



Neonikotinoid İsektisitlerin *Bombus (Bombus terrestris L.)* Arısı Bireylerinde Hafıza ve Öğrenme Davranışına Etkisi

İsmail Yaşhan BULUŞ^{*1}, Selcan TİMURÖĞLU², Ayhan GÖSTERİT²

¹ Muş Alparslan Üniversitesi, Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Hayvansal Üretim ve Teknolojileri Bölümü, 49250, Muş-Türkiye

² Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, 32260, Isparta-Türkiye

İsmail Yaşhan BULUŞ, ORCID No: [0000-0003-4418-588X](https://orcid.org/0000-0003-4418-588X), Selcan TİMURÖĞLU, ORCID No: [0000-0002-7258-4143](https://orcid.org/0000-0002-7258-4143), Ayhan GÖSTERİT, ORCID No: [0000-0001-9686-7992](https://orcid.org/0000-0001-9686-7992)

MAKALE BİLGİSİ

ÖZ

Araştırma Makalesi

Geliş: 01.03.2024
Kabul: 29.04.2024

Anahtar Kelimeler

Bombus terrestris
Bombus arısı
Acetamiprid
Öğrenme ve hafıza

* Sorumlu Yazar

y.bulus@alparslan.edu.tr

Gerek polinasyon amacıyla tarımsal üretimde kullanıldığında gerekse doğal yaşam alanlarında çeşitli insektisitlere farklı şekil ve düzeyde maruz kalan arılar beslenme reflekslerini, yön bulma becerilerini kaybedebilir veyahatta ölebilirler. İsektisitlerden neonikotinoid grubunda yer alan Acetamiprid etken maddeli insektisitler tıpkı diğer neonikotinoidler gibi arıların yön bulma, öğrenme ve hafıza becerilerini olumsuz etkilemektedir. *Bombus terrestris* koloni bireyleri (ana, işçi ve erkek arı) koloni yaşam döngüsünün belirli dönemlerinde besin toplama veya çiftleşme gibi farklı amaçlar için koloniden ayrılmakta ve insektisitlere maruz kalabilmektedir. Bu çalışmada, *B. terrestris* koloni bireylerinden oluşan 5 grup (Grup 1: Çiftleşmemiş genç ana arı grubu, Grup 2: Çiftleşmiş, diyapoz dönemini tamamlamış, ancak yumurtlamamış ana arı grubu, Grup 3: Çiftleşmiş, diyapoz dönemini tamamlamış ve yumurtlamış ana arı grubu, Grup 4: İşçi arı grubu, Grup 5: Erkek arı grubu) Acetamiprid etken maddeli insektisit (Hekplan®, HEKTAŞ) tavsiye edilen dozunun 5 farklı oranına (0 (kontrol), 1/1000, 1/100, 1/10, 1/1) maruz bırakılmıştır. İsektisite maruz kalan arıların öğrenme ve hafıza davranışları klasik koşullandırma yöntemi ile belirlenmiştir. Her maruziyet uygulaması için 20 adet olmak üzere toplam 500 adet (5 grup x 5 doz x 20 arı) ergin birey kullanılmıştır. Sonuçlara göre klasik koşullandırma yöntemi uygulanan 3 ana arı grubundaki bireylerin işçi ve erkek arı gruplarındaki bireylere göre hem daha geç öğrenmeye başladığı hem de daha az sayıda bireyin dil çıkarma davranışı sergilediği belirlenmiştir. Hafıza çalışmalarındaki ölçümler öğrenme çalışmasından sonra 1., 2., 6. ve 12. saatlerde yapılmıştır. İsektisitten en çok etkilenen grupların ana arı grupları olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar, Acetamiprid etken maddeli neonikotinoid insektisit bombus arısı bireylerinin öğrenme ve hafıza yeteneklerini farklı düzeylerde etkilediğini ortaya koymuştur.

Effect of Neonicotinoid Insecticides on Memory and Learning Behavior in Bumblebee (*Bombus terrestris L.*) Individuals

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Lütfen aşağıdaki şekilde atıf yapınız / Please cite this paper as following;

Buluş, İ.Y., Timuroğlu, S., Gösterit, A., 2024. Neonikotinoid insektisitlerin *Bombus (Bombus terrestris L.)* Arısı bireylerinde hafıza ve öğrenme davranışına etkisi, *Journal of Animal Science and Products (JASP)* 7 (1):30-41.

DOI: [10.51970/jasp.1444967](https://doi.org/10.51970/jasp.1444967)

Research Article

Received : 01.03.2024

Accepted : 29.04.2024

Keywords

Bombus terrestris

Bumblebee

Acetamiprid

Learning and memory

*** Corresponding Author**

y.bulus@alparslan.edu.tr

Bees that are exposed to various insecticides in different ways and levels, both when used in agricultural production for pollination purposes and in their natural habitats, may lose their feeding reflexes and navigation skills, and may even die. Acetamiprid, an active ingredient in insecticides belonging to the neonicotinoid group, negatively affects the navigation abilities of bees, thus also affecting their learning and memory abilities adversely like other neonicotinoids. *Bombus terrestris* colony individuals (queen, worker and males) leave the colony for different purposes such as collecting food or mating at certain periods of the colony life cycle and may be exposed to insecticides. In this study, five main groups of colony individuals were designed (Group 1: Unmated young queens, Group 2: mated, diapaused but non-egg-laying queens, Group 3: mated, diapaused and egg-laying queens, Group 4: workers, and Group 5: males). Bees were exposed to 5 different rates (0 (control), 1/1000, 1/100, 1/10, 1/1) of the recommended dose of the Acetamiprid-based insecticide (Hekplan®, HEKTAŞ). Learning and memory behaviors of bees exposed to insecticides were determined by the classical conditioning method. A total of 500 adult individuals (5 groups x 5 doses x 20 bees for each exposure application) were used. As a result of the study, it was determined that the three main queens groups subjected to classical conditioning started learning later and had a lower number of individuals sticking out their tongues compared to the worker and male bee groups. The measurements of the bees in the memory tests were conducted at 1st, 2nd, 6th, and 12th hours after the learning session. It was found that the queen groups were the most affected by the insecticide. The results indicate that the Acetamiprid-based insecticide affects the learning and memory abilities of the bumblebee individuals at different levels.

Giriş

Tarım zararlıları ile mücadele kapsamında uygulanan insektisitler başta arılar olmak üzere hedef organizma olmayan faydalı böceklerin zarar görmesine ve biyolojik dengenin bozulmasına yol açarken bitkisel üretimdeki verimi de olumsuz etkilemektedir (Tolon, 1999). Örtü altı bitkisel üretimde hastalık ve zararlılarla mücadelede yoğun olarak kullanılan farklı etki mekanizmalarına sahip pestisitler de tozlaşmada önemli rol oynayan bombus arılarına farklı şekil ve düzeyde etki etmektedir (Zhao, 2022). Önemli insektisit gruplarından olan neonicotinoidler, gerek translamınar etki mekanizmasına sahip olmaları gerekse de zararlı üzerindeki hızlı etkileri nedeniyle günümüzde hem açık alan hem de örtü altı üretimde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, neonicotinoidler insektisitler içinde en büyük pazar payına sahip grubu oluşturmaktadır (Jeschke ve ark., 2011; Casida ve Durkin, 2013). Memelilerde düşük toksisiteye yol açmaları ve çok çeşitli böcek türlerine karşı yüksek etkinlik göstermeleri neonicotinoidlerin pazar payının büyüklüğünün altında yatan önemli faktörlerdir (Jeschke ve Nauen 2008; Simon-Delso ve ark., 2015). Neonicotinoidler, nitro içeren bileşikler (Imidacloprid, Clothianidin, Thiamethoxam, Dinotefuran, Nitenpyram) ve siyano içeren bileşikler (Acetamiprid ve Thiacloprid) olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Bu sistemik insektisitler bitkinin tüm dokularına yayılarak bitkiyle beslenen böcekler için toksik etki oluştururlar. Arılar, bitkilerdeki polen ve nektar yoluyla bu kimyasallara maruz kalırlar (Desneux ve ark., 2007; Sánchez-Bayo ve ark., 2016). Bu insektisitler ayrıca tohumların kaplanmasında da kullanılmakta olup tohumlara uygulanan neonicotinoidler bitkinin kökleri

tarafından alınarak iletim demetleri sayesinde çiçeklere kadar ulaştırılır (Laurent ve Rathahao, 2003; Elbert ve ark., 2008; Jeschke ve ark., 2011). Neonikotinoidler, arıların nikotinik asetilkolin reseptörlerini etkiler ve nöronal kolinerjik sinyal iletiminde olumsuzluklara yol açarlar (Elbert ve ark., 2008; Fischer ve ark., 2014). Nöronlarında kolinerjik sinyal iletiminin bozulması arıların hedef aramasını, yiyecek aramasını ve bireysel hareket kabiliyetini olumsuz etkileyebilir ve hatta bazı durumlarda ölüme yol açabilir (Belzunces ve ark., 2012; Gill ve Raine, 2014; Moffat ve ark., 2016; Stanley ve ark., 2016). Pestisitlere maruz kalma durumu bireyi, koloni oluşumunu ve kolonin büyüme ve gelişme faktörlerini olumsuz etkileyebilir (Whitehorn ve ark., 2012; Di Prisco ve ark., 2013; Woodcock ve ark., 2017). Bunlara ilave olarak, pestisit maruziyetinin yuva yeri ve yiyecek arama ve koloni işlevi üzerinde de olumsuz etkileri olabilir. Bu durum kolonilerin gelişimini ve tozlaştırma başarısını olumsuz etkileyebilir (Chensheng ve ark., 2014; Pisa ve ark., 2015; Stanley ve ark., 2016; Wang ve ark., 2019).

Bombus arıları yiyecek arama maksadıyla yaptıkları tarlacılık faaliyeti esnasında vücutlarında bulunan birçok duyu organları sayesinde görsel ve kokusal yeteneklerini kullanırlar. Öyle ki, bir işçi arı nektar ve polen toplamak üzere günde yüzlerce çiçeği ziyaret edebilir. Bu yetenekler sayesinde arılara ziyafet sunan çiçeklerin konumları öğrenilir (Leonard ve Masek, 2014). *Bombus* arılarının öğrenme hızı ile tarlacılık performansı arasında pozitif korelasyon olduğu bildirilmiştir (Raine ve Chittka, 2008). Pestisit maruziyeti *bombus* arılarında öğrenme yeteneğini azaltarak tarlacılık performansı ve koloni gelişimini olumsuz etkilemektedir (Klein ve ark. 2017). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda başta neonikotinoidler olmak üzere pestisitlerin arıların öğrenme ve hafıza performanslarını olumsuz etkilediği belirlenmiştir (Samuelson ve ark. 2016; Siviter ve ark., 2018 ve 2021; Muth ve ark., 2019; DesJardins ve ark., 2021).

Doğada serbestçe dolaşan canlılarda öğrenme, genellikle yiyecek arama süreciyle ilişkilendirilen bir yetenektir (Croy ve Hughes, 1990; Giraldeau ve ark., 1994). Bu yetenek, bireysel ve sosyal öğrenme olarak iki şekilde gerçekleşir (Galef, 2013). Bireysel öğrenme, bireylerin kendi aktiviteleri ve deneme-yanılma yoluyla elde ettikleri deneyimlere dayanarak tekrarlamalarının uygun olup olmadığına karar vermelerini içermektedir. Yaygın olarak görülen sosyal öğrenme ise, bireylerin başka bir bireyle etkileşime girmesi veya gözlem yapması sonucunda bilgi ve deneyim aktarımıyla gerçekleşir (Kendal ve ark., 2018). Bu öğrenme yöntemlerinin yanı sıra, omurgalı ve omurgasız canlılar, Pavlov'un (1927) uyguladığı ve klasik koşullandırma olarak adlandırılan çeşitli yöntemlerle öğrenmeye tabi tutulabilirler (Pavlov, 1927; Bitterman ve ark., 1983). Klasik koşullandırma, başlangıçta bir canlının tepki vermeyen nötr bir uyarıcıyı, doğuştan gelen ve genellikle refleksif bir tepkiyi tetikleyen biyolojik olarak önemli bir uyarıcıyla ilişkilendirmeyi öğrendiği bir koşullandırma şeklidir. Bu ilişki sayesinde, başlangıçta nötr olan uyarıcı, koşullu bir tepkiyi tetikleyebilir hale gelir (Giurfa ve Sandoz, 2012). Koşullandırma çalışmaları genellikle omurgalı hayvanlar üzerinde yoğunlaşırken, arılar gibi omurgasız hayvanlarda yapılan çalışma sayısı nispeten daha azdır. Arıların klasik koşullandırma çalışmaları için uygun olduğu farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Takeda, 1961; Bitterman ve ark., 1983; Scheiner ve ark., 2003). Arılarda öğrenme ve hafıza, dil uzatma davranışı olarak da bilinen "Proboscis Extension Response" (PER) ile ölçülebilmektedir.

Tüm bu bilgiler dikkate alındığında, araştırmada kullanılan ve neonikotinoid grubundan bir insektisit olan Acetamipridin *bombus* arıları gibi hedef olmayan organizmalara zarar verme

potansiyeline sahip olduğu değerlendirilmektedir. Bunun nedeni bu insektisidin bitkinin yapısına kadar ulaşan sistemik bir etkiye sahip olmasıdır. Ek olarak, bir sonraki bitkinin üretimi sırasında toprakta kalıntılar oluşturarak toksik etkilere neden olabilir. Bombus ana arılarının toprak altındaki diyapoz dönemlerinde ve/veya diyapoz döneminden sonra yuva kurmak için tarlacılık faaliyeti sırasında Acetamipride maruz kalma ihtimali söz konusudur. Kolonilerde üretilen işçi arıların tarlacılık faaliyetleri sırasında, erkek arıların ise çiftleşme uçuşları esnasında insektisitlere maruz kalma olasılığı oldukça yüksektir. Farklı insektisitlerin koloni bireyleri üzerine etkilerinin bilinmesi gerek doğal popülasyonların korunması için alınacak önlemlerin geliştirilmesi, gerekse polinatör olarak kullanılan ticari kolonilerin tozlaşmadaki etkinliğinin değerlendirilmesi açısından önemlidir. Bu araştırma; Acetamiprid etken maddeli neonikotinoid insektisite maruz kalan *Bombus terrestris* ana, erkek ve işçi arılarının öğrenme ve hafıza performanslarının araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Çalışma Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootehni Bölümü bünyesinde yer alan Arıcılık Araştırma ve Uygulama Laboratuvarlarında yürütülmüştür. Çalışmada kimyasal materyal olarak Acetamiprid etken maddeli insektisit (Hekplan®, HEKTAŞ) kullanılmıştır. Araştırmanın arı materyalini oluşturan *Bombus terrestris* ana, erkek ve işçi arılarını elde etmek için kullanılan koloniler bu arıları kitlesel üreten bir firmadan temin edilmiştir. Araştırma sıcaklığı 27-28 °C ve oransal nemi % 50-60'a ayarlanan bombus arısı yetiştirme odalarında gerçekleştirilmiştir.

Yöntem

Araştırmada kullanılmak üzere kullanılan *B. terrestris* kolonileri çalışma grupları oluşturulana kadar polen ve 50 briks şeker şurubu ile ad-libitum beslenmiştir (Gürel ve ark., 2011). Gruplardaki ergin arılar Acetamiprid etken maddeli insektisit (Hekplan®, HEKTAŞ) tavsiye edilen dozunu (30 gram /100 litre su) farklı oranlarda (0 (kontrol), 1/1000, 1/100, 1/10, 1/1) içeren farklı şeker şurupları ile beslenmiştir. Çalışma kapsamında aşağıda verilen 5 gruptaki bireyler 5 farklı şeker şurubuna maruz bırakılmış olup, her maruziyet uygulaması için 20 adet olmak üzere araştırmada toplam 500 adet ergin birey kullanılmıştır.

Grup 1: Çiftleşmemiş genç ana arı grubu

Grup 2: Çiftleşmiş, diyapoz dönemini tamamlamış, ancak yumurtlamamış ana arı grubu

Grup 3: Çiftleşmiş, diyapoz dönemini tamamlamış ve yumurtlamış ana arı grubu

Grup 4: İşçi arı grubu

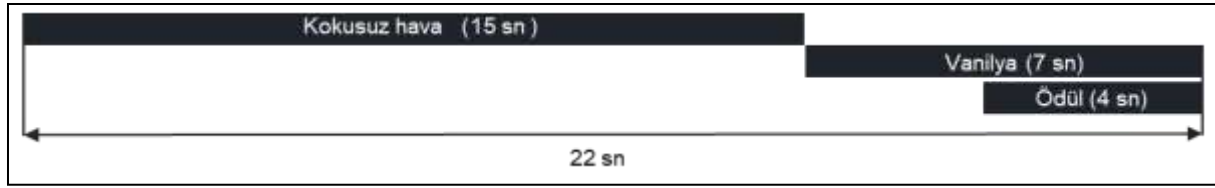
Grup 5: Erkek arı grubu

Kolonilerde üretilen tüm ana ve erkek arılar her gün toplanmış ve cinsi olgunluk yaşlarına kadar ilaçsız polen ve şeker şurubu ile ad-libitum olarak beslenmişlerdir. Bu ana arıların bir kısmı kullanılarak çiftleşmemiş genç ana arı grubu (Grup 1) oluşturulmuştur. Geriye kalan ana arılar çiftleşme olgunluğuna geldiklerinde erkek arılar ile çiftleştirilmiş ve diyapoz dönemlerini geçirmek üzere bireysel tüpler içinde, +2,5 °C sıcaklık ve % 75 oransal nem içeren

soğuk hava kabininde 45 gün bekletilmişlerdir (Beekman ve van Stratum, 2000; Gösterit ve Gürel, 2009). Diyapoz süreci sonunda soğuk hava kabininden çıkarılan ana arıların bir bölümü çiftleşmiş, diyapoz dönemini tamamlamış, ancak yumurtlamamış ana arı grubu (Grup 2) için kullanılmıştır. Geriye kalan ana arılar bireysel olarak yumurtlatma kutularına transfer edilerek yumurtlamaları sağlanmış ve yumurtlayan ana arılar ile çiftleşmiş ve yumurtlamış ana arı grubu (Grup 3) oluşturulmuştur. Araştırmada işçi arı grubunda (Grup 4) kolonilerden elde edilen 8–12 günlük yaştaki işçi arılar, erkek arı grubunda (Grup 5) ise yine kolonilerde üretilen ve çiftleştirme amacıyla kullanılmayan erkek arılardan materyal olarak faydalanılmıştır.

Acetamiprid etken maddeli inektisit tavsii edilen maksimum uygulama dozunun farklı oranlarına maruz kalan ergin *B. terrestris* bireylerinin öğrenme ve hafıza becerileri test edilmiştir. Maruziyet işlemi için arılar standart bombus arısı yetiştirme koşullarında yer alacakları gruba göre Acetamiprid içeren 50 brikslik şeker şurubu ile 24 saat boyunca ad-libitum beslenmiştir. Maruziyet sonrasında bir süreliğine soğuk hava kabininde (3 °C) bekletilerek hareketsiz hale gelmeleri sağlanan arılar daha sonra antenleri, ön ayakları ve ağız parçaları rahatça hareket edecek şekilde özel olarak tasarlanmış arı sabitleme aparatlarına yerleştirilmiştir. Bu aşamada açlık yaşanmaması için arılara kulak temizleme çöplerine emdirilmiş normal şeker şurupları ile besleme yapılarak açlıktan kaynaklanabilecek davranış değişimleri engellenmiştir. Çalışmada arıların öğrenme ve hafıza testleri için vanilya kokusu kullanılmıştır. Bu aşamalardan sonra arıların çalışmanın yapıldığı ortama alışmaları ve sakinleşmeleri için bir süre beklenmiştir.

Çalışmada dil uzatma davranışı ile ilgili testler Bitterman ve ark. (1983) tarafından bildirilen protokolün modifiye haliyle gerçekleştirilmiştir (Tan ve ark., 2015). Bu kapsamda, vanilya kokusuna klasik koşullandırma yöntemi ile koşullandırılmış her bir birey çalışma düzeneğinin önüne konulmuştur. Düzeneğin önüne konulan sabitlenmiş her bir bireye önce 15 saniye boyunca kokusuz hava üflenerek arının etkilenebileceği diğer kokular arının etrafından uzaklaştırılmıştır. Bu işlemi takiben (16. saniye ile 22. saniye arasında) vanilya kokulu hava üflenmiştir. Bu esnada normal şeker şurubu emdirilmiş kulak temizleme çöpleri 19 ve 22. saniyeler arasındaki sürede arıların antenlerine dokundurulmuştur. Bu işlem sonunda dilini çıkaran arıların ödül beslemesi olarak şeker şurubunu yalması sağlanmıştır (Şekil 1). Bu uygulama 10 dakika arayla 5 kez tekrar edilerek arıların öğrenmesi pekiştirilmiş ve her bir tekrarda öğrenen arıların (dil uzatan) sayıları kaydedilmiştir. Öğrenme uygulamaları tamamlandıktan sonra öğrenen arıların hafızalarının test edildiği aşamaya geçilmiştir. Hafıza testi uygulamaları, arılara vanilya kokusunun öğretilme işlemleri bittikten sonraki 1., 2., 6. ve 12. saatlerde yapılmış ve vanilya kokusuna tepki veren arı sayıları kaydedilmiştir. Hafıza testi aşamasında öğrenme testi aşamasındaki uygulamaya benzer işlemler yapılmıştır. Ancak öğrenme testinde vanilya kokusu üflendikten sonra ödül beslenmesi yapılırken, hafıza testinde öğretilmiş vanilya kokusu üflendikten sonra dil uzatan arılara ödül beslenmesi yapılmamış ve dil uzatan arının öğretilen kokuyu hatırladığı kabul edilerek sayıları kaydedilmiştir. Veriler SPSS istatistik paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Dil çıkarma davranışları göz önüne alınarak Kaplan-Meier yaşam analizi uygulanmıştır. Her grubun öğrenme ve hafıza süre ortalamaları arasındaki farkların belirlenmesinde Log-Rank yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 1. PER uygulama prosesi
Figure 1. Procedure of PER applications

Bulgular

Araştırmada bireylerin koşullanması yani öğrenmesi için gerekli tekrar sayıları ile ilgili bulgular Tablo 1’de verilmiştir. Gruplar ilaca maruz bırakılmayan kontrol uygulaması ile karşılaştırıldığında, bombus arılarında ana arıların öğrenmesi için gerekli tekrar sayısı ile erkek ve işçi arıların öğrenmesi için gerekli tekrar sayısı arasında görülen farkın istatistiki olarak önemli olduğu, dolayısıyla sabitlenmiş ana arıların öğrenme yeteneğinin işçi ve erkek arılara göre daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır ($P < 0.05$). Diğer taraftan her grup kendi içinde değerlendirildiğinde Acetamiprid dozunun artmasının bombus arısı bireylerinde öğrenme yeteneğini azalttığı görülmektedir. Doz uygulamaları arasındaki bu farklılığın işçi arı, erkek arı ve çiftleşmemiş ana arı gruplarında istatistiki olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$).

Tablo 1. Bireylerin koşullandırılması için gerekli tekrar sayıları (Ortalama \pm S.H.; N= 20)
Table 1. The number of repetitions required for the conditioning (Average \pm S.E.; N= 20)

Gruplar	Doz uygulamaları	Tekrar sayısı
Grup 1 (Çiftleşmemiş genç ana arı)	Kontrol	5.25 \pm 0.290 bc
	1/1000	5.55 \pm 0.260 abc
	1/100	5.70 \pm 0.175 abc
	1/10	5.85 \pm 0.107 ab
	1/1	5.90 \pm 0.097 a
Grup 2 (Çiftleşmiş, diyapoz dönemini tamamlamış, ancak yumurtlamamış ana arı)	Kontrol	5.20 \pm 0.288 c
	1/1000	5.45 \pm 0.260 bc
	1/100	5.50 \pm 0.260 abc
	1/10	5.65 \pm 0.177 abc
	1/1	5.75 \pm 0.139 abc
Grup 3 (Çiftleşmiş, diyapoz dönemini tamamlamış ve yumurtlamış ana arı)	Kontrol	5.45 \pm 0.260 abc
	1/1000	5.60 \pm 0.259 abc
	1/100	5.70 \pm 0.175 abc
	1/10	5.85 \pm 0.107 ab
	1/1	5.90 \pm 0.097 a
Grup 4 (İşçi arı)	Kontrol	2.40 \pm 0.363 e
	1/1000	2.70 \pm 0.340 e
	1/100	3.90 \pm 0.353 d
	1/10	3.90 \pm 0.373 d
	1/1	4.50 \pm 0.320 cd
Grup 5 (Erkek arı)	Kontrol	2.50 \pm 0.343 e
	1/1000	2.70 \pm 0.340 e
	1/100	3.90 \pm 0.353 d
	1/10	3.90 \pm 0.373 d
	1/1	4.50 \pm 0.320 cd

Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki farklılık önemlidir; a, b, c, d, e: $P < 0.05$

Acetamiprid etken maddeli insektisit tavsye edilen maksimum uygulama dozunun farklı oranlarına maruz kalan *B. terrestris* bireylerinin koşullandırıldıkları vanilya kokusunu hatırlama sürelerine ilişkin veriler Tablo 2’de verilmiştir. Araştırmada bulunan çalışma grupları her biri kendi içerisinde değerlendirildiğinde, kontrol grupları her bir uygulama saatinde hatırlayan birey sayısının en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Acetamiprid etken maddeli insektisit en yüksek doz olan tavsye edilen maksimum uygulama dozunda ise her bir uygulama saatinde hatırlayan birey sayısının en az olduğu belirlenmiştir.

Tablo 2. Uygulamadan sonra farklı zamanlarda vanilya kokusunu hatırlayan birey sayısı (adet)
Table 2. The number of individuals which recall the vanilla scent at different times after application

Gruplar	Doz uygulamaları	Uygulamadan sonra geçen süre (saat)			
		1. saat	2. saat	6. saat	12. saat
Grup 1 (Çiftleşmemiş genç ana arı)	Kontrol	7	7	6	5
	1/1000	6	5	3	3
	1/100	4	4	2	1
	1/10	2	2	1	0
	1/1	2	1	0	0
Grup 2 (Çiftleşmiş, diyapoz dönemini tamamlamış, ancak yumurtlamamış ana arı)	Kontrol	7	6	5	5
	1/1000	4	4	2	1
	1/100	3	2	2	1
	1/10	2	2	1	0
	1/1	1	1	0	0
Grup 3 (Çiftleşmiş, diyapoz dönemini tamamlamış ve yumurtlamış ana arı)	Kontrol	4	4	3	3
	1/1000	3	3	2	2
	1/100	3	2	2	0
	1/10	2	1	1	0
	1/1	1	1	0	0
Grup 4 (İşçi arı)	Kontrol	17	17	14	12
	1/1000	19	15	15	10
	1/100	13	12	10	10
	1/10	11	9	7	6
	1/1	8	7	6	6
Grup 5 (Erkek arı)	Kontrol	18	17	14	12
	1/1000	19	16	15	10
	1/100	15	12	9	9
	1/10	12	10	8	6
	1/1	9	7	6	5

Tartışma ve Sonuç

Çalışmadan elde edilen verilere göre, çalışma gruplarında bulunan 15 adet (3 ana grup x 5 altgrup) ana arı grubunun öğrenme konusunda çalışmanın diğer (erkek arı ve işçi arı) gruplarına göre daha isteksiz olduğu belirlenmiştir. Öğrenme konusunda isteksiz olduğu görülen ana arı gruplarındaki bireylerin hatırlama performanslarında da benzer durum gözlemlenmiştir. Çalışmadan elde edilen bir başka sonuç ise, çalışmada kullanılan insektisit tavsye edilen dozunun 1/100, 1/10, 1/1 dozlarına maruz kalan tüm bireylerde şeker şurubuna karşı isteksizlik olduğu gözlemlenmiştir. Bal arılarında olduğu gibi çalışmada kullanılan bireylerin şeker şurubuna olan ilgisinin azalmasında neonikotinoidlerin etkili olduğu

düşünülmektedir (Démare ve ark., 2016; Mengoni Goñalons ve Farina, 2018). Ancak, Lamsa ve ark. (2018) ve Muth ve Leonard (2019) çalışmalarında, bir başka neonikotinoid olan imidaclopridin bombus arılarının öğrenmesinde etkili olmadığını ancak beslenme ve tarlacılık performanslarında azalmaya neden olduğunu bildirilmişlerdir.

Literatüre sunulmuş önceki çalışmalar incelendiğinde, bombus arılarının bal arılarına göre daha yavaş öğrendiği çeşitli yazarlar tarafından bildirilmiştir (Bitterman et al. 1983; Lalo ve ark., 1999; Lalo ve Pham-Delègue 2004; Riveros ve Gronenberg, 2009). Ancak, Ichikawa ve Sasaki (2003) tarafından yapılan bir çalışmada genç bombus arılarının, genç bal arılarından daha hızlı öğrendiğini bildirmiş ve bu hızlı öğrenmenin nedenlerini ekolojik, sosyal ve nörobiyolojik farklılıklar ile ilişkilendirmiştir. Ayrıca, *Bombus terrestris* türünde işçi arıların erken yaşta tarlacılık faaliyetine katılmaları da öğrenme hızında etken olarak değerlendirilmektedir (Gill ve Raine, 2014). Buna ilaveten, arıların vücut büyüklüğünün öğrenme performansları ile ilişkili olup olmadığı yönünde fikir ayrılıkları da mevcuttur (Worden ve ark., 2005; Raine ve Chittka 2008; Riveros ve Gronenberg, 2009).

Bu çalışmada ana arı gruplarında bulunan ana arıların öğrenme ve hafıza performanslarının işçi ve erkek arılara göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Ana arıların performanslarının düşük olmasının nedeninin sabitlenmekten oluşan stres faktörü olduğu düşünülmektedir. Bu düşüncüyü destekleyen ve literatüre sunulmuş farklı bombus türlerine ait ana arılarda yapılmış çalışmalarda, ana arılar sabitlenmek yerine serbestçe uçuş yapabilecekleri düzenekler içerisine yerleştirilmiştir (Evans ve Raine, 2014; Muth, 2021). Serbest uçuş yöntemini uygulayan Muth (2021), *B. vosnesenskii* türünün ana arılarının işçi arılardan daha iyi performans gösterdiğini, *B. impatiens* arısının çiftleşmemiş ana arılarının yine aynı türün işçi arılarından daha iyi performans gösterdiğini bildirmiştir. Evans ve Raine (2014), gelişen *B. terrestris* kolonilerinde öğrenme ve toplayıcılık davranışındaki değişiklikleri inceledikleri çalışmalarında ana arıların işçi arılara göre tarlacılık konusunda daha temkinli ve öğrenmede daha hızlı olduklarını bildirmiştir.

Çalışma bombus arısı kolonilerinde bulunan ve yuvanın dışına çıkma durumu söz konusu olan tüm bireyler ve bu bireylerin durumu göz önüne alınarak yapılmıştır. Gerek bireysel gerekse de sosyal yaşam döngüsüne sahip model böcek türlerinde yapılacak bu tarz çalışmaların, tozlayıcıların insektisitlere maruz kalması durumunda ne gibi durumların yaşanabileceğine dair önceden fikir sahibi olunmasına katkı sunacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 2209-A kapsamında desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Beekman, M., van Stratum, P., 2000. Does the diapause experience of bumblebee queens *Bombus terrestris* affect colony characteristics?. *Ecological Entomology*. 25(1): 1-6.
- Belzunces, L.P., Tchamitchian, S., Brunet, J.L., 2012. Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie*. 43(3): 348-370.

- 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): 107-119.
- Casida, J.E., Durkin, K.A., 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review of Entomology*. 58(1): 99-117.
- Chensheng, L.U., Warchol, K.M., Callahan, R.A., 2014. Sub-lethal exposure to neonicotinoids impaired honey bees winterization before proceeding to colony collapse disorder. *Bulletin of Insectology*. 67(1): 125-130.
- Croy, M.I., Hughes, R.N., 1990. The Combined Effects of Learning and Hunger in the Feeding Behaviour of the Fifteen-Spined Stickleback (*Spinachia Spinachia L.*). Hughes, R.N. (Eds) *Behavioural Mechanisms of Food Selection* (pp. 215–234). Berlin, Germany: Springer.
- Demares, F.J., Crous, K.L., Pirk, C.W., Nicolson, S.W., Human, H., 2016. Sucrose sensitivity of honey bees is differently affected by dietary protein and a neonicotinoid pesticide. *PLoS One*. 11(6): e0156584.
- DesJardins, N.S., Fisher, A., Ozturk, C., Fewell, J.H., De Grandi-Hoffman, G., Harrison, J. F., Smith, B.H., 2021. A common fungicide, Pristine®, impairs olfactory associative learning performance in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Pollution*. 288: 117720
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*. 52(1): 81-106.
- Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., Gargiulo, G., Pennacchio, F. 2013. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110(46): 18466-18471.
- Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W., Nauen, R., 2008. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*. 64(11): 1099-1105.
- Evans, L.J., Raine, N.E., 2014. Changes in learning and foraging behaviour within developing bumble bee (*Bombus terrestris*) colonies. *PLoS One*. 9(3): e90556.
- Fischer, J., Müller, T., Spatz, A.K., Greggers, U., Gruenewald, B., Menzel, R., 2014. Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *PLoS One*. 9(3): e91364.
- Galef Jr, B. G., 2013. Imitation in Animals: History, Definition, And Interpretation of Data from The Psychological Laboratory. in *Social learning* (pp. 15-40). Psychology Press.
- Gill, R.J., Raine, N.E., 2014. Chronic impairment of bumblebee natural foraging behaviour induced by sublethal pesticide exposure. *Functional Ecology*. 28(6): 1459-1471.
- Giraldeau, L.-A., Caraco, T. Valone, T.J., 1994. Social foraging: Individual learning and cultural transmission of innovations. *Behavioral Ecology*. 1: 35-43.
- 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.

- Gösterit, A., Gürel, F., 2009. Effect of different diapause regimes on survival and colony development in the bumble bee, *Bombus terrestris*. *Journal of Apicultural Research*. 48: 279-283.
- Gürel, F., Gösterit, A., Karşlı, B.A., 2011. Sera koşullarının *Bombus terrestris* L. kolonilerinin tozlaşma performansına etkileri. *Derim*. 28(1): 47-55.
- Ichikawa, N., Sasaki, M., 2003. Importance of social stimuli for the development of learning capability in honeybees. *Applied Entomology and Zoology*. 38(2): 203-209.
- Jeschke, P., Nauen, R., 2008. Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*. 64(11): 1084-1098
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., Elbert, A., 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(7): 2897-2908.
- Kendal, R.L., Boogert, N.J., Rendell, L., Laland, K.N., Webster, M., Jones, P.L., 2018. Social learning strategies: Bridge-building between fields. *Trends in Cognitive Sciences*. 22(7): 651-665.
- Klein, S., Cabirol, A., Devaud, J.M., Barron, A.B., Lihoreau, M., 2017. Why bees are so vulnerable to environmental stressors. *Trends in Ecology & Evolution*. 32(4): 268-278.
- Laloi, D., Pham-Delègue, M.H., 2004. Bumble bees show asymmetrical discrimination between two odors in a classical conditioning procedure. *Journal of Insect Behavior*. 17: 385-396.
- Laloi, D., Sandoz, J.C., Picard-Nizou, A.L., Marchesi, A., Pouvreau, A., Taséi, J.N., Poppy, G., Pham-delègue, M.H., 1999. Olfactory conditioning of the proboscis extension in bumble bees. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 90(2): 123-129.
- Lamsa, J., Kuusela, E., Tuomi, J., Juntunen, S., Watts, P.C., 2018. Low dose of neonicotinoid insecticide reduces foraging motivation of bumblebees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 285(1883): 20180506.
- Laurent, F.M., Rathahao, E., 2003. Distribution of [14C] imidacloprid in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) following seed treatment, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27): 8005-8010.
- Leonard, A.S., Masek, P., 2014. Multisensory integration of colors and scents: insights from bees and flowers. *Journal of Comparative Physiology A*. 200: 463-474.
- Mengoni Goñalons, C., Farina, W.M., 2018. Impaired associative learning after chronic exposure to pesticides in young adult honey bees. *Journal of Experimental Biology*. 221(7): jeb176644.
- Moffat, C., Buckland, S.T., Samson, A.J., McArthur, R., Chamosa Pino, V., Bollan, K. A., Huang J.T.–J., Connolly, C.N., 2016. Neonicotinoids target distinct nicotinic acetylcholine receptors and neurons, leading to differential risks to bumblebees. *Scientific Reports*. 6(1): 1-10.
- Muth, F., Francis, J.S., Leonard, A.S., 2019. Modality-specific impairment of learning by a neonicotinoid pesticide. *Biology Letters*. 15(7): 20190359.
- Muth, F., Leonard, A.S., 2019. A neonicotinoid pesticide impairs foraging, but not learning, in free-flying bumblebees. *Scientific Reports*. 9(1): 1-13.
- Muth, F. 2021. Intra-specific differences in cognition: bumblebee queens learn better than workers. *Biology Letters*. 17(8): 20210280.

- Pavlov, I. P. 1927. *Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex*. Translated and edited by Anrep, GV, Oxford University Press
- Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs, C.A., Goulson, D., Wiemers, M., 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research*. 22: 68-102.
- Raine, N.E., Chittka, L., 2008. The correlation of learning speed and natural foraging success in bumble-bees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1636): 803-808.
- Riveros, A.J., Gronenberg, W., 2009. Olfactory learning and memory in the bumblebee *Bombus occidentalis*. *Naturwissenschaften*. 96: 851-856.
- Samuelson, E.E.W., Chen-Wishart, Z.P., Gill, R.J., Leadbeater, E., 2016. Effect of acute pesticide exposure on bee spatial working memory using an analogue of the radialarm maze. *Scientific Reports*. 6(1): 38957.
- Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., Desneux, N., 2016. Are bee diseases linked to pesticides?—A brief review. *Environment International*. 89: 7-11.
- Scheiner, R., Barnert, M., Erber, J., 2003. Variation in water and sucrose responsiveness during the foraging season affects proboscis extension learning in honey bees. *Apidologie*. 34(1): 67-72.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., ..., Wiemers, M., 2015. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*. 22: 5-34.
- Siviter, H., Koricheva, J., Brown, M.J.F., Leadbeater, E., 2018. Quantifying the impact of pesticides on learning and memory in bees. *Journal of Applied Ecology*. 55: 2812–2821.
- Siviter, H., Johnson, A.K., Muth, F., 2021. Bumblebees exposed to a neonicotinoid pesticide make suboptimal foraging decisions. *Environmental Entomology*. 50(6): 1299-1303.
- Stanley, D.A., Russell, A.L., Morrison, S. J., Rogers, C., Raine, N. E., 2016. Investigating the impacts of field-realistic exposure to a neonicotinoid pesticide on bumblebee foraging, homing ability and colony growth. *Journal of Applied Ecology*, 53(5): 1440-1449.
- Takeda, K., 1961. Classical conditioned response in the honey bee. *Journal of Insect Physiology*, 6(3): 168-179.
- Tan, K., Wang, C., Dong, S., Li, X., Nieh, J.C. 2017. The pesticide flupyradifurone impairs olfactory learning in Asian honey bees (*Apis cerana*) exposed as larvae or as adults. *Scientific Reports*. 7(1): 1-9.
- Tolon, B. 1999. Yaban arılarında sosyal yaşam. *Hayvansal Üretim*. 39(1): 120-127.
- Wang, L., Meeus, I., Rombouts, C., van Meulebroek, L., Vanhaecke, L., Smagghe, G., 2019. Metabolomics-based biomarker discovery for bee health monitoring: A proof of concept study concerning nutritional stress in *Bombus terrestris*. *Scientific Reports*. 9(1): 1-11.
- Whitehorn, P. R., O'Connor, S., Wackers, F. L., Goulson, D., 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*. 336(6079): 351-352.
- Woodcock, B. A., Bullock, J. M., Shore, R. F., Heard, M. S., Pereira, M. G., Redhead, J., ..., Pywell, R. F., 2017. Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. *Science*, 356(6345): 1393-1395.

Worden, B.D., Skemp, A.K., Papaj, D.R., 2005. Learning in two contexts: the effects of interference and body size in bumblebees. *Journal of Experimental Biology*. 208(11): 2045-2053.

Zhao, H., Li, G., Cui, X., Wang, H., Liu, Z., Yang, Y., Xu, B., 2022. Review on effects of some insecticides on honey bee health. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 105219.