önemli veriler ortaya koyacaktır. Öğrenmenin sınırlarının olmadığını gösteren, kısa ve uzun süreli bellek çalışmaları üzerine yeni bulgular ortaya koyan, uyaranlar arasında yapılan seçime farklı bir yaklaşım getiren ve yeni bir bilimsel terimi literatüre kazandırmış olması açısından MaLER yöntemi uygulama kolaylığı ve türe özgü küçük değişikliklere açık olması bakımından kullanışlı bir tekniktir. *Formica* cinsi karıncalar günümüze kadar çok sayıda davranışsal çalışmada kullanılmış ve feromon kullanımlarından renkli görme yeteneklerine, manyetik alan duyarlılıklarında idiyotetik yön bulma kapasitelerine ve görsel bilgi kullanımı kabiliyetlerine kadar çok çeşitli duysal özellikleri ortaya konmuştur. Her ne kadar gündüz aktif türleri içermesi bakımından ağırlıklı olarak görsel bilgiye dayalı bir

yuva dışı yön bulma mekanizması işlettikleri öngörülse de alarm, yuvadaş tanıma ve saldırganlık konularında sergiledikleri etkili koku duyarlılıkları bu cins üyelerini de koku içerikli öğrenme çalışmalarında kullanılabilecek potansiyel organizmalar yapmaktadır. Bu veriler ışığında bu tez çalışmasında *Formica clara* türü karınca işçileri laboratuar ortamında kurulan bir düzenekteki aynı karbon sayısına sahip ve bitki kökenli limonen ve eugenol kimyasalları ile bir besin ödülünü ayrı ayrı ilişkilendirmeleri yönünde eğitilerek test edilmişlerdir. Eğitim sürecini takip eden 15, 60 ve 90. dakikalarda yapılan testler ile karıncaların MaLER+ yanıt frekansları elde edilerek kısa süreli hafıza yeteneklerinin olup olmadığı ortaya konmuştur. Eugenol ile koşullanan karıncalar limonen, limonen ile koşullanan karıncalar eugenol ile de bir teste tabi tutularak karıncaların koku uyaranları arasında bir ayırım veya genelleme yapıp yapamadıkları da belirlenmiştir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Böceklerde Sinir Sistemi

Böcekler boyut olarak küçük beyinlere sahiptirler fakat az sayıda sinir hücresi içeren sinir sistemleri karmaşık davranışların oluşturulması için bir sınırlama oluşturmaz. Böcek sinir sistemi 'bilgi otoyolu' olarak hizmet eden uzmanlaşmış hücreler ağı olarak adlandırılabilir. Sinir hücreleri sinapslarla birbirine bağlanır ve oluşturulan bir impulsun diğer bir hücreye iletilmesi için birer kimyasal haberci olan asetilkolin, 5-hidroksitriptamin, dopamin ve noradrenalin gibi nörotransmitter maddeler salınır. Böceklerin merkezi sinir sistemi toraks ve abdomenin ventral çizgisi boyunca uzanan, eşleştirilmiş segmental gangliyonlardan oluşan kısmen basit bir sistemdir.

Böcek beyni üç çift kaynaşmış gangliyonun bir kompleksidir. Bu kompleks kısımlardan her biri böcek vücudundaki sınırlı bir aktivite yelpazesini kontrol eder. Protocerebrum, deutocerebrum ve tritocerebrum olarak isimlendirilen ana gangliyonlardan protocerebrum görme ile ilişkilidir ve bileşik gözleri ve osellusları sinirlendirir. Deutocerebrum antenler tarafından toplanan duyusal verileri işler. Tritocerebrum ise labrumu sinirlendirir ve protocerebrum ve deutocerebrumdan gelen duyusal girdileri işler. Böcek beyninde yer alan ve özellikle de sosyal gruplarda iyi gelişmiş olan ve mantar cisimciği olarak adlandırılan beyin bölgesinin asıl görevinin koku algısı ve hafızası ile ilişkili öğrenme olduğu tespit edilmiştir (Heisenberg, 1998).

Mantar cisimciği en iyi sosyal böceklerde gelişmiştir. Örneğin bal arısı *Apis mellifera* beyninin %20'sini, *Formica* cinsi karınca işçilerinin beyninin ise %50'sini mantar cisimciği oluşturur . Mantar cisimciğinin beyinde gerçekleştirilen en gelişmiş hesaplamalardan sorumlu olduğu ve işlev merkezi olarak fonksiyon gördüğü düşünülmektedir. Mantar cisimciği, optik lobdan ve deutocerebrumun anten loblarından duyusal girdiler alır ve bu duyusal girdiler mantar cisimciğine kaliksler yoluyla gelir (Fahrbach, 2006). Böceklerdeki mantar cisimciklerinin anatomisini anlamaya yönelik yapılan çalışmalar kokuların işlenmesi ve koku alma anılarının depolanması için sağlam mantar cisimciklerine gerek duyulduğunu göstermektedir (Davis, 2001). Mantar cisimciklerine hasar verilerek yapılan çalışmalar fiziksel lezyonlardan geri dönüşümlü soğutma (soğuk uygulaması ile mantar cisimciğine müdahale) uygulamalarına ve yapısal ve biyokimyasal beyin mutantlarına kadar değişiklik göstermektedir (Erber, 1987). Bu ve benzeri çalışmalar böceklerde öğrenmenin doğrudan mantar cisimcikleriyle ilgili olduğunu göstermiştir.

Böceklerde öğrenme ve hafıza üzerine yapılan çalışmaların çoğu Pavlov ve edimsel koşullanma gibi basit ilişkili öğrenme metotlarına dayanmaktadır. Pavlov koşullandırmasında denek hayvanlar koşullu ve koşulsuz olarak iki uyaran arasında bir ilişkiyi, edimsel koşullandırmada ise yaptığı bir eylemi o eylemden kaynaklanan sonuç ile ilişkilendirerek öğrenirler (Giurfa, 2015). Hayvanlarda öğrenme çalışmalarının doğmasını sağlayan Pavlov'dan sonra bu alanda bilim insanları oldukça fazla çalışmışlar ve farklı hayvan gruplarında hem yöntem farklılıklarını ortaya koymuşlar hem de öğrenmenin evrensel ilkelerini ortaya çıkarmışlardır. Günümüzde de devam eden bu çalışmalarında belli başlı model organizmalar kullanılmış olsa da öğrenmenin bir sınırı olmadığını kanıtlamak adına birçok hayvanda da çalışmalar yapılmış ve yapılmaya da devam edilmektedir. Bu nedenle, çeşitli eğitim koşulları altında uyaran kalıpları incelenerek bir hayvanın duyusal sistemi hakkında büyük ölçüde bilgi edinilebilir (Mackintosh, 1983).

Böcekler ekolojik çevrelerinde hangi faktörler var ise yaşamları boyunca o faktörlerle etkileşim içindedir. Kimi zaman bu etkileşim biyotik faktörlerle gerçekleşir kimi zaman da abiyotik faktörler ışığında böceğin yaşantısı değişebilir. Böceğin çevresindeki abiyotik faktörlere diğer bir deyişle nesnelere baktığımız zaman kimi böcek türleri nesnelerin fiziksel özellikleri (renk, şekil, boyut) yerine nesneler

arasındaki ilişkiyi öğrenir. Bu duruma kavram öğrenme denir (Zentall, Wasserman, Lazareva, Thompson, & Ratterman, 2008). Bu tür ilişkilerin ayıklanması, fiziksel özellikleri bakımından büyük ölçüde fark gösteren ancak öğrenilen ilişkiyi yerine getirebilecek bilinmeyen nesnelere aktarılmasına izin verir (Zentall, Galizio & Critchfield, 2002).

2.2. Pavlov'un Klasik Koşullandırması

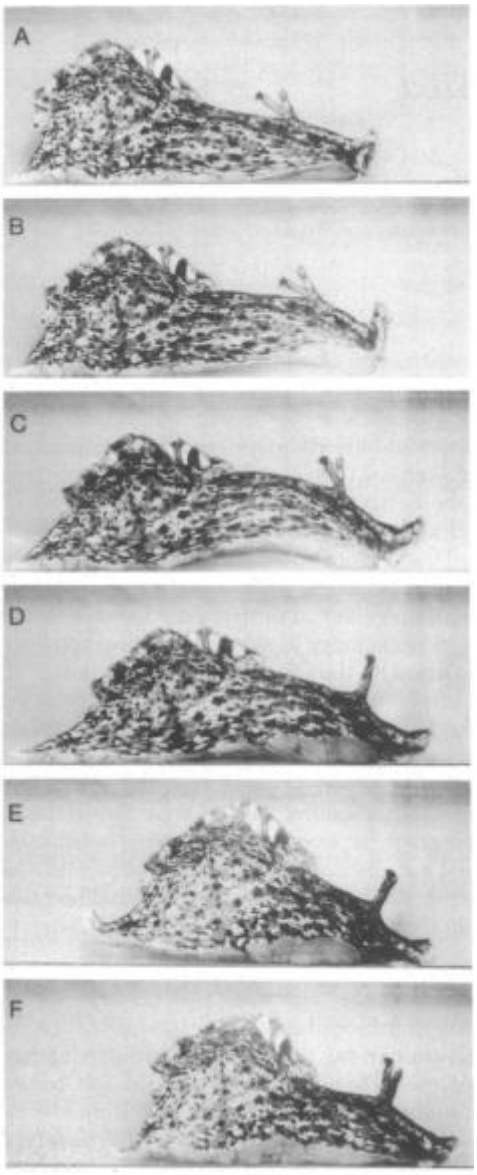
Bulduğu yöntem sayesinde Nobel ödülü kazanan ve yönteme adını vererek ismini bilim dünyasına kazandıran Rus fizyolog Ivan Petrovich Pavlov, hayvanlarda öğrenme konusunun temelini atmış ve diğer araştırmacılara ışık tutmuştur. Bilim tarihinde yapılan birçok büyük keşif gibi Pavlov koşullandırması da tesadüfen keşfedilmiştir. Pavlov, köpeklerde beslenmeye bağlı tükürük üretimi konulu çalışmasını sürdürürken, köpeklere besin getirmediği zamanlarda bile tükürüklerinin aktığını fark etmiş ve köpeklerin bazı olayları öğrenmesi gerekmediğini anlamıştır. Örneğin, bir köpek besin gördüğü zaman tükürük üretmeyi öğrenmez, bu yanıt bir refleks yanıtı olup köpekler için sabittir. Davranışçı terimlerle bakıldığı zaman bu koşulsuz bir cevaptır (öğrenmeyi gerektirmeyen uyaran-yanıt ilişkisi). Pavlov, köpeğe et tozu (koşulsuz uyaran) verilmesi ve tükürük salgılarının (koşulsuz yanıt) ölçülmesiyle koşulsuz yanıtın ortaya çıktığını göstermiştir.

Deneyler sırasında Pavlov, köpeklerin besinle ilişkilendirmeyi öğrendiği herhangi bir nesne veya olayın aynı cevabı tetiklediğini keşfettiğinde önemli bir bilimsel keşif yaptığını fark etmiştir. Pavlov, köpeklerde olan davranış değişikliğini öğrenmeye bağlamış ve bir şekilde denek köpeklerin besinleri laboratuvar asistanları ile ilişkilendirdiğini bulmuştur. Laboratuvar asistanı aslında nötral bir uyarandır çünkü köpekler normalde onlara bir tepki vermemişlerdir. Olan şey ise nötral uyaranın (laboratuvar asistanı), koşulsuz bir uyaranla (besin) ilişkili hale gelmesidir. Pavlov kendi yaptığı deneyde nötral bir uyaran olarak zil kullanmıştır. Köpeklere besin verdiği zaman arka planda bir zil sesi çalmıştır. Uyguladığı bu prosedürün bir dizi tekrarından sonra zili tek başına çalmıştır. Sonuçlar Pavlov'un beklediği gibi yani çalan zile karşı tükürüğün akması yönünde olmuştur. Böylelikle köpek zil ve besin arasında bir ilişki kurmuş yani bu davranış öğrenilmiştir. Bu yanıt öğrenildiği için buna koşullu yanıt denir. Bu da demek oluyor ki nötral uyaran koşullandırılmış bir uyarana dönüşmüştür.

Pavlov yaptığı çalışmaların sonucunda iki uyaranın zaman içerisinde birbirine yakın olarak sunulması gerektiğini bulmuş ve bu olay 'Zamansal Zıtlık Yasası'nı doğurmuştur. Zamansal zıtlık yasası, koşullu uyaran ve koşulsuz uyaranlar arasında zaman çok büyük ise o durumda öğrenme gerçekleşmeyecektir fikrini savunan yasadır (Pavlov, 1927).

2.3. Deniz Tavşanları

Omurgalı canlılarda yapılan ilişkili öğrenme deneylerinden sonra omurgasız hayvanlarda da pek çok çalışma yapılmıştır. Deniz tavşanları, sülükler, hamam böcekleri, meyve sinekleri, arılar ve karıncalar üzerinde çalışılan omurgasız gruplardandır (Giurfa ve Sandoz, 2012). Öğrenme ve hafızanın doğası ve sinirsel temeli ile ilgili bilgilerin büyük kısmının elde edildiği etkili bir model organizma olan *Aplysia californica* (Mollusca: Gastropoda: Aplysiidae)'da (deniz tavşanı) bireylerin istenmeyen uyaranlar kullanıldığında verdikleri davranışsal yanıtlar da (aversiv davranışlar) ilişkili öğrenme yöntemi uygulanarak araştırılmıştır (Walters, Carew & Kandel, 1979). Deneyde nötral uyaran olarak normalde *A. californica*'nın herhangi bir yanıt vermediği karides ekstraktı, koşulsuz uyaran olarak ise elektrik akımı kullanılmıştır. Denek deniz tavşanı elektrik akımına maruz kaldığında kaçma davranışı sergilemiştir. Bu davranış, daha doğrusu bu uyaran canlı için ödül olmadığı gibi onun istemediği bir olaydır ve sonucunda aversiv davranış yanıtı olan kaçma hareketini yapmıştır. Denekler, 750 litre hacimli, havalandırılmış ve içerisinde deniz suyu bulunan kaplara alındıktan sonra karides ekstraktı su tankının içine bırakılmış ve denek canlı bu nötral uyarana maruz kalmıştır. Herhangi bir yanıt oluşturmayan deniz tavşanı nötral uyarana 60 saniye maruz kaldıktan sonra nötral uyaran ortamdayken baş kısmına Ag/AgCl elektrotlarıyla 50 mA'lik zayıf elektrik akımı verilmiştir (koşulsuz uyaran). İki gün boyunca günde 3 kere bu uyaran eşleştirmesi ile yapılan eğitime tabi tutulan deniz tavşanları (deneme araları 3 saat) son denemeden 18 saat sonra deney alanında sadece nötral uyaran varken davranışsal yanıtı yönünde test edilmiş ve normalde karides ekstraktına karşı sergilemediği aversiv kaçış yanıtını sergilediği gözlenmiştir (Şekil 2.1) (Walters vd., 1979).

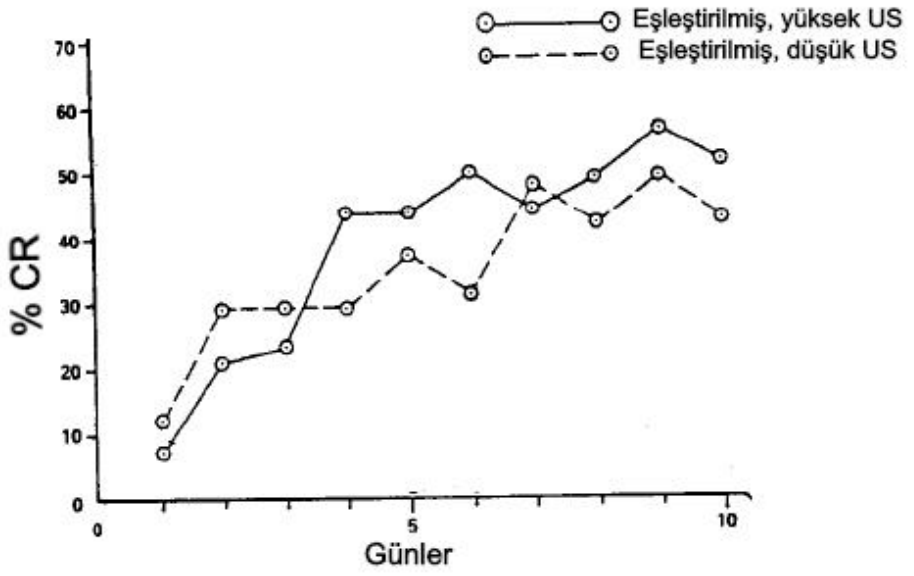


Şekil 2.1. *Aplysia californica*'nın verdiği kaçma yanıtı (bir adım). A-B: başın yükselmesi ve uzatılması, C-D: orta gövdenin kemeri, E-F: kuyruğun geri çekilmesi (Walters vd., 1979'dan alınmıştır).

2.4. Sülükler

Omurgasız hayvanlardaki ilişkili öğrenme yeteneğinin yaygınlığı konusunda yapılan çalışmalara dahil edilen canlı gruplarından bir tanesi de boyutları, nispeten hızlı hareketleri, çevreye karşı duyarlılıkları sebebiyle sülükler olmuştur. Henderson ve Strong (1972)'nin tatlı bir doğal su kaynağından topladıkları *Macrobdella ditetra* (Annelida: Hirudinidae) türü sülükler ile yaptıkları çalışmalarında toplanan sülükler

laboratuvar ortamına getirilmiş ve yine aynı ortamdan alınan su içine konularak laboratuvar ortamına alışmaları için bir hafta beklenmiştir. Bu süre içerisinde sülükler küçük çiğ karaciğer parçalarıyla beslenmişler ve 7 gün sonunda deneye tabii tutulmuşlardır. Deneyde sülüklerin ışık uyaranları ile elektrik akımları arasında ilişki kurmaları amaçlanmış ve kaçınma davranışı sergileyip sergilemedikleri araştırılmıştır. Nötral uyaran olarak 25 ve 100 W'lık ışık kaynakları kullanılmış, koşulsuz uyaran olarak da 40000 ohm'luk yüksek ve 85000 ohm'luk düşük şok dalgaları kullanılmıştır. Sülüklerin verdikleri deneysel yanıtlar 4 kategoriye ayrılarak yanıt yok, uyarana normal bir sefalik dönme, ön-arka vücut kasılması ve uzama yanıtı olarak kaydedilmiştir. Deney ortamına alınan bir deneğe 3 saniye boyunca nötral uyaran sunulmuş ve bu sürenin son 0.1 saniyelik diliminde, 0.1 saniye boyunca koşulsuz uyaran uygulanmıştır. Bu eğitim süreci 10 gün boyunca günde 25 deneme yapılarak devam etmiştir. Araştırmacılar, denemelerin sonunda denek hayvanlarının nötral uyaran karşı koşullandığını ve eğitim süresi sonunda koşullu yanıt verdiklerini tespit etmişlerdir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. İki farklı NS uygulanması sonucu *Macrobdella ditetra* bireylerinin verdiği koşullu yanıt yüzdeleri grafikte görülmektedir. Yüksek şiddetteki US'ye karşı verilen yanıtlar düşük şiddetteki US'ye karşı verilen yanıtlardan yüzde olarak fazladır. [Henderson ve Strong (1972)'den Türkçeleştirilerek alınmıştır].

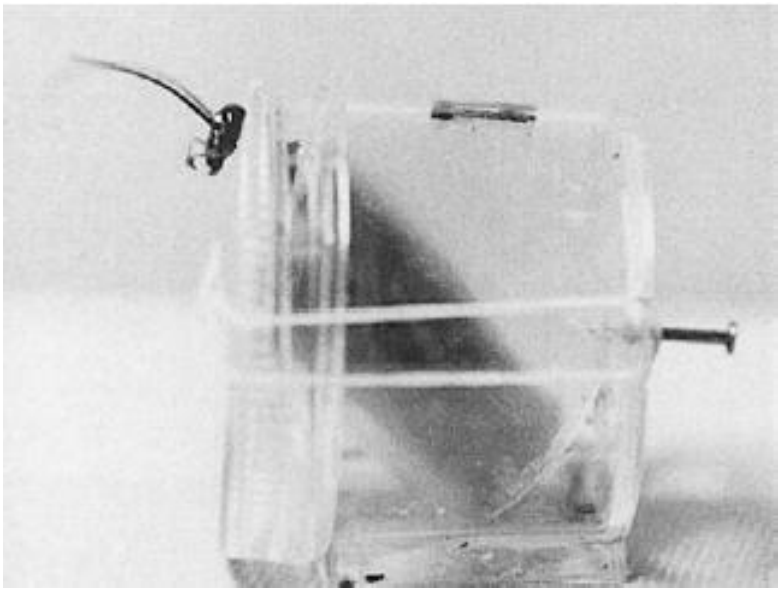
2.5. Hamamböcekleri

Omurgasızlar arasında klasik koşullandırma ile ilgili çalışmaların yapıldığı canlı gruplarından bir tanesi de hamamböcekleri, özellikle de *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae) türü olmuştur. Hamamböceklerinin koku alma sistemleri, antenleri üzerindeki koku reseptör nöronlarının feromonal ve periferik olmayan kokulara karşı verdiği tepkiler bilim insanları tarafından iyi tanımlanmıştır (Fujimura, Yokohari & Tateda, 1991; Li & Strausfeld, 1997). Sakura ve Mizunami (2001) hamamböceklerinin koku tercihlerini değiştirebilmeleri için tek bir denemenin etkili olduğunu, üç eğitim denemesi sonucunda öğrenilen bilginin 4 haftalık bir süre ile kullanılabilir olduğunu ve herhangi bir eğitim süreci sonunda ortaya çıkan koku tercihlerinin başak eğitim süreçleri ile değiştirilebileceğini tespit etmişlerdir.

Watanabe, Kobayashi, Sakura, Matsumoto ve Mizunami (2003)'ün yaptıkları bir ilişkili öğrenme çalışmasında hamamböcekleri, iki farklı koku uyaranı (nane ve vanilya kokusu) ve iki farklı besin çözeltisi (sukroz ve salin) arasında seçim yapmaları için bir düzenekte eğitilip sonrasındaki tercihleri bakımından test edilmişlerdir. Nane kokusu sukroz çözeltisi (ödül) ile vanilya kokusu ise salin (ceza) çözeltisi ile ilişkilendirilmiştir. Deney öncesinde hamamböcekleri, kendiliğinden var olan koku tercihlerini belirlemek açısından kapalı bir düzeneğe alınmışlardır. Kapalı düzenek içine 20 µl nane özüne ve vanilya özüne bandırılmış kurutma kağıtlarının bulunduğu plastik kaplar konulmuş (her koku için 2 adet) ve koku akışı sağlanması için üzerlerine küçük delikler açılmıştır. Kapalı düzenek içine bırakılan bir hamamböceğinin anten ve ağız parçalarıyla bir plastik kabı araştırması, koku kaynağını 'ziyaret etmesi' olarak değerlendirilmiştir. Bu aşamada denek hayvanların %60'ı koku kaynağını en az bir kez ziyaret etmiş ve ortalama ziyaret sayısı 1.5 olarak belirlenmiştir.

Bu ön işlem sonrasında deneylere dahil edilecek hamamböcekleri sadece antenlerini ve ağız organlarını hareket ettirebilecekleri şekilde bir plastik kaba alınmıştır (Şekil 2.3). Hamamböcekleri nokturnal canlılar oldukları için deneyin yapıldığı ortam karanlık olarak ayarlanmıştır.

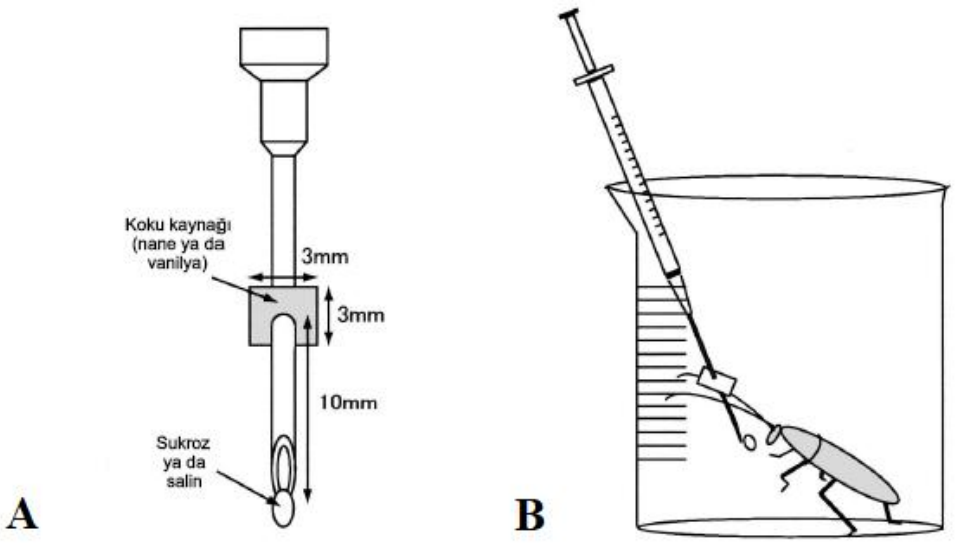
.



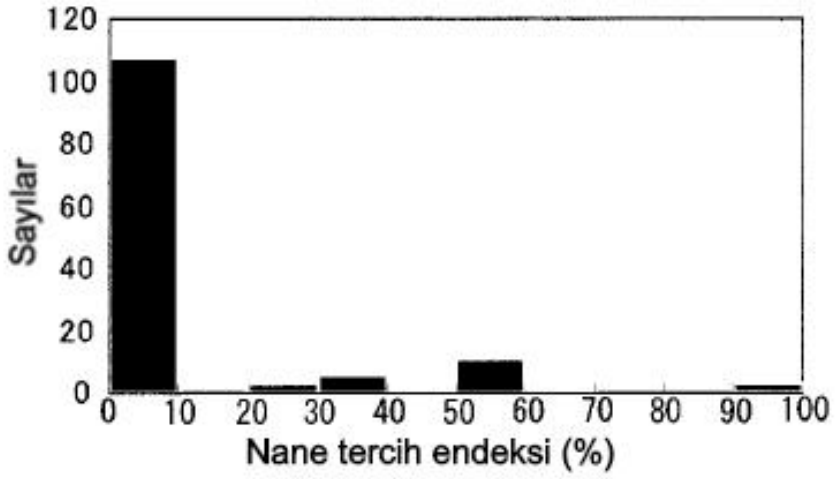
Şekil 2.3. Denek olarak seçilen bir hamamböceğinin eğitim ve deneyler sırasında tutsak olarak tutulduğu plastik kaptaki pozisyonu [Watanabe vd. (2003)'den alınmıştır].

Sabit bir şekilde deney kabına yerleştirilen hamamböceklerine bir şırınga yardımıyla hem koku uyaranı hem de besin verilmiştir (ilişkilendirme). Koku uyaranının emdirildiği kurutma kağıdı şırınganın uç kısmından 3 cm geriye yerleştirilmiş ve şırınganın ucundan da besin çözeltileri verilmiştir. Denek hayvanlar 3 farklı gruba ayrılmış ve gruplar sırasıyla 1, 2 ve 3 denemeye tabii tutulmuşlardır. Koşullandırma evresinde koku emdirilmiş kurutma kağıdı hamamböceği antenlerinin 1 cm iç kısmına kadar konumlandırılmış ve şırınga ucundan da besin (sukroz veya salin çözeltisi) verilmiştir (Şekil 2.4).

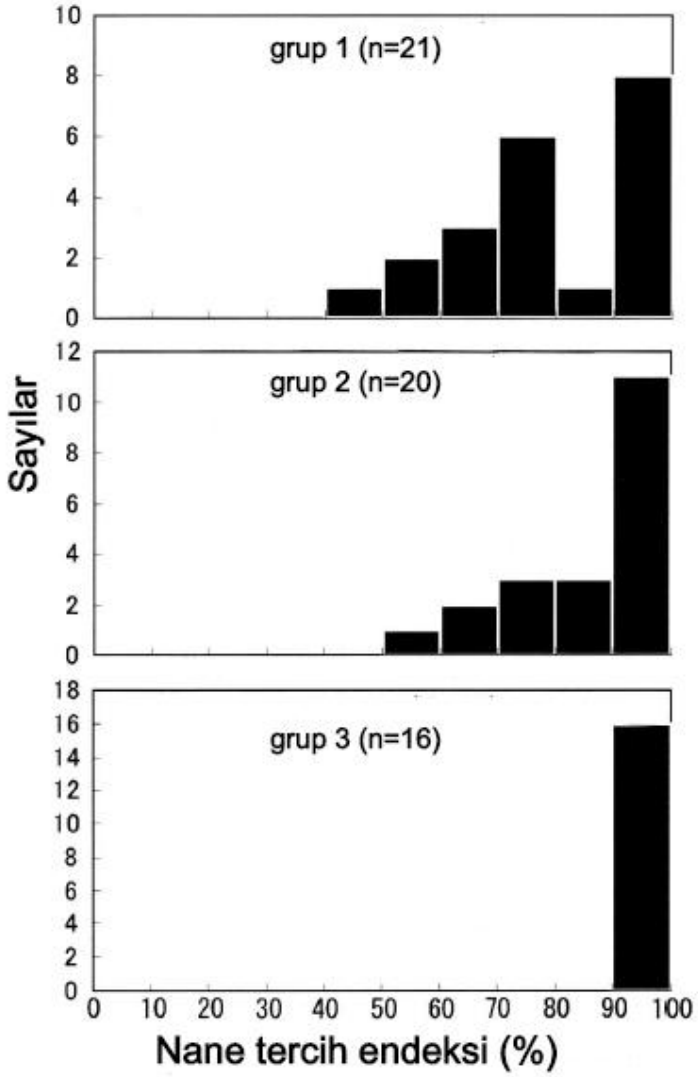
Koşullandırma öncesinde yapılan testler, hamamböceklerinin koku tercihlerinin vanilya kokusundan yana olduğunu göstermişse de (Şekil 2.5 koşullandırmadan 30 dakika sonra hamamböcekleri sadece koku uyaranları ile test edilmiş ve tercihlerinin vanilyadan naneye döndüğü gözlemlenmiştir (Şekil 2.6).



Şekil 2.4. A) Deneyde kullanılan modifiye edilmiş şırınga. B) Deneyin yapıldığı esnada hamamböceğinin ve şırınganın konumu (Watanabe vd., 2003).



Şekil 2.5. Koşullanma öncesinde denek bireylerin nane kokusu tercihleri görülmektedir. 0-10 aralığındaki bireyler sadece vanilya kokusunu tercih etmişlerdir. [Watanabe vd. (2003)'den Türkçeleştirilerek alınmıştır].



Şekil 2.6. Hamamböceklerinin koşullanma testlerinden sonra koku uyaranları arasındaki tercih profilleri görülmektedir. Grup-1: 1 kez şartlandırma yapılan hamamböceklerinin nane kokusuna verdiği yanıtlar. Grup-2: 2 kez şartlandırma yapılan hamamböceklerinin nane kokusuna verdiği yanıtlar. Grup-3: 3 kez şartlandırma yapılan hamamböceklerinin nane kokusuna verdiği yanıtlar.

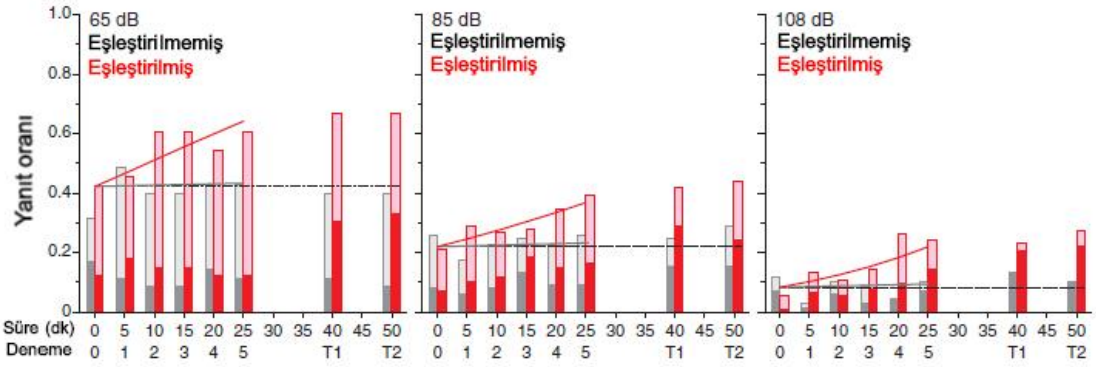
Bu veriler ışığında hamamböceklerinin koşullandırma öncesi %60 oranında rastgele seçtiği koku uyaranları için sergiledikleri seçim yüzdesi deneyin sonunda %90'a çıkmış ve koku tercihi naneden yana olmuştur. Diğer bir ifadeyle hamamböceklerinin ödül ile ilişkilendirilen nane kokusunu yüksek oranda öğrendikleri ve bu kokuya karşı koşullu hale geldikleri anlaşılmıştır.

2.6. Meyve Sinekleri

İlişkili öğrenme, hafıza ve öğrenmenin aracılık ettiği davranışsal yanıtlar ile ilgili üzerinde sıklıkla çalışmalar yapılan bir böcek türü de meyve sineği *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) olmuştur. *Drosophila*'da koku ilişkili öğrenme çalışmaları, öğrenme ve böcek hafızalarının altında yatan sinirsel mekanizmalar hakkında değerli bilgiler sağlamıştır. İyi gelişmiş görsel sistemleri ile görsel bilgi kullanımına oldukça önem veren meyve sineklerinde koku temelli çalışmalar yapılması meyve sineklerinin kokuları öğrenmede laboratuvar ortamında nispeten iyi olmalarından, böceklerin duyusal sinir sistemlerinin ekolojik çevreleri baz alındığında omurgalı canlılara nazaran fonksiyon olarak homolog olmasından ve koku uyaranlarının klasik koşullandırma protokolü ile hızlı bir şekilde öğrenilmesinden kaynaklanmaktadır (Busto, Cervantes- , & Davis, 2010).

Meyve sineklerinde klasik koşullandırma protokolü uygulanarak aversiv ve beslenme davranışlarını inceleyen araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalarda çoğunlukla US (CS) olarak kimyasal maddeler kullanılmıştır. Menda vd. (2011) ise US (CS) olarak ses dalgaları kullanmışlardır. Araştırmacılar, dişi *D. melanogaster*'leri ses uyaranları ile sukroz çözeltisi arasında ilişki kurmaları yönünde eğittikten sonra PER yanıtı verip vermediklerini araştırmışlardır. Deney sırasında 3 grup oluşturulmuş ve 1. grup eşleştirilmiş sinekleri, 2. grup eşleştirilmemiş sinekleri, 3. grup ise ödül (sukroz) olmayan grup olarak ayrılmışlardır. Her bir gruptaki sineklere 5 dakika aralıklarla 6 eğitim denemesi uygulanmıştır. Eşleştirilmiş gruptaki sineklere 10 saniye boyunca 400 Hz'lik bir ses uyaranı uygulanmış ve aynı anda 5 µl'lik sukroz çözeltisi de sunulmuş. Eşleştirilmemiş gruptaki sineklere 400 Hz'lik ses uyaranından 30 saniye sonra sukroz çözeltisi sunulmuştur. Ödül olmayan gruba ise sadece 400 Hz'lik ses uyaranı sunulmuştur. Her üç gruba da 3 farklı şiddette ses sinyalleri gönderilmiştir. Bu sinyaller 65 dB (işitsel eşiğin hemen üstünde), 85 dB (doğal kur yapma sesinin seviyesine yakın) ve 108 dB (yüksek sesli) olarak belirlenmiştir. Eğitimlerden sonra 15. ve 25. dakikalarda sadece ses uyaranları verilerek PER yanıtı yüzdeleri kaydedilmiştir (Şekil 2.7) (Menda vd., 2011).

.



Şekil 2.7. Eşleştirilmiş ve eşleştirilmemiş grupların sadece ses uyaranı varlığında verdiği yanıtlar grafikte görülmektedir (T1: eğitimden 15 dakika sonra, T2: eğitimden 25 dakika sonra) (Menda vd., 2011'den Türkçeleştirilerek alınmıştır).

Şekil 2.7'de da görüleceği üzere eşleştirilmemiş gruptaki sineklerin ses uyaranını sukroz çözeltisi ile ilişkilendirmeyi öğrenmediği anlaşılmıştır. Çünkü yanıt verme oranı başlangıç seviyesindeki oranda kalmıştır. Eşleştirilmiş grubun ise eğitim denemeleri ilerledikçe yanıt verme olasılıkları artmış ve ses uyaranını sukroz çözeltisi ile ilişkilendirmeyi öğrendikleri anlaşılmıştır. Eşleştirilmiş grup için başlangıçta %25-40 arası bir seviyede olan PER yanıtı eğitim seansının sonunda %60-75 arasına yükselmiş ve meyve sineklerinin ilişki kurup öğrenme yanıtında bulundukları anlaşılmıştır. Aynı zamanda ses seviyesi arttıkça verilen yanıt oranları azalmıştır. Araştırıcılar bu durumu böceklerin de dahil olduğu birçok hayvanın yüksek ses seviyesi altında kaçınma davranışını sergilemedikleri, devam eden davranışlarını dondurup bir irkilme tepkisi ile karşılık vermelerinden dolayı kaynaklandığını açıklamıştır (Hoy, 1989).

2.7. Bal Arılarında PER Yanıtı

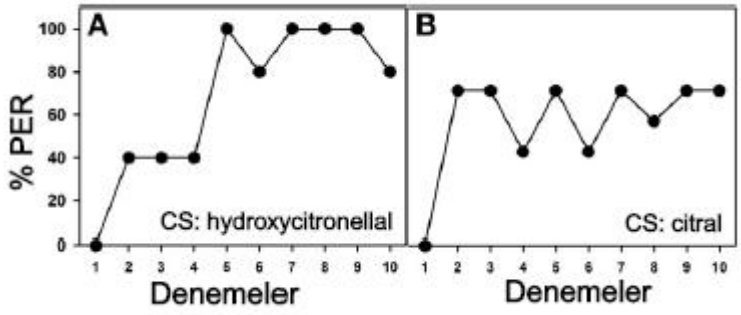
Glikoz çoğu omurgasız canlı için enerji ve besleyici fonksiyonu olan bir besindir. Bal arıları şekerli bir çözeltiyle karşılaştıkları zaman hortum şeklinde olan ağız organlarını besine doğru uzatırlar ve bu beslenme olayı PER olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.8) Pavlov'un klasik koşullandırmasına dayanan çalışmalarda denek arıların kimyasal kokular, renkler, görsel şekiller, termal ve dokunsal uyaranlarla şeker solüsyonunu ilişkilendirerek öğrenme davranışında bulunduğu bilinmektedir (Menzel, 1999). Bu yanıtın laboratuvar ortamında test edilmesi ve çalışılması üzerine Takeda

(1961) tarafından bir protokol geliştirilmiştir. Takeda'nın bu protokolü ortaya çıkarmasından sonra çok sayıda öğrenme ve hafıza çalışması yapılmıştır (Bitterman, Menzel, Fietz, & Schäfer, 1983; Giurfa ve Sandoz, 2012). Protokol başlangıçta davranışsal yanıt ortaya çıkarmayan nötral uyaranın (NS), arılarda refleks yanıtı (UR) oluşturan koşulsuz bir uyaranla (US), belirli öğrenme seanslarından sonra ilişkilendirilip NS'nin koşullu uyaran (CS) ve UR'nin ise koşullu yanıta (CR) dönüşmesine dayanmaktadır (Takeda, 1961).



Şekil 2.8. Refleksif bir beslenme davranışı olan PER yanıtı.

Takeda'nın yapmış olduğu çalışmanın bu alanda ilk olmasından ve davranış yönünden pek çok kavram bilinmediğinden dolayı arıların sadece yanıt verip vermediği belirlenmiştir. Öğrenme eğrisi, öğrenilen davranışın yok olması ve PER yanıtının istatiksel analizi hakkında bilgiler içeren analizler sunulmamıştır (Giurfa ve Sandoz, 2012). Takeda, iki grup arı için (n=5 ve n=7) hydroxycitronellal ve citral uyaranlarını test etmiş ve arıların bu koku uyaranlarıyla sukroz çözeltisini ilişkilendirip PER yanıtında bulunup bulunmadıklarını gözlemlemiştir (Şekil 2.9).



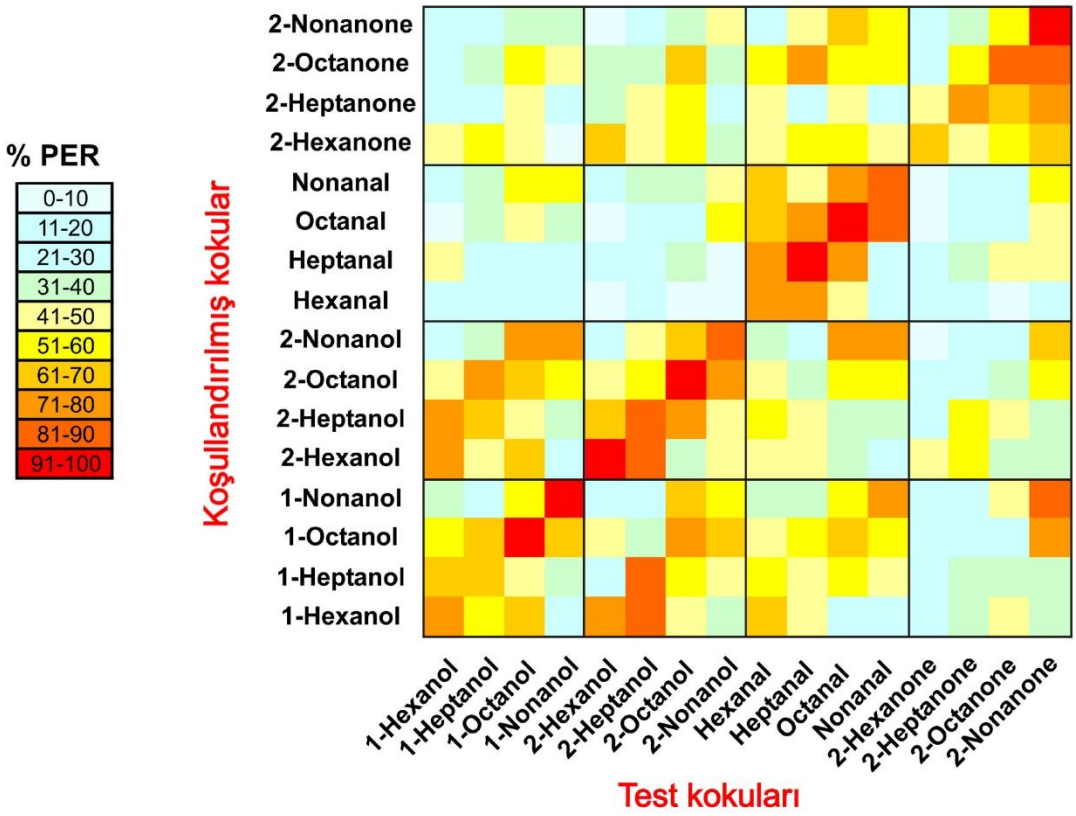
Şekil 2.9. Takeda'nın yapmış olduğu çalışma sonucunda denek arıların iki farklı koku uyaranına karşı verdiği yanıtların yüzdesi görülmektedir (Takeda, 1961'den Türkçeleştirilerek alınmıştır).

Takeda yapmış olduğu bu çalışmayla birlikte diğer çalışmalara öncü olmuş ve prosedürü farklı bilim insanları tarafından geliştirilerek hem arılar hem de diğer böcek grupları üzerinde denemeler yapılmıştır. Arılar üzerinde yapılan başka bir çalışma, yayımlanan bu protokolü geliştirmiştir. Bitterman vd. (1983) tarafından geliştirilen yeni protokolde PER yanıtının deney sırasında CS ve US'nin birbirlerine yakın sürelerde sunulduklarında (eşleştirilmiş grup) oluştuğunu, ayrı olarak sunulduklarında (eşleştirilmemiş grup) ise oluşmadığını göstermiştir.

Bu çalışmada Takeda'nın sonuçlarından farklı olarak CS-US sunumunun ardışık olarak yapılmasının öğrenmeyi direkt olarak etkilediği, arıların bilgiyi öğrenme ve hafızalarında tutma durumlarının ise tek bir eğitim denemesinden sonra gerçekleştiği eğitimlerden sonra öğrenilen bilgilerin iki gün sonra yapılan testlerde dahi geri çağrışımla bilginin alınabildiği anlaşılmıştır (Bitterman vd., 1983). Öğrenilen bilginin yani deneyler sırasında koşullu hale geldiği CS'ye karşı verilen yanıtların zaman içinde sönmesiyle (yok olma) bilginin unutulduğu açıklanmıştır. Ayrıca denek arılar yok olma olayından sonra kendiliğinden geri kazanım davranışı göstermiştir ve hem memeli hem de omurgasız hayvanlarda (bu deney için arılar) gözlemlenen genel bir davranış olduğunu açıklamıştır (Bitterman vd., 1983).

Koku uyaranlarıyla test edilen PER davranışsal yanıtında, zaman ilerledikçe bilimsel alandaki teknolojiler gelişmiş ve farklı test platformları ortaya çıkmıştır. Bu gibi gelişmeler bilim insanlarının denek hayvanlar üzerinde çok sayıda test yapmalarına ve bu testler sonucunda çıkan sonuçları yorumlamalarına yardımcı olmuştur. Arılar

üzerinde yapılan koku genelleme çalışmaları, arıların CS olarak sunulan kokuya karşı mı PER yanıtı oluşturduğunu ya da herhangi bir kokuya karşı mı yanıt oluşturduklarını açıklamıştır. Guerrieri, Schubert, Sandoz ve Giurfa (2005)'in 1500'e yakın bal arısı üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada 16 farklı koku uyaranı kullanılmış ve her arı grubu farklı koku uyaranlarıyla eğitime alınmıştır. Eğitimden sonra her bir denek arı hem eğitim seansında kullanılan koku molekülüyle hem de diğer 15 koku molekülüyle ayrı ayrı test edilmiştir. Oluşturulan renk grafiğinde arıların yüksek oranda eğitim aşamasında kullanılan koku uyaranlarına yanıt verdiği aynı zamanda kimyasal formülleri birbirine benzeyen koku uyaranlarına da yanıt verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 2.10) (Guerrieri, Schubert, Sandoz & Giurfa, 2005).



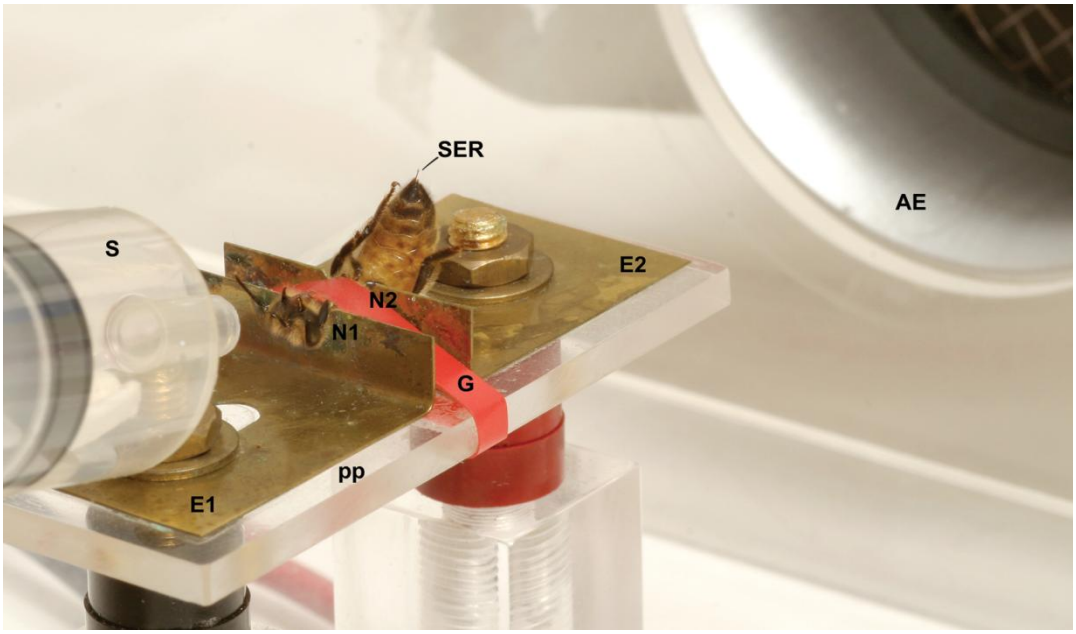
Şekil 2.10. Bal arılarında yapılan koku genelleme testlerinin sonuçları grafikte verilmiştir. Koşullandırma esnasında kullanılan kokular dikey olarak, deneme sırasında kullanılan kokular yatay olarak listelenmiştir. Kırmızı renk tonları maksimum yanıtı, mavi renk tonları minimum yanıtı temsil etmektedir (Guerrieri vd., 2005'den Türkçeleştirilerek alınmıştır).

Yapılan bu çalışma, koku uyaranlarının kimyasal yapıları aynı gruba ait olduğunda genelleme yapılabildiğini açıklamıştır. Bal arılarının deney sırasında kullanılan tüm koku uyaranlarına karşı koşullu hale geldiği fakat kısa zincirli keton molekülleri için öğrenme eğrisinin düşük olduğu anlaşılmıştır. Genellemenin en fazla yapıldığı koku uyaranları birincil ve ikincil alkoller olmuştur. Uzun zincirli moleküller arasında kısa zincirli moleküllere nazaran daha fazla genelleme yapılmıştır. Deneylerde kullanılan koku uyaranlarının zincir uzunluğunun ve karbon sayılarının fazla olması denek hayvanların uyaranları algılamasını pozitif yönde etkilemiştir. Ayrıca uyaranlar arasındaki karbon sayısının farklılığı genellemeyle ters orantılı bir durum göstermiştir (yani karbon sayısındaki fark yüksek olursa genelleme düşük olur) (Guerrieri vd., 2005; Laska, Galizia, Giurfa & Menzel, 1999).

Bal arılarının öğrenme başarısı sadece koku uyaranları ile sınırlı değildir. Arılar şekil, renk, görsel ipuçları ve yer öğrenme konusunda da başarılı organizmalardır. Arılar doğal yaşamlarında çiçeklerin yerini ve besin değerlerini, bu gibi faktörlerle ilişkilendirerek besinlerden yüksek kârlılık elde edebileceği anılar oluştururlar (Menzel ve Müller, 1996).

2.8. Bal Arılarında SER Yanıtı

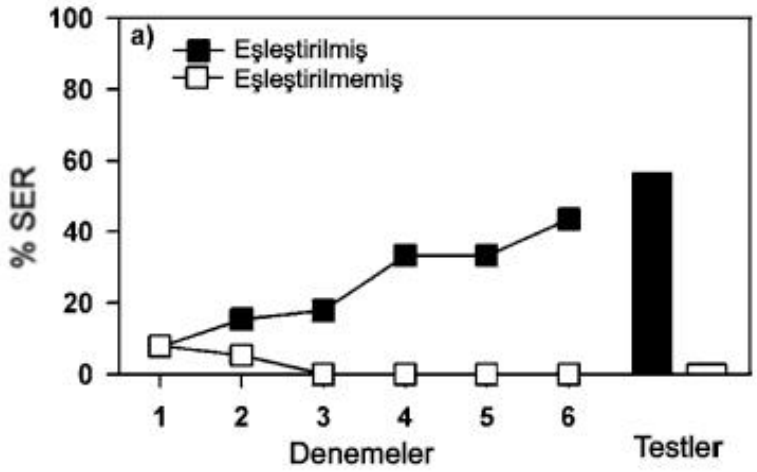
Vergoz, Roussel, Sandoz ve Giurfa (2007), PER yanıtının laboratuvar koşullarında oluşabildiği gibi SER yanıtının da oluşabileceğini düşünmüştür. Daha önceleri SER refleksi çalışılmış (Núñez, Maldonado, Miralto & Balderrama, 1983) fakat bu yanıtın bir koku uyaranıyla ilişkilendirildiği bir çalışma yapılmamıştır. Vergoz vd. (2007) arıların aversiv davranışlarını bu prosedürle beraber kayıt altına almayı başarmışlardır. Deneylerde hem koku-ödül hem de koku-ceza ilişkisini çalışan araştırıcılar, US olarak 7.5 V'luk elektrik şoku, NS olarak koku verici madde (1-heksanol, eugenol ve 1-nonanol) kullanmıştır. Denek arı hareketleri kısıtlanacak şekilde ve elektrik akımını ileten yapılarla donatılmış deney platformuna alınarak testlere başlanmıştır (Şekil 2.11).



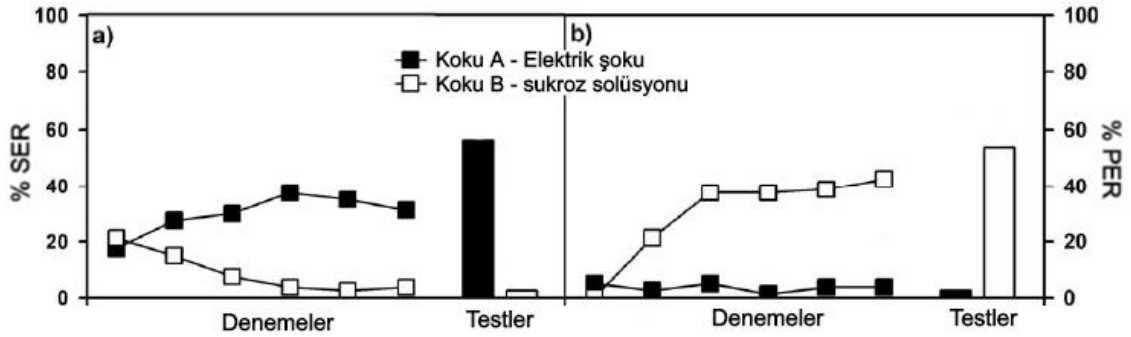
Şekil 2.11. Deneysel düzeneğe alınan arının pozisyonu (S: nötral uyaranın verildiği şırınga, E1-E2: pirinç plakalar, pp: plesiglas plaka, N1-N2: arının sabitlendiği oyuklar, G: toraksı sabitleyen bant, AE: hava filtresi, SER: davranış yanıtı) (Vergoz vd., 2007'den alınmıştır).

Deney sırasında NS ortama verildikten 3 saniye sonra elektrik akımı verilmiş hayvanın davranışı gözlemlenmiştir. Deneyde 39 denek arı eşleştirilmiş ve eşleştirilmemiş grup olarak test edilmiştir. Koşullanmadan sonra arılar sadece koku varlığında denenmiş ve SER yanıtı CS'ye bağımlı hale gelmiştir (Şekil 2.12).

Bu denemelerden sonra sakroz ile ilişkilendirilen koku molekkülleri de elektrik akımı ile ilişkilendirilen koku molekülüyle beraber ardışık olarak denenmiş ve deneklerin koku genellemesi yapıp yapmadığı anlaşılmaya çalışılmıştır (Şekil 2.13).



Şekil 2.12. Eşleştirilmiş ve eşleştirilmemiş grupların sadece koku varlığında olan SER yanıtları görülmektedir (Vergoz vd., 2007).

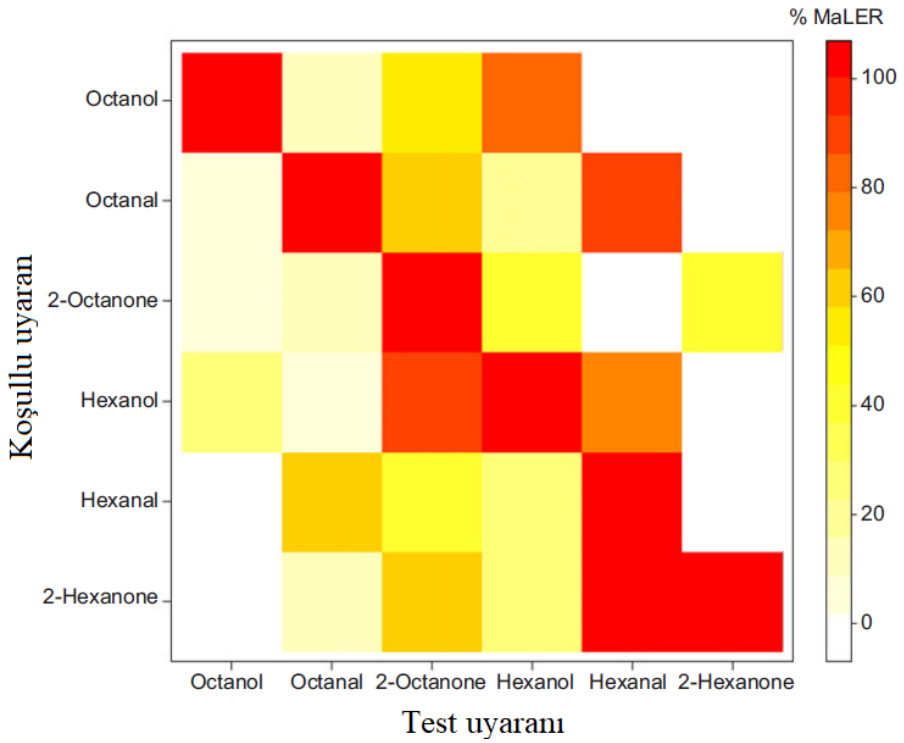


Şekil 2.13. SER ve PER yanıtlarının ilişkilendirildikleri kokularla sunulduğu zaman oluşan grafikler. Siyah kutular elektrik şokunu, beyaz kutular sukroz çözeltisini temsil etmektedir. Yanıtların yüzdeleri ise sütun şeklinde verilmiştir. A) elektrik akımına karşı verilen SER yanıtları, B) sukroza karşı verilen PER yanıtları görülmektedir (Vergoz vd., 2007).

Grafiklere bakıldığında arıların öğrendiği kokulara spesifik yanıtlar verdiği anlaşılmıştır. SER yanıtı için eğitilen arılar eşleştirildikleri koku uyaranına karşı yüksek oranda SER davranışsal yanıtında bulunmuşlardır. Bu durum PER yanıtı için de geçerli olmuştur.

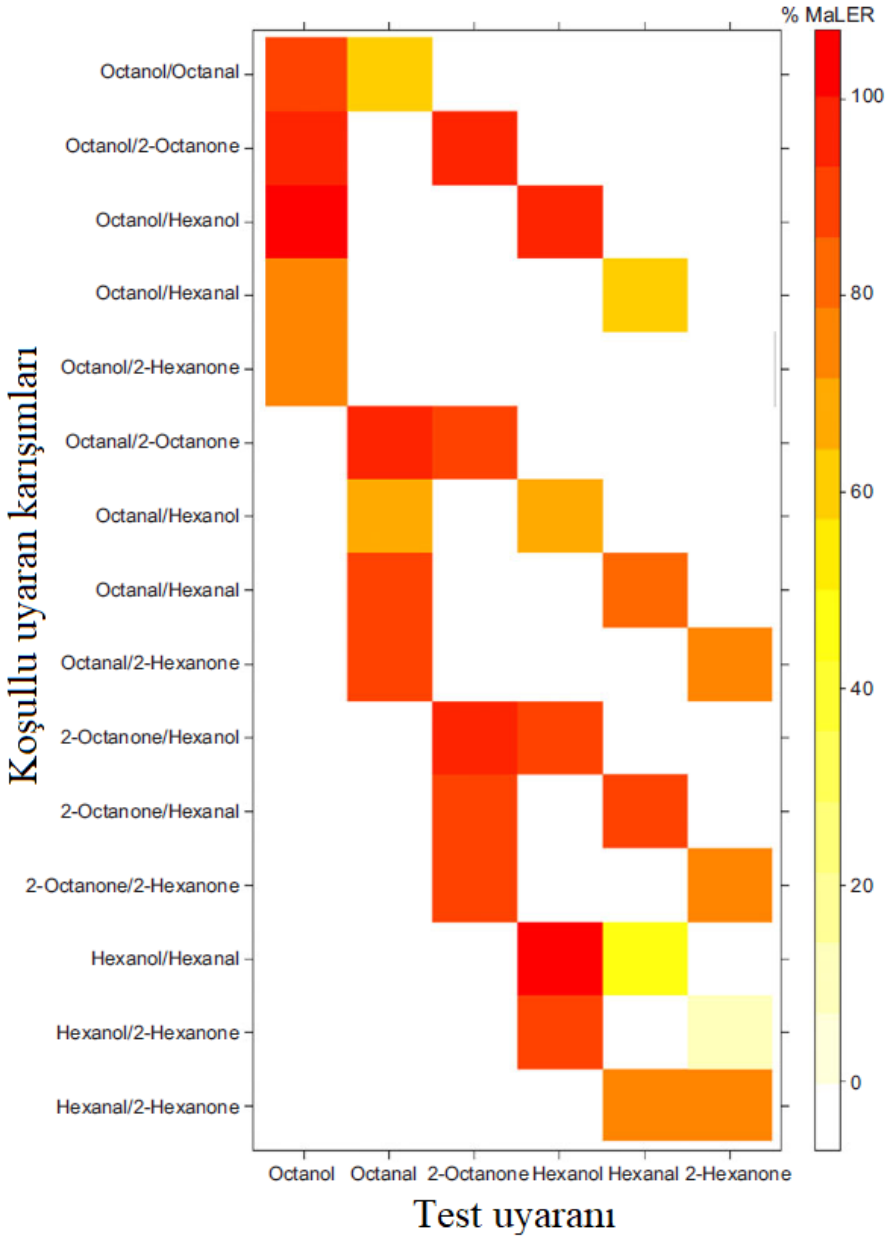
2.9. Karıncalar

Sosyal yaşam biçimini benimsemiş bir diğer böcek grubu olan karıncalar, arılarla aynı ordoya mensuptur ve bu canlılar arasında koloni işleyişi bakımından benzerlikler mevcuttur. Karıncalarda öğrenme, sosyal bağlam içinde gerçekleşen bireysel öğrenmelerinden kaynaklanır ve bu terime 'sosyal öğrenme' denir (Heyes, 1993). Karıncaların, arılarda olduğu gibi koku genelleme derecelerini belirlemek açısından yapılan çalışmalar mevcuttur. *Camponotus aethiops* türü üzerinde yapılan çalışmada 6 farklı koku uyaranı (heksanol, heksanal, 2-heksanon, oktanol, oktanal ve 2-oktanon) sukroz ile ilişkilendirilmiştir. Eğitim seanslarında koku uyaranları hem tek başlarına hem de karışım olarak sunulmuştur. Ayrıca deneme sırasında da koku uyaranları hem tek başlarına hem de karışım olarak sunulmuştur. Deneyde 611 karınca tek bir koku uyaranıyla 329 karınca ise ikili koku uyaranıyla koşullandırılmıştır. Eğitim aşamasında ve deneme sırasında tek bir koku uyaranı kullanılan karıncalar koşullandıkları kokulara pozitif yanıtlar vermiştir ve bu durum kokuları sukroz ile ilişkilendirdiklerinin kanıtı olmuştur (Şekil 2.14) (Bos, d'Ettorre & Guerrieri, 2013).



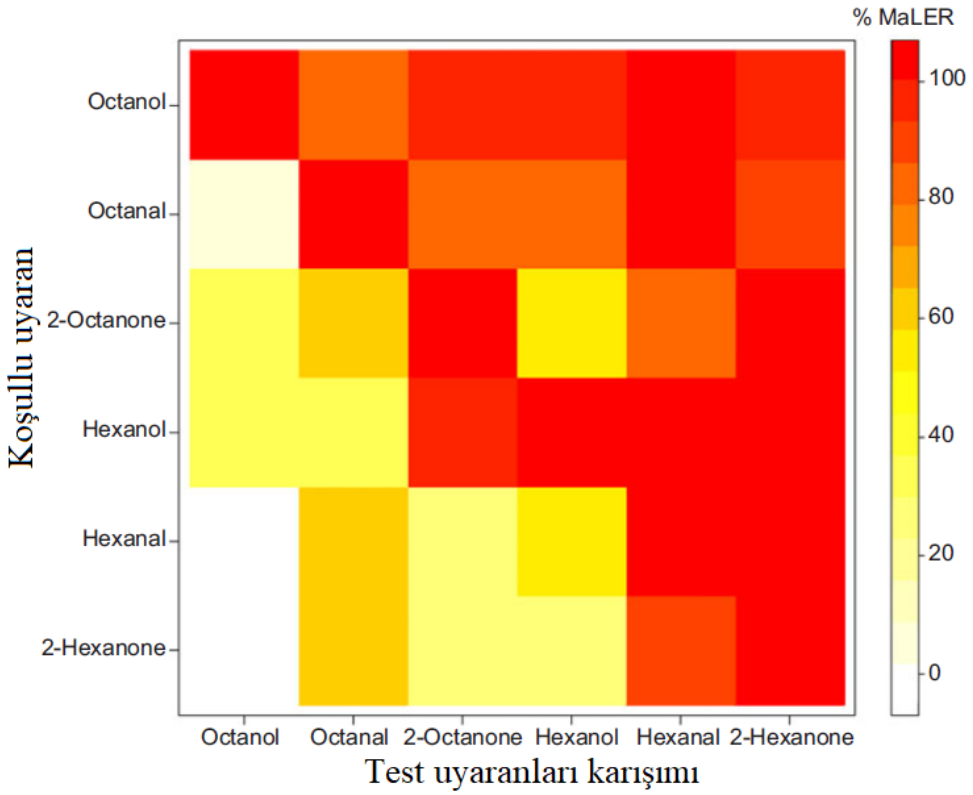
Şekil 2.14. Tek bir koku uyaranının kullanıldığı koşullanma eğitimi ve test aşamalarında denek *C. aethiops*'ların verdikleri yanıtlar (Bos vd., 2013).

Eğitim aşamasında iki koku karışımı kullanılan ve deneme sırasında tek bir koku uyaranı kullanılan karıncalar koşullandıkları kokuların bileşenlerine pozitif yanıtlar vermiştir ve bu durum çoğu karıncanın kullanılan uyaranları sukroz ile ilişkilendirdiklerinin kanıtı olmuştur (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Koşullanma aşamasında iki koku karışımı, test aşamasında tek bir koku uyaranı kullanılan denek *C. aethiops*'ların verdikleri yanıtlar (Bos vd., 2013).

Eğitim aşamasında tek bir koku uyaranı kullanılan ve deneme sırasında iki koku karışımı kullanılan karıncalar koşullandıkları kokulara pozitif yanıtlar vermiştir ve bu durum kokuları sukroz ile ilişkilendirdiklerinin kanıtı olmuştur (Şekil 2.16).

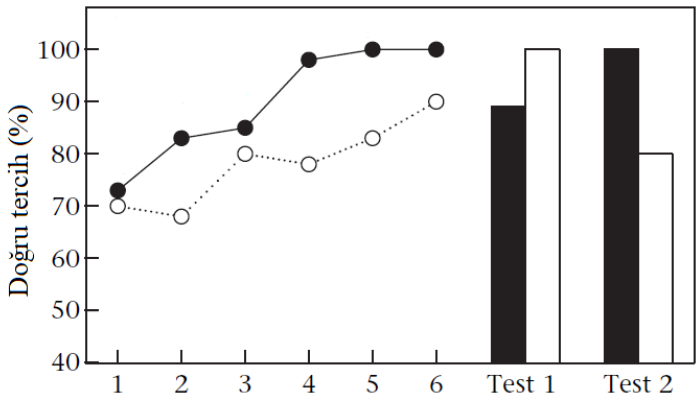


Şekil 2.16. Koşullandırma aşamasında tek bir koku uyaranı ve test aşamasında iki koku karışımı kullanılan denek *C. aethiops*'ların verdikleri yanıtlar görülmektedir (Bos vd., 2013).

Karıncalar kullanılan CS hangi koku uyaranı olursa olsun 2-oktanona doğru genellemede bulunmuşlardır. Bu durum koku uyaranının yani 2-oktanonun *C. aethiops*'lar için doğal işlevi olan bir uyaran olduğunu düşündürmüştür. Bu düşünceyi destekler nitelikte bazı *Atta* cinsi karınca türlerinde 2-oktanonun alarm feromonunun bileşeni olduğu bulunmuştur (Moser, Brownlee & Silverstein, 1968).

Karıncaların öğrenme ve ayırt etme performansları üzerine yapılan başka bir çalışmada iki ülkeden iki farklı tür *Camponotus fellah* (İsrail) ve *Camponotus mus* (Arjantin) kullanılmıştır (Dupuy, Sandoz, Giurfa & Josens, 2006). Serbestçe hareket edebilecekleri bir Y-labirenti içinde iki farklı koku uyaranını (limonen-oktanol / heptanal-2-heptanon) sukroz ve kinin ile eşleştirebilmeleri amaçlanan karıncalar ayrı

ayrı her iki koku uyaranıyla da koşullandırma denemesine tabi tutulmuşlardır. Koku uyaranları kimyasal formülleri bakımında birbirine yakın (heptanal ve 2-heptanon) ve uzak (limonen ve oktanol) olarak ikiye ayrılmış ve denemelerde bu şekilde koşullandırma yapılmıştır. Koku uyaranlarından biri sukroz çözeltisi (ödül) ile diğeri kinin (ceza) ile eşleştirilmiş ve farklı bir eşleştirme sırasında kokular yer değiştirilmiştir. Deney sırasında karıncaların yuva arkadaşlarıyla olan iletişimini sıfırlamak ve deney sistemine bıraktıkları kimyasal koku izlerini ortadan kaldırmak için her eğitim sırasında tek bir karınca eğitime sokulmuş ve yürüdükleri zemin bir sonraki eğitim seansı için değiştirilmiştir. Koşullandırma sırasında *C. mus* türü karıncalar kimyasal formülleri bakımından birbirine uzak olan ve ödül ile eşleştirilen limoneni tercih olarak seçmişlerdir. Eğitimlerden sonra deneme aşamasında da bu tercihi tekrar yaptıkları gözlemlenmiştir. Kimyasal formülleri benzer olan kokular arasında da yine sukroz ile eşleştirilen heptanalı tercih ettikleri ve deneme aşamasında da bu tercihi tekrar yaptıkları gözlemleniştir. *C. fellah* türü karıncalar limonen için *C. mus* türünün verdiği yanıtlarla paralel sonuçlar göstermiştir fakat 2-heptanonu her iki eğitimde de tercih olarak seçmişlerdir. Bu durum *C. mus* türünün verdiği yanıtlardan göz ardı edilemeyecek kadar farklı çıkmıştır (Şekil 2.17)

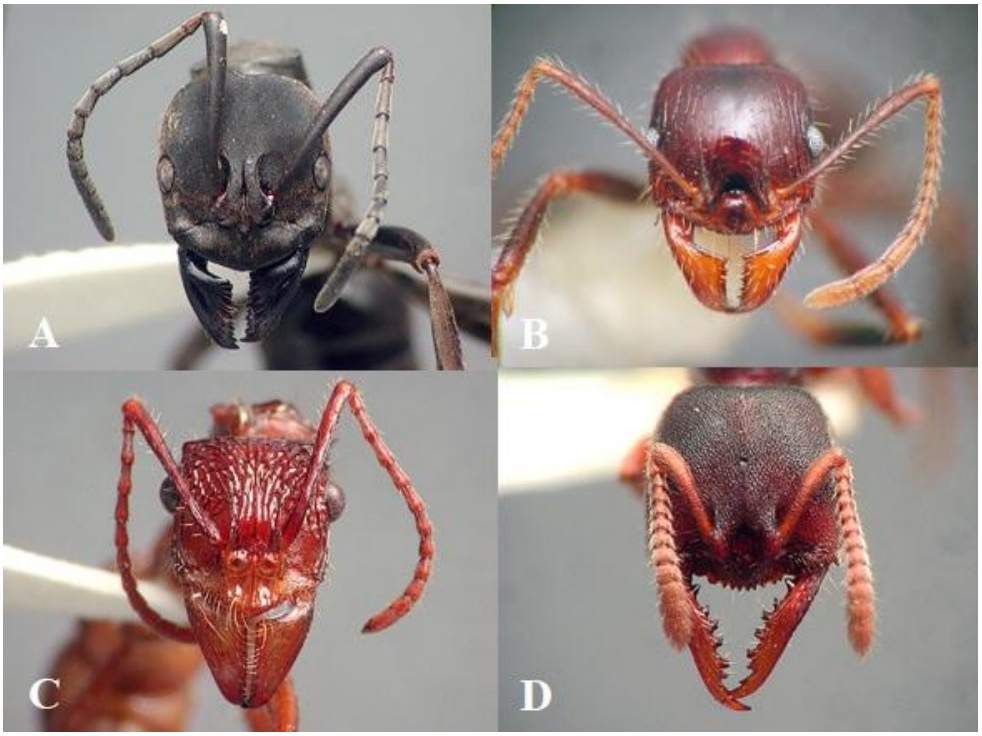


Şekil 2.17. *C. fellah* türü karıncaların eğitim aşamasında ve deneme kısmında ödül ile ilişkilendirilen kokudan ziyade 2-heptanonu tercih ettikleri görülmektedir (Eğitim seansında siyah yuvarlaklar heptanalı, beyaz yuvarlaklar 2-heptanonu temsil etmektedir. Ayrıca Test 1 kısmındaki siyah sütun heptanalı beyaz sütun 2-heptanonu, Test 2 kısmındaki siyah sütün 2-heptanonu beyaz sütun heptanalı temsil etmektedir) (Dupuy vd., 2006).

2.10. MOR Yanıtı

Karıncalar bir tehlikeyle karşılaştıkları zaman agresif davranışlarda bulunurlar ve bu agresif davranışın yanıtı olarak güçlü mandibüllerini kullanırlar. Mandibüller birçok böcek türü için önemli bir organdır fakat diğer türler karıncalar kadar aktif kullanmazlar. Karıncaların mandibül yapıları türden türe değişiklik gösterir ve çok farklı morfolojilere sahiptirler (Şekil 2.18).

.

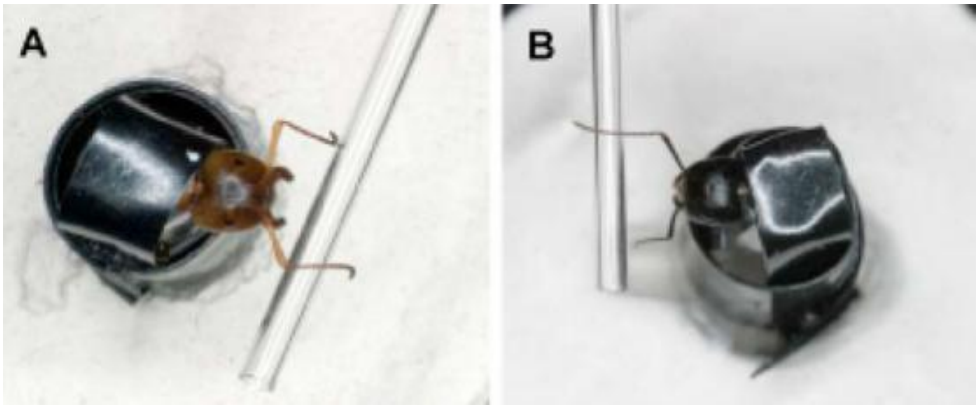


Şekil 2.18. Karıncaların mandibül çeşitliliği (A: *Ponerinae* B: *Myrmicinae* C: *Ectatomminae* D: *Amblyoponinae*).

Doğada pek çok tür birbirleriyle etkileşim içinde yaşar ve etkileşim halinde olan canlılar kimi zaman farklı tür kimi zaman da aynı tür olabilirler. Karınca kolonileri ekolojik ortamda birbirine yakın olabilir ve yakın olan bu kolonilerin bireyleri aynı türler olduğu gibi farklı türlerde olabilirler. Ne kadar yakın yerleşim yerine sahip olsalar da karınca kolonilerinin kimyasal izleri farklılık gösterir. Başka bir türün ya da koloninin kimyasal koku izinin diğer karıncalar tarafından algılanması saldırgan davranışı tetikler niteliktedir. Bölgelerini savunmak ve istenmeyen misafirleri tehdit etmek amacıyla karıncalar mandibüllerini açarlar (Guerrieri ve d'Ettorre, 2008). Sosyal

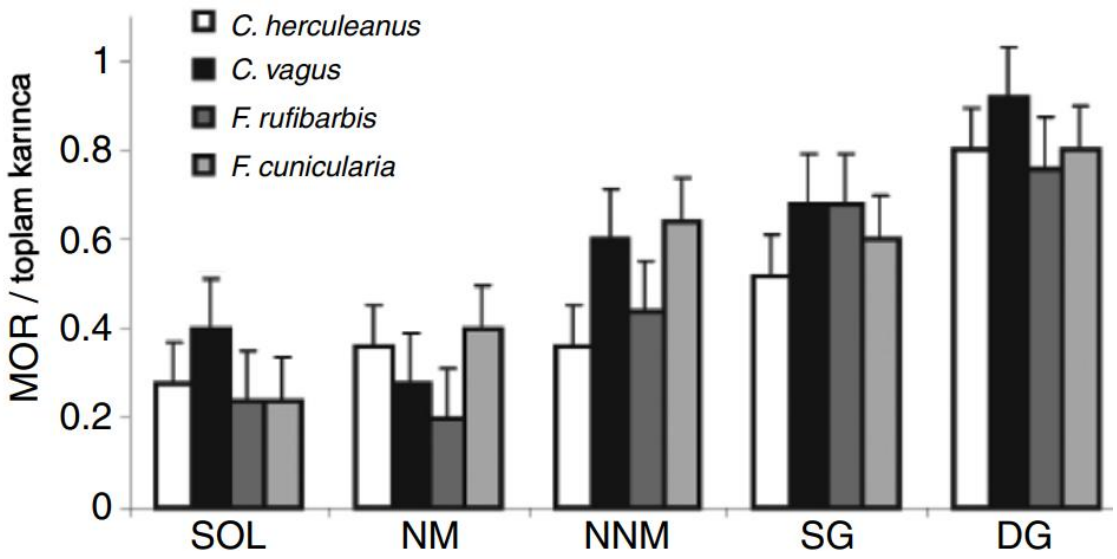
böcekler parazitizme ve dışarıdan gelen diğer türlere karşı etkili bir koruma sağlayan tanıma sistemleri ile anılırlar. Özellikle karınca kolonileri, aynı veya farklı türden bireylerin istenmeyen misafirlerine karşı bölgelerini agresif bir şekilde savunurlar (Hölldobler ve Wilson, 1990). Diğer birçok böcek türünde olduğu gibi karıncalar da yuva ve yuva arkadaşı olmayan bireyleri tanımak için kutikular hidrokarbon profillerini kullanırlar.

Yapılan bir çalışmada karıncaların MOR yanıtının hangi durumlarda pik yaptığı anlaşılmaya çalışılmıştır (Guerrieri ve d'Ettorre, 2008). Deneyde *Camponotus herculeanus, C. vagus, Formica rufibarbis* ve *F. cunicularia* işçileri kullanılmıştır. Bu işçi karıncaların kutikular ekstraktları elde edilmiş ve her bir tür; yuva arkadaşı bireylerin, aynı tür olup yuva arkadaşı olmayan bireylerin, aynı cinsten başka tür bireylerin ve farklı bir cinsin bireylerinin kutikular ekstraktlarıyla test edilmiştir. Saldırganlığı ölçmek için yukarıda bahsedilen ekstraktlarla beraber çözücü madde kullanılmıştır. Denek karıncalar mandibülleri ve antenleri dışarıda kalacak şekilde sabitlenmiş ve test aşamasına alınmıştır (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. Karıncanın deney sırasındaki durumu ve MOR yanıtı. A: MOR+ B: MOR- (Guerrieri & d'Ettorre, 2008).

Karınca türlerinin her bireyine kutikular uyaranlar verilmiş ve davranışları gözlemlenmiştir (Şekil 2.20).

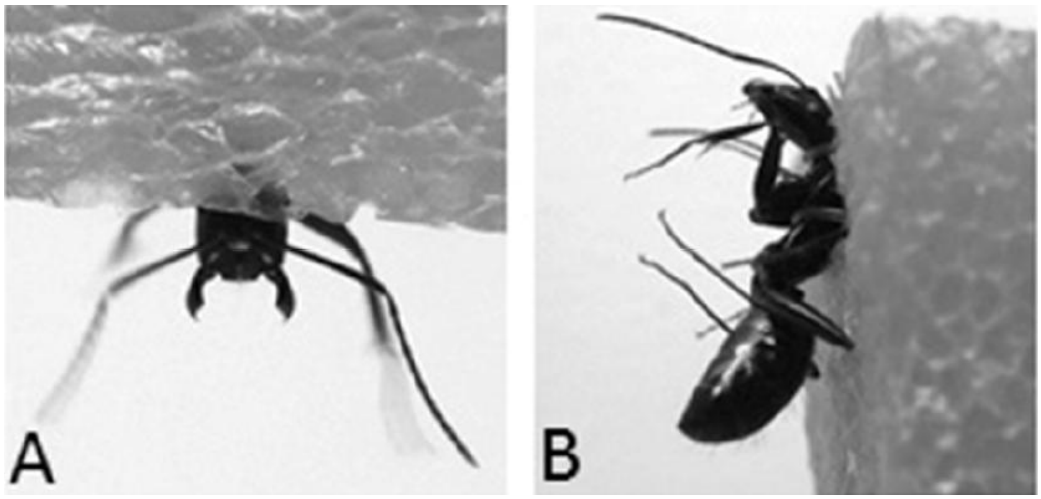


Şekil 2.20. Denek karınca türlerinin verilen kutikular uyaranlar sonucunda MOR yanıtları grafik olarak verilmiştir (SOL: çözücü madde. NM: yuva arkadaşı. NNM: yuva arkadaşı olmayan. SG: aynı cinsin farklı bir türü. DG: farklı cins) (Guerrieri & d'Ettorre, 2008).

Elde edilen sonuçlar, karıncaların sunulan her bir kutikular uyarana karşı MOR yanıtında değişkenlik olduğunu ortaya koymuştur. Karıncalar, yuva arkadaşı olan bireylere nazaran aynı türden yuva arkadaşı olmayan bireylere daha büyük MOR yanıtında bulunmuşlardır. MOR yanıtının en fazla görüldüğü durum farklı cins bireylerden elde edilen kutikular ekstraktlara karşı olmuştur. *C. herculeanus* türünün NM ve NNM arasında önemli bir ayrım yapmadığı da anlaşılmıştır (Guerrieri & d'Ettorre, 2008).

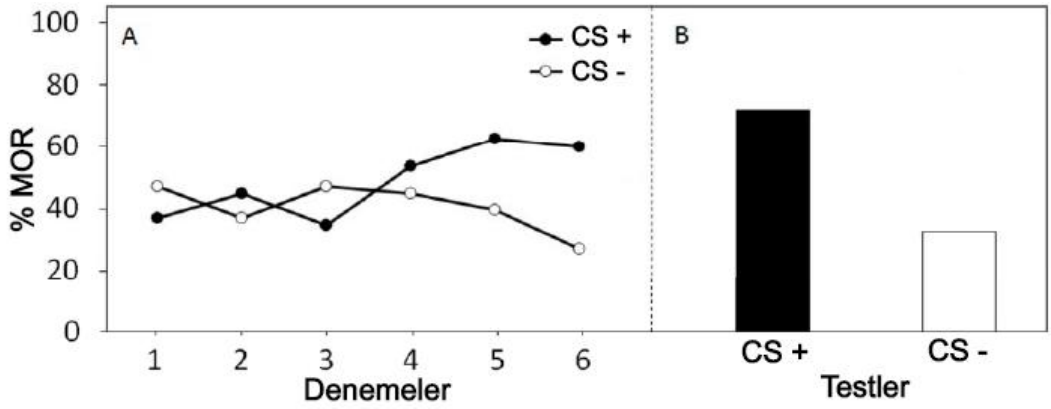
Arılarda olduğu gibi karıncaların da aversiv davranışları Pavlov'un klasik koşullandırma protokolü referans alınarak çalışılmıştır. MOR yanıtı üzerine yapılan başka bir çalışmada karıncaların yüksek sıcaklık ve koku uyaranları arasında ilişki kurup davranışsal yanıt olarak MOR sergileyip sergilemedikleri incelenmiştir (Desmedt, Baracchi, Devaud, Giurfa & d'Ettorre, 2017). Yüksek sıcaklık değerlerinin aversiv davranışa olan etkisi bal arılarında çalışılmış ve sternit, tergit ya da arka ekstremitelerin sıcaklıkla uyarılması sonucu denek hayvanların saldırgan davranışta bulunduğu gözlemlenmiştir (Junca, Carcaud, Moulin, Garnery & Sandoz, 2014). Araştırmacıların

yaptığı bu deneyde de karıncalar için MOR yanıtı oluşturabilecek uygun sıcaklık değeri, üç vücut bölgesi 25°'den uyarılmaya başlanarak 85°'ye kadar kademeli olarak arttırılmış ve verilen yanıtların analizi yapılarak en uygun sıcaklık değeri bulunmuştur (75°). CS olarak oktanol ve 1-heksanol US olarak da 75° ısı kullanılmıştır. *Camponotus aethiops* işçileri kullanılan deneyde MOR yanıtını görmek amacıyla denek karıncalar toraks ve gaster kısmından iplerle sabitlenmiştir (Şekil 2.21).



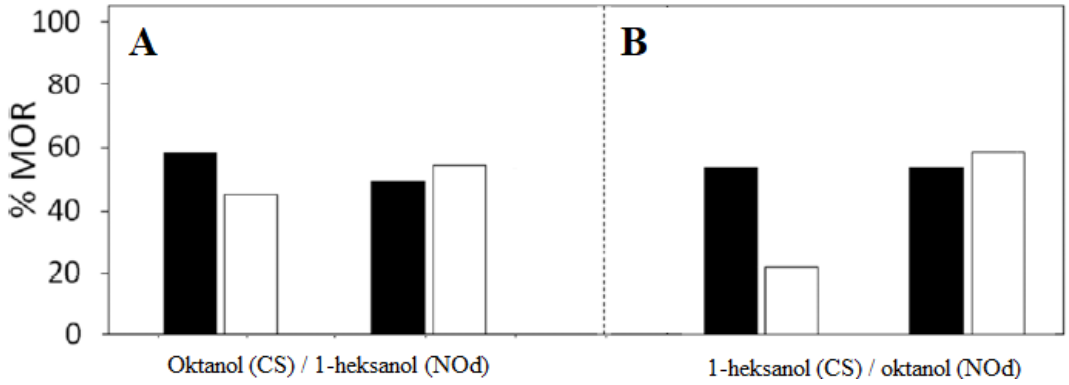
Şekil 2.21. *Camponotus aethiops* işçisinin sabitlenmiş hali (B) ve sergilediği MOR yanıtı (A) görülmektedir (Desmedt vd., 2017).

Karıncalar deney ortamına alışabilmeleri için karanlık bir kutu içinde, sabitlendiği şekilde 3 saat boyunca bekletilmişlerdir. Karıncalar güçlendirilmiş (CS+), güçlendirilmemiş (CS-), eşleştirilmiş ve eşleştirilmemiş grup olarak ayrı ayrı eğitim denemelerine alınmışlardır. Koşullandırma denemelerinde NS uyaranı karınca antenine doğru verilmiş ve sonra karıncaların arka ekstremitelerine 75°'lik US 1 saniye boyunca uygulanmıştır. Eğitim seanslarından 10 dakika sonra karıncalar sadece NS varlığında test edilmişlerdir. Karıncaların eğitim denemelerinde güçlendirilmiş uyarana verdikleri yanıtları sonraki test aşamasında da sergilediği gözlemlenmiştir (Şekil 2.22).



Şekil 2.22. Güçlendirilmiş ve güçlendirilmemiş gruplardaki karınca işçilerinin verdiği yanıtlar görülmektedir. Denemelerden sonraki aşamada oktanol ve 1-heksanola karşı verilen yanıtlar karıncaların kokuya karşı koşullandığını göstermektedir (Desmedt vd., 2017).

Eşleştirilmiş ve eşleştirilmemiş gruplar üzerinde yapılan deneylerin sonucunda biraz farklılıklar oluşmuştur. Oktanol ile eğitim denemelerine alınan eşleştirilmiş ve eşleştirilmemiş gruplar deneme aşamasında yeni kokuya (heksanol) karşı da MOR yanıtında bulunmuştur (Şekil 2.23).



Şekil 2.23. Eğitimden 10 dakika sonra yapılan testlerde karıncaların eşleştirildikleri ve yeni kokuya verdikleri yanıtlar görülmektedir (siyah dikdörtgenler eşleştirilmiş beyaz dikdörtgenler eşleştirilmemiş grubu temsil etmektedir) (Desmedt vd., 2017).

Karıncaların yeni kokuya karşı MOR yanıtında bulunmaları iki koku uyaranı arasında genelleme yapıyor olmasından kaynaklanmıştır. Genel olarak MOR koşullandırmasında, güçlendirilmiş gruplar eşleştirilmiş gruplardan öğrenme ve bilgiyi kısa süreli tutma konularında daha başarılı olmuşlardır (Desmedt vd., 2017).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

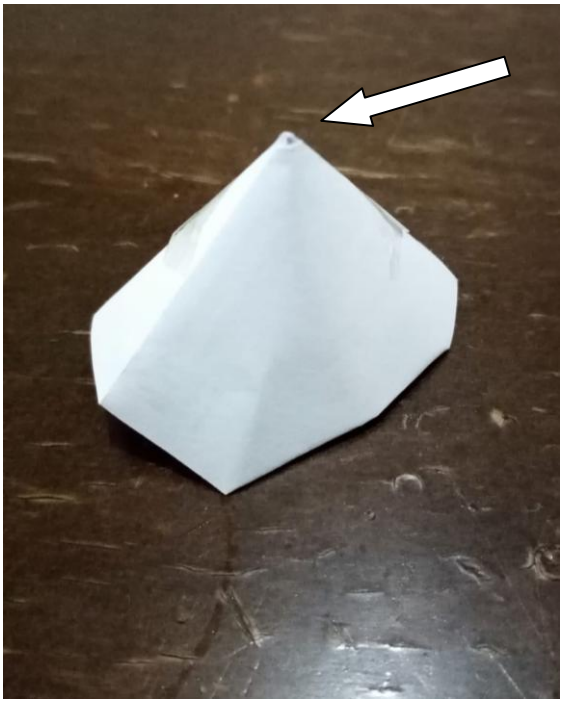
3.1. Denek Karıncalar

Çalışmada *Formica clara* Forel, 1886 (Hymenoptera: Formicidae) türü karıncalar kullanılmıştır. Edirne şehir merkezi sınırları içerisinde, Meriç Nehri kıyısındaki açıklık bir alanda (N 41°37'41.4", E 26°34'50.7") tespit edilen bir koloniden yeterli sayıda (900-1000) işçi karınca orijinal yuva materyali ile birlikte alınmış ve büyük plastik bir kap içerisinde deneylerin gerçekleştirileceği Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde kurulu olan Davranış Ekolojisi Laboratuvarındaki iklim odasına taşınmıştır. Karıncaların kaptan dışarıya kaçmalarını engellemek için kabın tüm yan duvar yüzeyleri ince bir Fluon [poly(1,1,2,2-tetrafluoroethylene)] (Sigma-Aldrich) tabakası ile kaplanmıştır. Deney öncesi alışma döneminde ve deney süresince karıncalara optimum çevresel şartları sağlayabilmek amacıyla iklim odası 12-12 saat karanlık-aydınlık döngüsüne, ortalama 28°C'lik ortam ısısına ve %50 nispi nem değerine sahip olacak şekilde dizayn edilmiş ve bu yapay koşullar tüm çalışma süresince sabit tutulmuştur. İklim odasına transfer edilen karıncaların 1 ay boyunca laboratuvar koşullarına alışmaları beklenmiştir. Bu süre zarfında karıncalara beslenmeleri için 0.5 M sukroz çözeltisi ve protein kaynağı olarak haftada 2 kez ölü böcek verilmiştir. Koloninin su ihtiyacının karşılanması için yuva üzerinde uygun bir yere plastik bir kap içerisinde su emdirilmiş pamuk konulmuş ve gerektiği zaman yuvanın üzeri su ile nemlendirilmiştir. Alışma periyodunun sonunda deneysel aşamaya geçilmiştir.

3.2. Denek Karıncaların Hazırlanması

Deneylere dahil edilecek işçi karıncalar deney öncesinde 1 hafta süre ile aç bırakılmış ve beslenme konusunda motive olmaları sağlanmıştır. Bir fırça yardımı ile yuvadan rastgele seçilip alınan bir karınca plastik bir deney tüpü içerisine konulmuştur. Daha sonra bu plastik tüp içi buz dolu bir kap içerisine yerleştirilmiş ve 3-5 dakika süre ile karıncanın hareketlerinin yavaşlaması sağlanmıştır (anestezi işlemi). Anestezi süresi sonunda karınca tüpten çıkarılmış ve tüm deney boyunca tutsak bir şekilde kalacakları taşıyıcılara aktarılmıştır.

Taşıyıcı olarak ¼'ü kesilmiş küçük kare kağıtlar kullanılmıştır. Kesilen kağıtlar katlanarak uç kısmı açık koni şekline getirilmiş ve anestezi işlemi yapılan karıncanın baş kısmı kağıdın kesilen uç tarafından dışarıya çıkacak şekilde yerleştirilmiş ve bir bant kullanılarak antenleri ve ağız organları serbest kalacak şekilde karıncanın başı sabitlenmiştir (Şekil 3.1). Taşıyıcının açık olan alt tarafına bir parça pamuk koyulmuş ve karıncanın bacakları bu pamuk parçası üzerine oturmuştur. Deneylere katılacak tüm karıncalar için aynı işlem uygulanmıştır. Karınca içeren taşıyıcılar koşullanma eğitiminin ve testlerin yapılacağı bir stereo mikroskobun tablası üzerine yerleştirilmiş ve maruz kaldıkları tutsak ortam şartlarına uyum sağlamaları için 3 saat dinlenme pozisyonunda bekletilmişlerdir.



Şekil 3.1. Karıncaların deney boyunca tutsak kaldıkları konik taşıyıcılar.

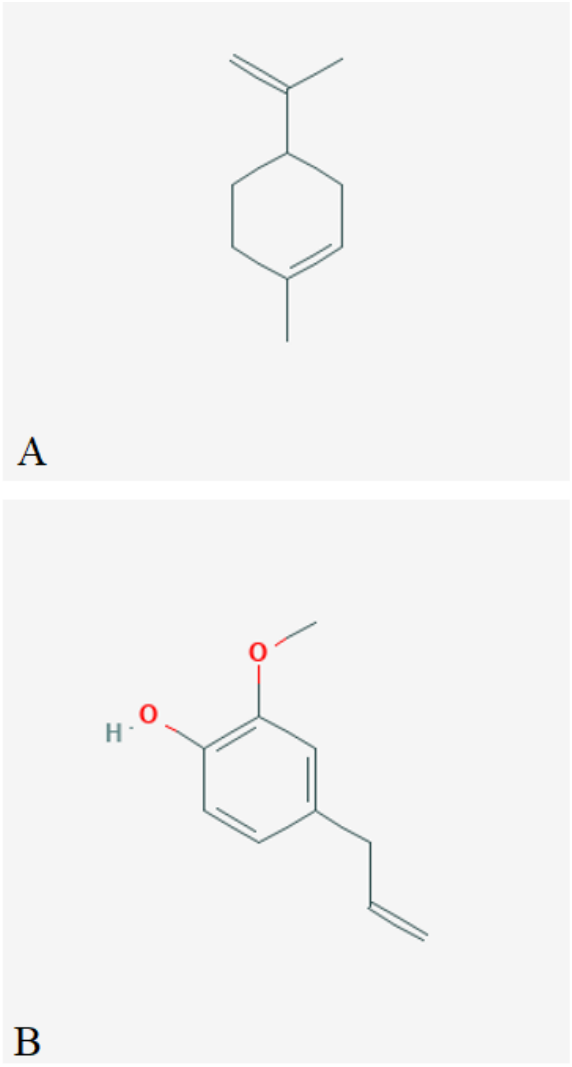
Tutsak koşullara alışma süresi sonunda her bir karıncanın antenlerine, ucuna sarılı küçük bir pamuk parçasına 0.5 M sukroz çözeltisi emdirilmiş tahta bir çubuk dokundurulmuş ve karıncaların ağız organlarını dışarıya çıkarıp çıkarmadıkları (MaLER+) test edilmiştir. Bu şekilde karıncalar arasında beslenme konusunda motive olanlar ve olmayanlar diye bir ayırım yapılabilmiştir. Testi geçen MaLER+ karıncalar sonraki aşamalara dahil edilmiş, testi geçemeyen MaLER- karıncalar ise yuvalarına geri konulmuştur.

3.3. Deneysel Yöntem

3.3.1. Koşullanma

Motivasyon testini geçen karıncalar besin ödülü ile (koşulsuz uyaran – unconditioned stimulus – US) bir koku uyaranı (koşullu uyaran – conditioned stimulus – CS) ilişkilendirme yönünde bir eğitime tabii tutulmuşlardır. Koşulsuz uyaran olarak 0.5 M sukroz çözeltisi, koşullu uyaran olarak ise limonen ($C_{10}H_{16}$) ve eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$) kullanılmıştır (Şekil 3.2). Koşullanma ve takip eden testlerin tümü uygulama kolaylığı sağlanması için stereo mikroskop altında gerçekleştirilmiştir. Koşullanma sürecine alınan bir karıncanın antenlerine ilk aşamada limonen veya

eugenol uygulaması yapılmış (CS uygulaması) ve hemen ardından antenlerine ucundaki pamuğa sukroz çözeltisi emdirilmiş tahta çubuk dokundurulmuştur (US uygulaması), ardından karıncanın sukroz çözeltisini yalaması sağlanmıştır. CS uygulanması için 10 µl'lik bir hacimce limonen veya eugenol küçük bir kurutma kağıdına emdirildikten sonra 10 ml'lik plastik bir şırınga içine yerleştirilmiş ve şırınganın ağız kısmı uzun silikon bir boru yardımı ile içerisine kontrollü olarak hava gönderecek kapalı sistem bir düzeneğe bağlanmıştır. Kapalı sistem düzeneğin oluşturulması için plastik bir kutunun bir yüzeyine bir bilgisayar fanı bağlanmış, karşı yüzeye açılacak bir deliğe de fan yardımı ile kutu içerisinde oluşturulacak hava akımını şırıngaya taşıyacak silikon boru yerleştirilmiştir (Şekil 3.3). CS uygulama süresini tüm deney süresince özdeş kılmak için fanın çalışması insan kontrollü bir açma-kapama düğmesi ile sağlanmıştır. Besin ile CS eşleştirmesi yapılırken içerisinde limonen veya eugenol emdirilmiş kurutma kağıdı bulunan şırınga, uç kısmı test platformuna yakın bir şekilde konumlandırılarak yerleştirilmiştir. Silikon boru ile şırıngaya bağlı kapalı sistem, kutu açma-kapama düğmesi kullanılarak manuel olarak çalıştırılmış ve 5 saniye süre ile şırınga içerisine hava göndermesi sağlanmıştır. CS uygulaması sonrasında (besin verilmeden önce) karıncanın maksilla ve labiumunun duysal parçalarının ağız dışına çıkması MaLER+, aksi durum ise MaLER- olarak kaydedilmiştir. Test platformunun karşı tarafına insan kontrollü, ters yönlü bir hava akımı oluşturacak bir fan yerleştirilmiş ve bu fan her bir CS-US eşleştirmesinden sonra çalıştırılmış, test platformuna uygulanan CS ve çevresel kaynaklı kontrol edilemeyen olası diğer tüm kokuların uzaklaştırılması sağlanmıştır. İlk koşullanma denemesi sonrasında karınca deney düzeneğinde bırakılmış ve 5 dakika süre ile dinlenmesi sağlanmıştır. Dinlenme süresi sonrasında deney düzeneğindeki karıncaya bir önceki koşullanma denemesindeki işlemler aynı şekilde uygulanmış ve ikinci koşullanma adımı tamamlanmıştır. Koşullanma sürecinin ilk denemesinden itibaren karıncaların MaLER+ ve/veya MaLER- yanıtları 5'er dakikalık aralıklarla kaydedilmiş ve bir karınca için koşullanma süreci CS uygulaması sonrasında ardışık 3 kez MaLER+ yanıt verdiğinde sonlandırılmıştır. Koşullanmaya katılan tüm karıncalara ait denemeler ve bu denemelerdeki MaLER+ ve MaLER- yanıtların frekansı kullanılarak limonen ve eugenol için ayrı ayrı öğrenme eğrileri çıkarılmıştır. Koşullanma sonunda karıncalar 4 farklı teste tabii tutulmuşlardır.



Şekil 3.2. Koşullu uyaran olarak kullanılan kimyasalların 2D kimyasal yapıları (A: limonen. B: eugenol).



Şekil 3.3. Çalışmaların yapıldığı deneysel düzenek.

3.3.2. Testler

Koşullanma sonrasında karıncalar US'nin olmadığı sadece CS'nin olduğu koşullarda MaLER yanıtın ortaya çıkıp çıkmadığı konusunda test edilmişlerdir. Her bir karınca koşullanmayı takip eden 15., 60., 75. ve 90. dakikalarda birer kez olmak üzere toplam dört kez test edilmiştir. 15., 60. ve 90. dakikalardaki testlerde sadece koşullandırıldıkları CS uygulaması yapılmış ve MaLER+ ve MaLER- yanıtları kaydedilerek ilişkili öğrenme hafızalarına dair geri çağırma performansları, diğer bir ifadeyle kısa süreli hafızaları da test edilmiştir. 75. dakikada yapılan testte ise limonen ile koşullandırılan karıncalar eugenol varlığında, eugenol ile koşullandırılan karıncalar ise limonen varlığında test edilerek koku uyaranları arasında bir genelleme yapıp yapmadıkları test edilmiştir. 15. ve 60. dakikalardaki testler sonunda test edilen karıncanın motivasyonunun düşmemesi amacıyla çok kısa bir süreliğine beslenmesi sağlanmıştır. 75. dakikada gerçekleştirilen 3. test sonunda ise besin ödülü verilmemiştir.

3.4. Verilerin Analizi

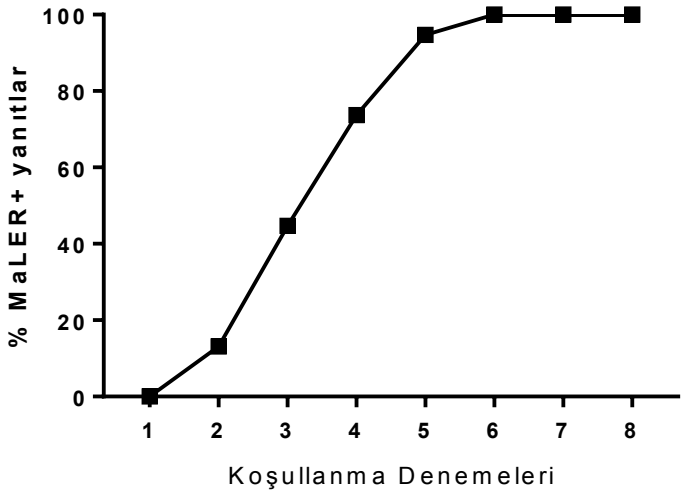
Karıncaların farklı testlerdeki MaLER+ yanıt frekanslarının birbirlerinden istatistiki olarak farklı olup olmadıkları Fischer's Exact Test ile analiz edilmiştir. Fischer's Exact Test ise GraphPad Prism (Intutive Software for Science, San Diego, CA) paket programında yapılmıştır.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

4.1. Limonen İle Koşullanma Deneyi Sonuçları

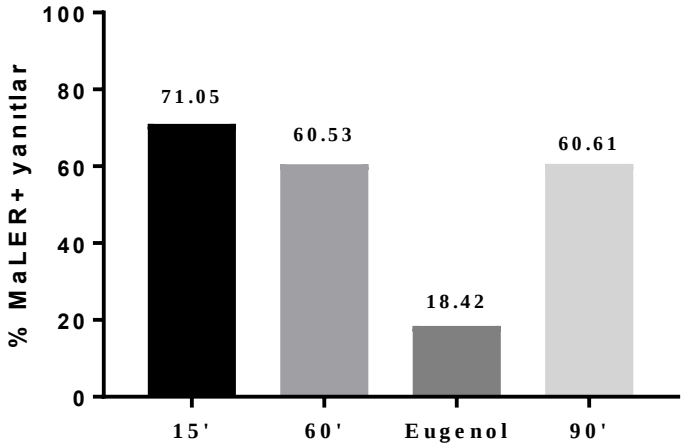
CS olarak limonen kullanılarak koşullandırılan karıncaların (n=38) koşullanma sürecindeki MaLER+ yanıtlarını gösterir öğrenme eğrisi Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Limonen koşullandırması öğrenme eğrisi. Karıncaların (n=38) sergiledikleri MaLER + yanıt frekansları her bir koşullandırma denemesi (1-8) için % olarak verilmiştir.

Limonen koşullandırması sürecinde ardışık olarak 3 kez MaLER+ yanıt gösteren karıncalar ile gerçekleştirilen koku hafızası ve koku genellemesi testlerinde karıncaların gösterdikleri MaLER + yanıt frekansları Şekil 4.2.'de verilmiştir. 15., 60. ve 90. dakikalardaki testler arasındaki fark istatistiki olarak anlamsızdır (Fischer's Exact Test, $p>0.05$). Bu 3 testteki MaLER + yanıt frekansları %50 'den de farklı değildir (Fischer's

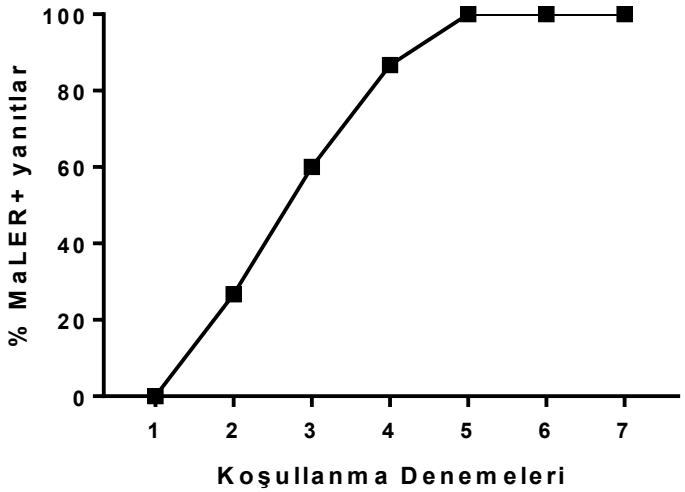
Exact Test, 15. dakika için P=0.0580, 60. dakika için P= 0.4892 ve 90. dakika için P> 0.999). Diğer taraftan, limonen ile gerçekleştirilen 3 hafıza testindeki MaLER + yanıt frekansları eugenol ile gerçekleştirilen koku genellemesi testindeki MaLER + yanıt frekansından istatistiki olarak anlamlı derecede farklıdır (Fischer's Exact Test, $p<0.05$).



Şekil 4.2. Limonen koşullandırması sonrasında karıncaların (n=38) koku hafızası ve koku genellemesi testlerinde sergiledikleri MaLER + yanıt frekansları.

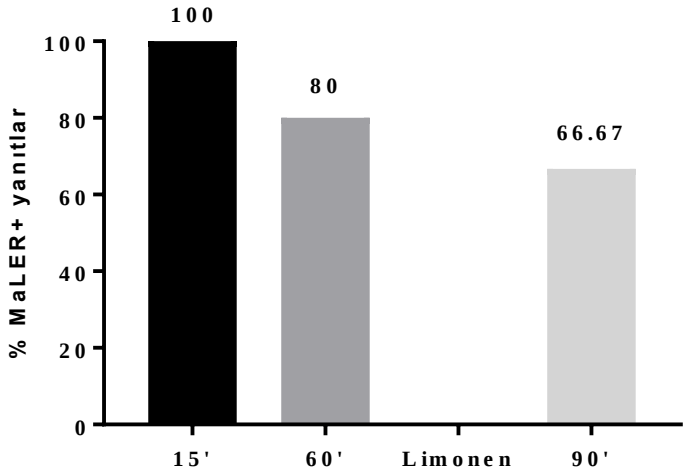
4.2. Eugenol İle Koşullanma Deneyi Sonuçları

CS olarak eugenol kullanılarak koşullandırılan karıncaların (n=15) koşullanma sürecindeki MaLER + yanıtlarını gösterir öğrenme eğrisi Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Eugenol koşullandırması öğrenme eğrisi. Karıncaların (n=16) sergiledikleri MaLER + yanıt frekansları her bir koşullandırma denemesi (1-7) için % olarak verilmiştir.

Eugenol koşullandırması sürecinde ardışık olarak 3 kez MaLER+ yanıt gösteren karıncalar ile gerçekleştirilen testlerde karıncaların sergiledikleri MaLER+ yanıt frekansları Şekil 4.4.'de verilmiştir. 15. ve 60. dakikalardaki testler arasındaki fark istatistiki olarak anlamsızdır (Fischer's Exact Test, $p>0.05$). 15. dakikadaki testteki MaLER + yanıt frekansları %50 'den farklıdır (Fischer's Exact Test, $P=0.0024$). Eugenol ile gerçekleştirilen 3 hafıza testindeki MaLER+ yanıt frekansları limonen ile gerçekleştirilen koku genellemesi testindeki MaLER+ yanıt frekansından istatistiki olarak anlamlı derecede farklıdır (Fischer's Exact Test, $p<0.001$).



Şekil 4.4. Eugenol koşullandırması öğrenme eğrisi. Karıncaların (n=16) sergiledikleri MaLER + yanıt frekansları her bir koşullandırma denemesi (1-8) için % olarak verilmiştir.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Tutsak koşullarda MaLER yanıt temelli olfaktoriyal ilişkili öğrenme performansları bakımından eğitilip test edilen *Formica clara* işçilerinin eğitim boyunca verdikleri MaLER+ yanıtlara göre hazırlanan öğrenme eğrileri, işçilerin kullanılan limonen ve eugenole karşı, besin ödüllü olmak şartıyla, çok hızlı koşullandıkları ve bu koşullanmayı takiben gerçekleştirilen kısa ve orta süreli hafıza testlerinde de anlamlı bir şekilde MaLER+ yanıt verdikleri tespit edilmiştir. Bu sonuç işçi karıncaların besin ödülü varlığında, kullanılan koşullu uyaranın ne olduğundan bağımsız olarak, hızlı öğrendiklerini ve bu öğrenmenin koşullu uyaran temelinde mutlak olduğunu göstermektedir. Diğer bir ifadeyle, limonen ile koşullandırılan işçiler eugenol ile test edildiklerinde eugenole, eugenol ile koşullandırılan karıncalar da limonen ile test edildiklerinde limonene karşı MaLER+ yanıt vermemişlerdir. İlişkili öğrenme ile ilgili daha önce bal arıları ile gerçekleştirilen çalışmalar arıların eğitim esnasında tek bir uyaranla karşılaşıp (mutlak öğrenme) daha sonra ikili koşullarda test edildiklerinde iki uyaran arasındaki seçim başarılarının görece olarak düşük olduğunu ortaya koymuştur (Giurfa, 2004). Aksine, iki uyaran varlığında eğitilen (ayırımsal öğrenme) arıların testlerdeki ayırım başarıları görece olarak daha iyi çıkmıştır. Buna göre, karıncaların kullanılan limonen ve eugenole karşı mutlak koşullanmaları bu kimyasallara yönelik bir genelleme yapılmadığının da bir kanıtıdır. Genelleme, çoğu öğrenme sürecinde olduğu gibi ilişkili öğrenmenin de önemli bir özelliğidir. Organizmaların karşılaştıkları ve ilişkili öğrenme süreci ile hafızalarına kaydettikleri çeşitli uyaranların ortaya çıkardıkları koşullu yanıtlar, eğitim uyaranına fiziksel anlamda benzeyen başka uyaranlarla da ortaya çıkarılabilmektedir (Bos, Roussel, Giurfa & d'Ettorre, 2014). Ancak bu genellemenin uyaranlar arasındaki benzerlik miktarının azalmasıyla doğru

orantılı olarak azalmaya başladığının da altı çizilmelidir. Çalışmada kullanılan limonen ve eugenol 10 C atomuna sahip kimyasallardır ve her ikisi de bitki kökenlidir. Her ne kadar kullanılan karınca türünün bitki kaynaklı bir beslenme stratejisi olmadığı düşünülse de, av olarak kullanılabilecek omurgasızları elde etmek veya bal özü almak için bitki bitlerine ulaşmak için bitkileri ziyaret etmeleri bu kimyasalları yaşamlarında karşılaştıkları birer kimyasal yapabilir. Kaldı ki, bazı insektisitlerin *d*-limonen içerdikleri bilinmektedir (Verza, Nagamoto, Forti, & Noronha, 2011). Bu maddenin yaprak kesen karıncalardan *Atta cephalotes* ve *Acromyrmex octospinosus*'a karşı itici etkisi olduğu tespit edilmiştir (Littledyke & Cherrett, 1976). Limonen için bahsedilen bu iticiliğin bir benzeri hamamböceği türleri olan *Blattella germanica*, *Periplaneta americana* ve *P. fuliginosa* için de deneysel olarak gösterilmiştir (Yoon vd., 2009). Bu bakımdan değerlendirildiğinde, limonen ile besin ödüllü koşullanma bir taraftan karıncaların da bu kimyasala karşı yüksek duyarlılığa sahip olabilecekleri öngörülürse akla yatkın gelmekte, limonenin aversif olma özelliği düşünüldüğünde de besin ilişkili öğrenme konusunda karıncaların başarısız olmaları beklenmelidir. Göksineklerin PER yanıtları ile ilgili yapılan deneylerde sineklerde PER yanıtına neden olacak seker çözeltisinin konsantrasyonunun ortamda D-limonen varlığında anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir (Nishimura vd. 2005). Çok küçük bir damla D-limoneni sindirim yoluyla aldıklarında hemen ölüyor olmaları, limonenden neden uzak durulması gerektiğini de göstermektedir. D-limonenin ateş karıncası *Solenopsis invicta* üzerinde fumigant aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Hu vd., 2017). Dahası, *Myrmicaria natelensis* türü karınca işçilerinin ürettikleri zehir içeriğinde %80 oranında *d*-limonen, %20 oranında da *l*-limonen var olduğu tespit edilmiştir (Quilico vd., 1960). *Myrmicaria eumenoides* karıncalarında da avlanma esnasında av bölgesine daha fazla sayıda karıncanın cezbedilmesi için salgılanan alarm feromonunda neredeyse %97'lik bir kısmını limonen oluşturmaktadır (Kaib ve Dittebrand, 1990).

Sonuçlar *F. clara* işçilerinde öğrenme hızı ile ilgili de önemli veriler ortaya koymaktadır. Bal arıları ile yapılan çalışmalar bir koku uyaranı ile bir besin ödülünün bir kez ilişkilendirilmesinin protein sentezini de gerektiren uzun süreli bir hafıza oluşumuna neden olmadığına işaret eden veriler ortaya koymuş olsa da Villar, Marchal, Viola & Giurfa (2020)'nin yine bal arıları ile yaptıkları ilişkili öğrenme çalışmaları, arılarda tek bir eşleştirme ile de olsa uzun süreli bir hafıza oluşabileceğini ve öğrenilmiş

ilişkinin 3 gün hafızada tutulabileceğini göstermiştir. Bu bakımdan değerlendirildiğinde, arıların hem hızlı öğrendikleri hem de uzun süre unutmadıkları söylenebilir. Piqueret, Sandoz & d'Ettore (2019)'un *F. fusca* türü karınca işçilerinin olfaktoriyal öğrenme, hafıza ve unutma performansları üzerine yaptıkları çalışma da bu türün çok hızlı öğrendiğini, öğrenilmiş bilgiye ilişkin hafızanın bal arılarında olduğu gibi 3 güne kadar sürebildiği ve sönmeye karşı oldukça dirençli olduğunu ortaya koymuştur. *F. clara* işçilerinin öğrenme eğrileri incelendiğinde, hem limonen hem de eugenol uyaranları için eşleştirmenin 3. adımından itibaren belirgin bir öğrenme performansının ortaya konduğu ve öğrenilmiş bilginin kısa ve uzun süreli hafızda depolanarak geri çağrılabildiği görülmektedir. Kullanılan yöntem öğrenilmiş bilginin sönmesine (unutulmasına) dair uzun süreli bir eğiliği test etmek amacıyla dizayn edilmemiş olsa da her iki uyaran ile 2 ve 3. hafıza testlerinde ortaya çıkan MaLER+ pozitif yanıtların yüzdesindeki düşüş unutmanın başladığı şeklinde düşünülebileceği gibi, sönmeye karşı bir direnç olduğunun dolaylı bir göstergesi de olabilir.

Organizmalar tarafından öğrenilmiş bilginin depolanması maliyet gerektiren sinirsel bir süreç olduğu için bireyler sadece çok önemli bilgileri hafızalarında depolarlar. Örneğin, ortamdaki belirli bir kaynağa ilişkin ön bilgi sağlayan bir uyaran zaman içinde önemini kaybedebilir ve bu kaynakla artık ilişkisi kurulmaz. Organizmalar için bu tarz bir uyaranın artık fayda sağlamayacağının bilinmesi faydalıdır. İşte unutma ya da öğrenilmiş ilişkinin sönmesi bu durumda önemlidir. Ancak sönme, organizmaların edindikleri hafızayı yok etmemektedir, aksine yeni bir öğrenme süreci olarak da tanımlanabilir. Bu nedenle iki farklı hafızanın aynı anda varlığı söz konusudur. Başarılı bir unutmadan sonra orijinal davranış yeniden ortaya çıkabilir (kendiliğinden geri kazanım).

Üzerinde durulması gereken bir diğer sonuç da koşullanma sonrası gerçekleştirilen testlerde karıncaların limonen ve eugenole karşı verdikleri MaLER+ yanıt yüzdelerinin karşılaştırılması ile ortaya çıkmaktadır. Her ne kadar her iki uyarana karşı da başarılı bir şekilde koşullanmış olsalar da denek karıncaların testlerdeki performansları karşılaştırıldığında eugenole karşı verilen yanıtın daha güçlü olduğu görülmektedir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.4). Limonen ile gerçekleştirilen ilk 2 hafıza testindeki başarı eugenol ile gerçekleştirilen hafıza testlerine göre görece olarak daha

kötüdür. Ancak buna rağmen, genelleme deneyi sonrası yapılan 3. hafıza testlerinde performansın oldukça düştüğü görülebilir.

Sonuç olarak, elde edilen bulgular ilişkili öğrenmenin böceklerdeki davranışsal yanıtların şekillenmesindeki önemi ve işleyişi ile ilgili önemli sonuçlar ortaya koymuştur. Karınca beyninde var olduğu öngörülen esneklik özelliğinin davranışsal esnekliğe de dönüşerek adaptif bir katkı sağladığı ortadadır. Kısa süreli hafıza ve koku genellemesi ile ilgili elde edilen sonuçlar karıncalardaki olfaktoriyal yanıtların oldukça etkin bir öğrenme sürecine katkı sağladığının da bir göstergesidir. Diğer taraftan, bal arıları ve sinekler gibi öğrenme temelli çalışmalarda model organizma olarak ele alınabilecek böcek gruplarına ilave olarak özellikle MaLER yanıtları aracılığı ile karıncalar da model organizma olmaya adaydırlar. Davranışsal olarak gerçekleştirilen öğrenme ve hafıza denemelerine katkı sağlayacak nörobiyolojik ve gen ifadesi çalışmalarının ilişkili öğrenmenin evrimi ve moleküler temeli ile ilgili çok sayıda bilinmeyeni açığa çıkaracağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

Aksoy, V., & Camlitepe, Y. (2018). Spectral sensitivities of ants–a review. *Animal Biology*, *68*(1), 55-73.

Avarguès-Weber, A., Deisig, N. & Giurfa, M.(2011). Visual cognition in social insects. *Annu. Rev. Entomol*, *56*, 423-443.

Battesti, M., Moreno, C., Joly, D., & Mery, F. (2012). Spread of social information and dynamics of social transmission within *Drosophila* groups. *Current biology*, *22*(4), 309-313.

Benard, J., Stach, S., & Giurfa, M. (2006). Categorization of visual stimuli in the honeybee *Apis mellifera*. *Animal Cognition*, *9*(4), 257-270.

Bitterman, M. E., Menzel, R., Fietz, A., & Schäfer, S. (1983). Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of comparative psychology*, *97*(2), 107.

Bos, N., d'Ettorre, P., & Guerrieri, F. J. (2013). Chemical structure of odorants and perceptual similarity in ants. *Journal of Experimental Biology*, *216*(17), 3314-3320.

Bos, N., Roussel, E., Giurfa, M. & d'Ettorre, P. (2014). Appetitive and aversive olfactory learning induce similar generalization rates in the honey bee. *Anim Cogn*, *17*, 399–406.

Busto, G. U., Cervantes-Sandoval, I., & Davis, R. L. (2010). Olfactory learning in *Drosophila*. *Physiology*, *25*(6), 338-346.

Camlitepe, Y., & Aksoy, V. (2010). First evidence of fine colour discrimination ability in ants (Hymenoptera, Formicidae). *Journal of Experimental Biology*, *213*(1), 72-77.

Camlitepe, Y., Aksoy, V., Uren, N., Yilmaz, A., & Becenen, I. (2005). An experimental analysis on the magnetic field sensitivity of the black-meadow ant *Formica pratensis* Retzius (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Biologica Hungarica*, *56*(3-4), 215-224.

Caron, S., & Abbott, L. F. (2017). Neuroscience: Intelligence in the Honeybee Mushroom Body. *Current Biology*, *27*(6), R220-R223.

Chittka, L., & Niven, J. (2009). Are bigger brains better?. *Current biology*, *19*(21), R995-R1008.

Coolen, I., Dangles, O., & Casas, J. (2005). Social learning in noncolonial insects?. *Current Biology*, *15*(21), 1931-1935.

Davis, R. L. (2001). Mushroom bodies, Ca^{2+} oscillations, and the memory gene amnesiac. *Neuron*, *30*(3), 653-656.

Desmedt, L., Baracchi, D., Devaud, J. M., Giurfa, M., & d'Ettorre, P. (2017). Aversive learning of odor–heat associations in ants. *Journal of Experimental Biology*, *220*(24), 4661-4668.

Dickinson, A. (2012). Associative learning and animal cognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *67*(1603), 2733-2742.

Dupuy, F., Sandoz, J. C., Giurfa, M., & Josens, R. (2006). Individual olfactory learning in *Camponotus* ants. *Animal Behaviour*, *72*(5), 1081-1091.

Erber, J. (1987). Functional roles of the mushroom bodies in insects. *Arthropod Brain*, 485-511.

Fahrbach, S. E. (2006). Structure of the mushroom bodies of the insect brain. *Annu. Rev. Entomol.*, *51*, 209-232.

Fernandes, A. S. D., Buckley, C. L., & Niven, J. E. (2018). Visual Classical Conditioning in Wood Ants. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (140), e58357.

Fujimura, K., Yokohari, F., & Tateda, H. (1991). Classification of antennal olfactory receptors of the cockroach, *Periplaneta americana* L. *Zoological science*, *8*(2), 243-255.

Giurfa, M. (2003). Cognitive neuroethology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Current opinion in neurobiology*, *13*(6), 726-735.

Giurfa, M. (2004). Conditioning procedure and color discrimination in the honeybee *Apis mellifera*. *Naturwissenschaften*, *91*(5), 228-231.

Giurfa, M. (2015). Learning and cognition in insects. *WIREs Cogn Sci* 2015. doi: 10.1002/wcs.1348

Giurfa, M., & Sandoz, J. C. (2012). Invertebrate learning and memory: fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learning & memory*, *19*(2), 54-66.

Giurfa, M., Zhang, S., Jenett, A., Menzel, R., & Srinivasan, M. V. (2001). The concepts of 'sameness' and 'difference'in an insect. *Nature*, *410*(6831), 930-933.

Graham, P., Philippides, A., & Baddeley, B. (2010). Animal cognition: multi-modal interactions in ant learning. *Current Biology*, *20*(15), R639-R640.

Gronenberg, W., Heeren, S., & Hölldobler, B. (1996). Age-dependent and task-related morphological changes in the brain and the mushroom bodies of the ant *Camponotus floridanus*. *Journal of Experimental Biology*, *199*(9), 2011-2019.

Guerrieri, F. J., & d'Ettorre, P. (2008). The mandible opening response: quantifying aggression elicited by chemical cues in ants. *Journal of Experimental Biology*, *211*(7), 1109-1113.

Guerrieri, F. J., & d'Ettorre, P. (2010). Associative learning in ants: conditioning of the maxilla-labium extension response in *Camponotus aethiops*. *Journal of insect physiology*, *56*(1), 88-92.

Guerrieri, F., Schubert, M., Sandoz, J. C., & Giurfa, M. (2005). Perceptual and neural olfactory similarity in honeybees. *PLoS Biol*, 3(4), e60.

Heisenberg, M. (1998). What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. *Learning & Memory*, *5*(1), 1-10.

Henderson, T. B., & Strong, P. N. (1972). Classical conditioning in the leech *Macrobdella ditetra* as a function of CS and UCS intensity. *Conditional Reflex: a Pavlovian Journal of Research & Therapy*, *7*(4), 210-215.

Heyes, C. M. (1993). Imitation, culture and cognition. *Animal Behaviour*, *46*(5), 999-1010.

Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (1990). *The ants*. Harvard University Press.

Hollis, K. L., & Guillette, L. M. (2011). Associative learning in insects: Evolutionary models, mushroom bodies, and a neuroscientific conundrum. *Comparative Cognition & Behavior Reviews*. *6*, 24-45.

Horridge, A. (2009). Generalization in visual recognition by the honeybee (*Apis mellifera*): A review and explanation. *Journal of insect physiology*, *55*(6), 499-511.

Hoy, R. R. (1989). Startle, categorical response, and attention in acoustic behavior of insects. *Annual review of neuroscience*, *12*(1), 355-375.

Hu, W., Zhang, N., Chen, H., Zhong, B., Yang, A., Kuang, F., ... & Chun, J. (2017). Fumigant activity of sweet orange essential oil fractions against red imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology*, *110*(4), 1556-1562.

Josens, R., Eschbach, C., & Giurfa, M. (2009). Differential conditioning and long-term olfactory memory in individual *Camponotus fellah* ants. *Journal of Experimental Biology*, *212*(12), 1904-1911.

Junca, P., Carcaud, J., Moulin, S., Garnery, L., & Sandoz, J. C. (2014). Genotypic influence on aversive conditioning in honeybees, using a novel thermal reinforcement procedure. *PLoS One*, *9*(5), e97333.

Kaib, M., & Dittebrand, H. (1990). The poison gland of the ant *Myrmicaria eumenoides* and its role in recruitment communication. *Chemoecology*, *1*(1), 3-11.

Laska, M., Galizia, C. G., Giurfa, M., & Menzel, R. (1999). Olfactory discrimination ability and odor structure–activity relationships in honeybees. *Chemical senses*, *24*(4), 429-438.

Leadbeater, E., & Chittka, L. (2005). A new mode of information transfer in foraging bumblebees?. *Current Biology*, *15*(12), R447-R448.

Li, Y., & Strausfeld, N. J. (1997). Morphology and sensory modality of mushroom body extrinsic neurons in the brain of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Journal of Comparative Neurology*, *387*(4), 631-650.

Littledyke, M. & Cherrett, J. M. (1976). Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini).—*Bull. ent. Res*. *66*, 205–217.

Mackintosh, N.J. (1983). *Conditioning and associative learning.* Oxford: Clarendon Press.

Menda, G., Bar, H. Y., Arthur, B. J., Rivlin, P. K., Wyttenbach, R. A., Strawderman, R. L., & Hoy, R. R. (2011). Classical conditioning through auditory stimuli in *Drosophila*: methods and models. *Journal of Experimental Biology*, *214*(17), 2864-2870.

Menzel, R. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A*, *185*(4), 323-340.

Menzel, R., & Bitterman, M. E. (1983). Learning by honeybees in an unnatural situation. In *Neuroethology and behavioral physiology* (pp. 206-215). Springer, Berlin, Heidelberg.

Menzel, R., & Müller, U. (1996). Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annual review of neuroscience*, *19*(1), 379-404

Mery, F., & Kawecki, T. J. (2005). A cost of long-term memory in *Drosophila*. *Science*, *308*(5725), 1148-1148.

Moser, J. C., Brownlee, R. C., & Silverstein, R. (1968). Alarm pheromones of the ant Atta texana. *Journal of Insect Physiology*, *14*(4), 529-535.

Nelson, A. S., Zapata, G. D., Sentner, K. T., & Mooney, K. A. (2020). Are ants botanists? Ant associative learning of plant chemicals mediates foraging for carbohydrates. *Ecological Entomology*, *45*(2), 251-258.

Nishimura, T., Seto, A., Nakamura, K., Miyama, M., Nagao, T. Tomatsu, S., Yamaoka, R., & Ozaki, M. (2005). Experiential Effects of Appetitive and Nonappetitive

Odorson Feeding Behavior in the Blowfly, *Phormia regina*: A Putative Role for Tyramine in Appetite Regulation. *The Journal of Neuroscience*, *25*(33), 7507-7516.

Núñez, J., Maldonado, H., Miralto, A., & Balderrama, N. (1983). The stinging response of the honeybee: effects of morphine, naloxone and some opioid peptides. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *19*(6), 921-924.

Sheehan, M. J., & Tibbetts, E. A. (2011). Specialized face learning is associated with individual recognition in paper wasps. *Science*, *334*(6060), 1272-1275.

Pavlov, I.P. (1927) Conditioned reflexes. Oxford University Press, Oxford

Pearce, J. M. (2013). *Animal learning and cognition: an introduction*. Psychology press.

Piqueret, B., Sandoz, J. C., & d'Ettorre, P. (2019). Ants learn fast and do not forget: associative olfactory learning, memory and extinction in *Formica fusca*. *Royal Society open science*, *6*(6), 190778.

Quilico, A., Grünanger, P. & Pavan, M. (1960). Sul componente odoroso del velino del formicide *Myrmicaria natalensis* Fred. Verh. XI, Int. Congr. Entomol. Wien, Pavia, *3*, 66-68.

Sakura, M., & Mizunami, M. (2001). Olfactory learning and memory in the cockroach *Periplaneta americana*. *Zoological Science*, *18*(1), 21-28.

Schwarz, S., & Cheng, K. (2010). Visual associative learning in two desert ant species. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *64*(12), 2033-2041.

Smith, B. H., & Burden, C. M. (2014). A proboscis extension response protocol for investigating behavioral plasticity in insects: application to basic, biomedical, and agricultural research. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, *91*, e51057.

Takeda, K. (1961). Classical conditioned response in the honey bee. *Journal of Insect Physiology*, *6*(3), 168-179.

Telles, F. J., Corcobado, G., Trillo, A., & Rodriguez-Girones, M. A. (2017). Multimodal cues provide redundant information for bumblebees when the stimulus is visually salient, but facilitate red target detection in a naturalistic background. *PloS one*, *12*(9), e0184760.

Tibbetts, E. A., & Sheehan, M. J. (2013). Individual recognition and the evolution of learning and memory in *Polistes* paper wasps. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 22, pp. 561-571). Elsevier.

Udino, E., Perez, M., Carere, C., & d'Ettorre, P. (2017). Active explorers show low learning performance in a social insect. *Current zoology*, *63*(5), 555-560.

Vergoz, V., Roussel, E., Sandoz, J. C., & Giurfa, M. (2007). Aversive learning in honeybees revealed by the olfactory conditioning of the sting extension reflex. *PloS one*, *2*(3), e288.

Verza, S. S., Nagamoto, N. S., Forti, L. C., & Noronha Jr, N. C. (2011). Preliminary studies on the effects of d-limonene to workers of the leaf-cutting ant Atta sexdens rubropilosa and its implications for control. *Bull. Insectology*, *64*, 27-32.

Villar, M. E., Marchal, P., Viola, H., & Giurfa, M. (2020). Redefining Single-Trial Memories in the Honeybee. *Cell Reports*, *30*(8), 2603-2613.

Walters, E. T., Carew, T. J., & Kandel, E. R. (1979). Classical conditioning in *Aplysia californica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *76*(12), 6675-6679.

Watanabe, H., Kobayashi, Y., Sakura, M., Matsumoto, Y., & Mizunami, M. (2003). Classical olfactory conditioning in the cockroach *Periplaneta americana*. *Zoological science*, *20*(12), 1447-1454.

Yoon, C., Kang, S. H., Yang, J. O., Noh, D. J., Indiragandhi, P., & Kim, G. H. (2009). Repellent activity of citrus oils against the cockroaches *Blattella germanica*, *Periplaneta americana* and *P. fuliginosa*. *Journal of Pesticide Science*, *34*(2), 77-88.

Zentall, T. R., Galizio, M., & Critchfield, T. S. (2002). Categorization, concept learning, and behavior analysis: An introduction. *Journal of the experimental analysis of behavior*, *78*(3), 237-248.

Zentall, T. R., Wasserman, E. A., Lazareva, O. F., Thompson, R. K., & Rattermann, M. J. (2008). Concept learning in animals. *Comparative Cognition & Behavior Reviews*.

ÖZGEÇMİŞ

1995 yılının Eylül ayında İstanbul'da doğdum. Çocukluk zamanımın en güzel yıllarını aynı semtte geçirdim. İlköğrenimimi 2001-2009 yılları arasında çocukluğumun geçtiği şehrin güzel bir okulu olan Arman Polat İlköğretim Okulu'nda tamamladım. İlkokulu başarıyla tamamladıktan sonra lise öğrenimimi 2009-2013 yılları arasında Küçükköy Teknik ve Endüstri Meslek Lisesi'nde aldım ve burada 'Bilgisayar – WEB Tasarım' bölümünü belgelerle tamamladım. Lise zamanımın son yıllarında üniversiteye gidebilmem için sınav hazırlık derslerine katıldım. Sınavdan sonra 2013 yılında 'Trakya Üniversitesi – Fen Fakültesi / Biyoloji Bölümü'nü kazandım ve 2017 yılında mezun oldum. Okulun son senesinde TUTAGEM'in düzenlediği 'Elektron Mikroskobunu Tanıma ve Kullanma' kursuna katılarak sertifika aldım. Mezuniyetimden sonra Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün tezli yüksek lisans programına başvuruda bulundum ve başvuru sonucunda Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans yapmaya hak kazandım. Halen devam etmekte olan lisansüstü eğitimimde çeşitli kongrelere katıldım ve sunum yaptım. Trakya Üniversiteler Birliği'nin Mayıs 2018'de gerçekleştirdiği III. Lisansüstü Öğrenci Kongresi'nde seminer konum olan 'Karıncalarda İlişkili Öğrenme ve Maksilla-Labium Uzatma Yanıtının (MaLER) Kökenleri' adlı sunumumu, yine aynı birliğin düzenlediği Kasım 2019 tarihli IV. Lisansüstü Öğrenci Kongresi'nde de 'Minyatür Beyinler ve Öğrenme' adlı sunumumu gerçekleştirdim.

TEZ İLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER

Kubilay Duymaz, Volkan Aksoy (2018). Karıncalarda İlişkili Öğrenme ve MaLER Yanıtın Kökenleri. Trakya Üniversiteler Birliği III. Lisansüstü Öğrenci Kongresi. 3 Mayıs 2018, Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.

Kubilay Duymaz, Volkan Aksoy (2019). Minyatür Beyinler ve Öğrnme. Trakya Üniversiteler Birliği IV. Lisansüstü Öğrenci Kongresi. 14 Kasım 2019, Kırklareli Üniversitesi, Kırklareli.