



## The Effect of Saturated Atmosphere Spray and Touching Methods Used Conditioning of Honey Bee's on Proboscis Eject Reflections (PER)<sup>#</sup>

Alaeddin Yörük<sup>1\*</sup>, Halil Yeninar<sup>2</sup>

<sup>1\*</sup>School of Applied Sciences Kadirli, Osmaniye Korkut Ata University, 80760 Kadirli/Osmaniye, Turkey

Corresponding author, E-mail: [alaeddinyoruk@osmaniye.edu.tr](mailto:alaeddinyoruk@osmaniye.edu.tr), ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2098-4468>

<sup>2</sup>Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kahramanmaraş Sütçü İmam University, 46100 Onikişubat/Kahramanmaraş, Turkey  
E-mail: [yeninar@ksu.edu.tr](mailto:yeninar@ksu.edu.tr)

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 19/12/2017 Accepted : 19/12/2018</p> <p><b>Keywords:</b> Honey Bee Saturated Atmosphere Spray Touching Proboscis Extension Reflex (PER)</p>	<p>It has been done conditioning experience by observing proboscis eject reflections (PER) and sting ejections (SER) on honey bees. Today, many scientists have showed that honey bees can be used by conditioning for the determination of events such as narcotics, mines, diseases, magnetic fields in the experiment (test). Saturated atmosphere spray and touching methods have been mostly used for studying of proboscis eject reflections (PER). This study was done with different honey bee races and ecotypes and in this study, aromatic plant extract containing 50 cc of atmospheric scent were used for saturated atmosphere spreys conditioning method. The worker bees in the conditioning chamber have been presented by injecting to head level from the 5 centimeter distance approximately in 3 seconds and then they have been rewarded with a syrup mixture of containing a split a (1/1 w/w) sugar and water. In the touching conditioning method, by the touching of worker – bee, antennae with a wooden toothpick dips to oil aromatic plant extract. A single toothpick has been used for every worker bee that has been recorded whether it has showed or not proboscis eject reflections (PER) by repeating three times of these processes with a quarter breaks. In the experiment, it has been observed that all the races and ecotypes of honey bees used in the experiment have showed conditioning in both two methods in the statistical analysis of the recorded data. An important difference has been observed in the conditioning and remembering among the application methods. At the end of the experiment, it has been observed that touching application has more conditioning and remembering rates than saturated spray application in conditioning and remembering. In statistical meaning, these two applications have occurred in two different groups.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 7(2): 162-165, 2019

## Bal Arılarının Koşullu Şartlandırılmasında Kullanılan Doymuş Atmosfer Spreyi ve Dokunma Yöntemlerinin Dil Çıkarma Refleksi (PER) Üzerine Etkileri

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 19/12/2017 Kabul : 19/12/2018</p> <p><b>Anahtar Kelimeler:</b> Bal arısı Doymuş Atmosfer Spreyi Dokunma Dil Çıkartma Refleksi(PER)</p>	<p>Günümüzde bal arılarında dil çıkartma (PER) ve iğne çıkartma (SER) refleksleri gözlemlenerek koşullu şartlandırma araştırmaları yapılmaktadır. Araştırmalar sonucu narkotik maddeler, patlayıcılar, hastalıklar ve manyetik alanlar gibi olguların tespitinde bal arılarının biyo-sensör olarak şartlandırılarak kullanılabilmesi gösterilmiştir. Bal arıları ile yapılan koşullu şartlandırma çalışmalarında doymuş atmosfer spreyi ve dokunma yöntemleri dil çıkartma refleksi (PER) tespitinde yoğun olarak kullanılmaktadır. Bal arılarının farklı ırk ve ekotipleri ile yapılan bu çalışmada; doymuş atmosfer spreyi ile şartlandırma yöntemi için, şartlandırma kabini içerisindeki işçi arılara aromatik bitki özütü içeren 50 cc atmosferik koku; yaklaşık 3 saniye içerisinde 5 cm mesafeden baş hizasına enjekte edilerek tanıtılmış ve arkasından 1/1 şeker-su (w/w) karışımı şurup ile ödüllendirilmişlerdir. Dokunma ile şartlandırma denemesinde ise yağlı aromatik bitki özütüne daldırılan ahşap kürdan işçi arıların antenlerine dokundurularak arkasından 1/1 şeker-su (w/w) karışımı şurup ile ödüllendirilmişlerdir. 15 dakika ara ile üç kez tekrar edilerek koşullu şartlandırılan bal arılarının şartlanma sonrası hatırlama oranları dil çıkartma refleksi (PER) davranışı gözlemlenerek şartlanma gösterip göstermedikleri tespit edilmiştir. Araştırmada kullanılan bal arısı ırk ve ekotiplerinin her iki yöntemle de şartlandıkları gözlemlenmiştir. Bal arılarının koşullu şartlanma uygulaması sonrası hatırlamada; dokunma uygulamasının doymuş atmosfer spreyi uygulamasına göre daha fazla şartlanma ve hatırlanma oranına sahip olduğu tespit edilmiştir.</p>

<sup>#</sup>5. Uluslararası Muğla Arıcılık ve Çam Balı Kongresinde Özet Yayınlandı.



## Giriş

FAO'nun 2014 verilerine göre Dünya üzerinde 83.446.397 adet koloni sayısı (Anonymous, 2014) ile bal, bal mumu, polen, propolis, arı sütü, arı zehiri, arı larvası gibi çeşitli ürünlerinden faydalanılan bal arılarından ürünlerinin dışında hizmetlerinden de yararlanmak için birçok bilimsel çalışma yapılmaktadır. Bal arıları kokulara, tatlara ve renklere duyarlı ve koku alma duyusunun güçlüğü ile karakterize canlılardır (Menzel ve Müller, 1996; Faber ve ark., 1999; Giurfa ve ark., 2001). Bu canlılar karmaşık davranışların çeşitliliği, basit bir merkezi sinir sistem ile klasik ve edimsel koşullanma yolunu, davranış özellikleri ve öğrenme kabiliyetlerinden faydalanılarak farklı alanlarda kullanılabilirler (Menzel ve Giurfa, 2001; Giurfa, 2003; 2007; Abramson ve ark., 2008). Bal arılarının çeşitli çevresel uyarıcı yelpazesi üzerinde bütünleştiği, ayırt edebildiği ve cevaplayabildiği belgelenmiştir (Getz ve Smith, 1987). Deney koşulları altında, farklılaşmak için eğitilebildikleri gösterilmiştir (Laska ve ar., 1999; Fröhlich ve ark., 2000). Benzer kokular arasında, renkler ve diğer görseller örüntüler ve dokunsal ipuçlarını ayırt edebilirler (Giurfa ve ark., 1999; Zhang ve ark., 1999; Menzel ve Shmida, 1993; Chen ve ark., 2003; Dyer ve ark., 2008; Niggebrügge ve ark., 2009; Erber ve ark., 1998; Bernadou ve ark., 2009). Ayrıca, tanıma dayalı uyarınları tanımlayabilirler. "benzerlik" ve "fark" gibi soyut kavramların ayırt edilmesinde kullanılabilirler (Abramson ve ark., 2010; Giurfa ve ark., 2001; Avarguès-Weber ve ark., 2011).

Günümüzde bilim insanları yapmış oldukları deneylerle narkotik maddeler, patlayıcılar, hastalıklar, manyetik alanlar gibi olguların tespitinde biyo-sensör olarak bal arılarının kullanılabileceğini göstermişlerdir. Bu deneylerde bal arılarının dil çıkartma refleksi (PER) ve iğne çıkartma refleksi (SER) gözlemlenerek sonuçlar oluşturulmaktadır. Bal arısının bilişsel ve nöral fonksiyonları, Pavlovyan şartlandırma tekniklerine uygun olan dil çıkartma refleksi (PER), kullanılarak değerlendirilebilir (Abramson CI, 2007; Frost ve ark., 2013). Arılar, laboratuvar ortamlarındaki koku oluşumunu dil çıkartma refleksi (PER) ile ve dışardan uygulanan etkilerle iğne çıkartma refleksi (SER) ile hızlı bir şekilde öğrenebilirler (Tedjakumala ve Giurfa, 2016). Arılar bir uyarıcıya sadece bir kez maruz kaldıktan sonra kısa süreli bir hafıza oluşturabilir ve sadece üç uygulamadan sonra ömür boyu bir hafıza oluşabilir (Menzel ve Müller, 1996).

## Materyal ve Metot

Araştırma da bal arılarının dil çıkartma refleksi (PER) elde etmede bugüne kadar kullanılan dokunma yöntemi ve doygun atmosfer (püskürtme) yöntemlerinin etkinlik değerleri Abromson (1990) yöntemleri kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır.

Araştırma; Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Düziçi Meslek Yüksek Okulu Kampüsü ana binasında (37°15'17.54" Kuzey, 36°27'15.29" Doğu, 367 m Yükseklik) gerçekleştirilmiştir. Araştırmada işçi arıların şartlandırıldığı, içerisinde Resim 1'de görülen arı sabitleme aparatı ve 4 adet şartlandırma kabini bulunan 35 m<sup>2</sup> (7m × 5m) bir oda ile şartlandırma deneyleri arasında

deneme materyali işçi arıların şartlanma öncesi ve sonrası bekletildikleri, aromatik kokular ihtiva etmeyen 12 m<sup>2</sup> (3m × 4m) büyüklüğünde dinlenme odası olarak kullanılmak üzere düzenlenmiş klimatize edilmiş toplam 2 adet oda kullanılmıştır. Odaların ısısı; kovan içi sıcaklık değerleri ile aynı olması için 34°C±1'ye ayarlanmıştır. Dinlenme odasında kısmi rutubet ultrasonik nemlendiricilerle %75±5 RH dolaylarında tutulmaya çalışılmıştır.

Aromatik bitki özütlerinin dokunma ile şartlandırma denemesinde; yağlı aromatik bitki özütü damlatılan iki ucu sivriltilmiş, huş ağacından yapılmış standart ahşap kürdanlar işçi arılarının antenlerine dokundurularak gerçekleştirilmiştir. Atmosferik koku enjeksiyonu ile yapılan şartlandırma çalışmaları; 50 ml hacimli medikal enjektörlerin lateks piston contalarına iğne ile tutturulan absorban kağıtlara, yağlı aromatik (kokulu) bitki özütlerinden emdirilerek uygulanmıştır. Şartlandırma uygulaması için kolonilerden yeterli miktar işçi arı; modifiye edilmiş şarjlı araç süpürgesi ile kolonilerde hazırlanan işçi arı toplama kafeslerinden toplanmıştır. Şartlandırma odasında önceden hazırlanmış dört adet şartlandırma kabininde deneyler gerçekleştirilmiştir. Araştırmada kullanılan her bir işçi arı 30 dakika dinlenme süresine sahip 15 dakika aralıklı biri birbirini takip eden üç tekrarlı üç aşamalı dokuz şartlanma testine tabi tutulmuştur. Şartlandırma sonrası 6-12-24 saat aralıklarında da şartlanmanın hatırlanıp hatırlanmadığının kontrolleri yapılmıştır.



Resim 1 Arı sabitleme aparatına bağlanan arılar ve uygulama kabini

Picture 1 Bees and application cabinet attached to bee fixing apparatus

## Bulgular ve Tartışma

Bal arılarında koşullu şartlanma denemesinde dil çıkarma refleksi (PER) için hava sprey ve dokunma yöntemlerinden oluşan iki farklı uygulama kullanılmıştır. Denemenin başlarında dokunma yöntemi öğrenmede hava sprey yönteminden oldukça ileri bir düzeyde sonuçlar elde etmiştir. Tekrar sayısı artıkça uygulamalar arasındaki fark kapanmıştır.

Hava sprey ve dokunma yöntem uygulamalarına ait ortalama ( $\pm$ S.H.) dil çıkarma refleksi (PER) , en az ve en çok şartlanan işçi arı sayıları (adet) ve istatistiki gruplar

Çizelge 1’de sunulmuştur. Denemenin sonunda elde edilen veriler için istatistiki olarak yapılan analizlerde uygulama şekilleri arasında şartlanmada ve hatırlamada farkın önemli olduğu görülmüştür ( $P<0,05$ ).

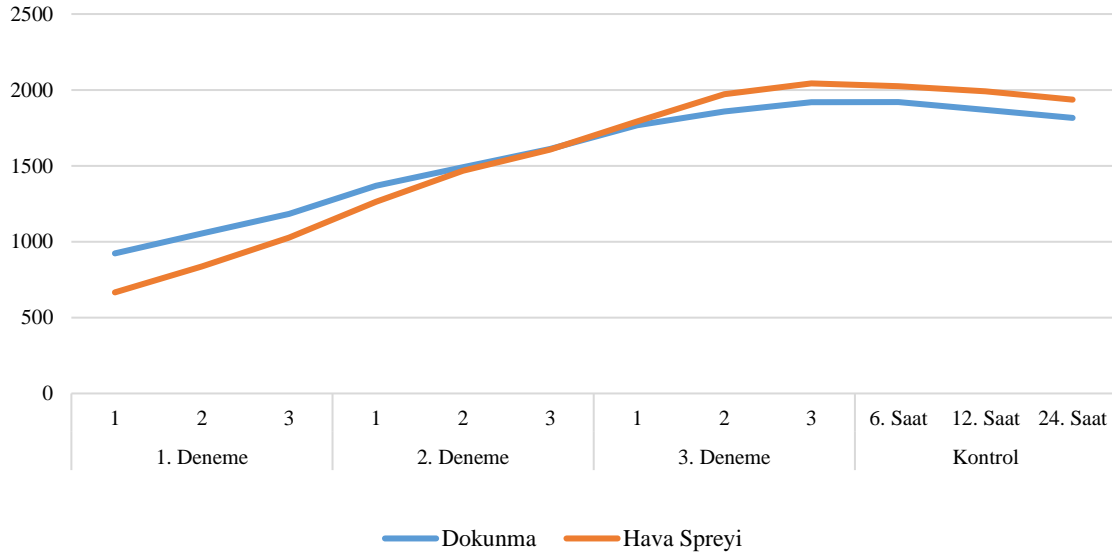
Denemelerin sonunda en çok şartlanma 2043 arı ile hava sprey yönteminde meydana gelmiş olsa da başlangıçta ve ortalama dokunma yöntemi daha etkili görünmektedir. Denemelerin devamında üçüncü aşaması tamamlandığında; yapılan dokuz tekrar sonunda istatistiki analizler incelendiğinde iki yöntem arasındaki dokunma yöntemi lehine önemli olan farkın ortadan kalktığı görülmüştür.

Çizelge 1 Denemelerin sonunda farklı uygulama yöntemlerinden tespit edilen ortalama ( $\pm$ S.H.), en az ve en çok şartlanan, şartlanmayan ve kayıp işçi arı sayıları (adet)

Table 1 Bee numbers of average ( $\pm$  S.H.), the minimum and most conditioned, unconditioned and lost (number) determined from different application methods at the end of the experiments

Uygulama (Zaman)	N	Şartlanan	Şartlanmayan	Kayıp	Şartlanma Oranı %	En az	En Çok	
Dokunma	1	2880	1053,00	1827,00	0	36,56	923	1182
	2	2880	1490,67	1379,333	30	51,76	1368	1612
	3	2880	1848,67	952,33	237	64,12	1767	1920
	Ortalama	2880	1464,111	1386,222	89	50,83	923	1920
Hava Spreyi	1	2880	843,00	2036,33	2	29,27	666	1026
	2	2880	1445,67	1430,667	11	50,20	1263	1607
	3	2880	1935,67	880,000	193	67,21	1792	2043
	Ortalama	2880	1408,11	1449,00	68,66	48,89	666	2043
Genel Ortalama		5760	1436,11	1417,61	78,83	49,86	666	2043

\*: Farklı harfler farklı istatistiki grupları göstermektedir( $P<0,05$ )



Şekil 1 Bal arılarının denemeler boyunca göstermiş oldukları öğrenme değerleri  
Figure 1 Learning values of honey bees during the experiments

Kontrollerde şartlanma ve hatırlamada dokunma uygulaması hava spreyi uygulamasına göre daha fazla şartlanma ve hatırlanma oranına sahip olmuştur. İstatistiki anlamda bu iki uygulama iki ayrı grup oluşturmuşlardır.

Ani ve kısa süreli şartlandırmalar için dokunma yöntemi önem kazanır iken daha uzun süreli şartlandırmalarda hava spreyi yöntemi ön plana çıkmaktadır. Yapılan denemede bal arılarında iki yöntemle de öğrenmenin gerçekleşmiş olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar Şekil 1’de sunulmuştur. Şekil 1 incelendiğinde birinci ve ikinci uygulamada dokunma yöntemi hava sprey yöntemine göre fark gösterse de, bu

farkın ikinci tekrarın sonunda sıfırlanmış olduğu görülmekte, üçüncü uygulamada fark hava sprey lehine değişim göstermektedir.

Araştırma sonuçları başka araştırmacıların bulguları tarafından da desteklenmektedir. Giurfa ve Malun (2004); antenal bölümde yer alan ödüllere karşı öğrenim gösterdiğini kanıtlamış olduklarını söylemektedirler. Onların bu söylemleri yapmış olduğumuz çalışmada elde ettiğimiz antenal dokunmayla öğrenme ile uyum göstermektedir.

Scheiner ve arkadaşları (2005) yaptıkları çalışmada tat alma anten uyarını, tat alma ile ilgili dil uyarıları ve

dokunsal öğrenme ile hafıza arasındaki niceleyici ilişkiyi tanımlamışlardır. Arılar, sakaroz solüsyonları antenlerine uygulandığı zaman, dil uzantılarına uygulanana göre 10 kat daha fazla hassas olduğunu belirtmişlerdir. Onların bu verileri yapmış olduğumuz deneme ile karşılaştırıldığında başlangıçta antenal dokunma, hava sprey yöntemine göre oldukça farklılık göstermekte olduğu görülmüştür. Fakat tekrar sayısının artması her iki yöntemin aralarındaki farkın azalmasına yol açmıştır. Bu durum Dacher ve Gauthier (2008) yapmış oldukları çalışmada beyan ettikleri, “Arılar, bir sakaroz ödülünü, küçük bir metal plakanın antenal dokunsal taramasıyla eşleştirmeyi kolaylıkla öğrenmektedir (birleştirici öğrenme) ve dil çıkartma tepkileri (PER) de tekrarlanan sakaroz uyarılarıyla (ilişkisel olmayan öğrenme) alışkanlık haline gelebilir” ifadeleri ile örtüşmektedir.

## Sonuç

Bal arıları üzerine yapılan öğrenme denemeleri davranışsal gözlemlerden vücuttaki kimyasal değişimlere kadar alanlar üzerinde yapılmıştır. Tüm bu denemelerde antenal dokunma, hava sprey ve elektriksel tehdit yöntemleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada öğrenme yöntemi olarak dokunma ve hava spreyi yöntemleri karşılaştırılmıştır. Kullanılan bu yöntemler arasında deneme sonunda bir fark görülmemesine rağmen kısa süreli denemelerde dokunma yönteminde oldukça fazla öğrenme görülmüştür. Denemeye alınan denekler her iki yöntemde de öğrenme göstermiş oldukları görülmektedir. Bu durum ise denemede her iki yönteminde kullanılabileceğini göstermektedir.

## References (dergi kurallarına göre düzenlenmeli)

Abramson CI. 1990. Invertebrate Learning A Laboratory Manual and Source Book. Washington DC: American Psychological Association.

Abramson CI, Boyd BJ. 2001. An Automated Apparatus For Conditioning Proboscis Extension in Honeybees (*Apis Mellifera*). *Journal Of Entomological Science*, 36: 78-92.

Abramson CI, Mixson TA, Çakmak I, Place AJ, Wells H. 2008. Pavlovian Conditioning Of The Proboscis Extension Reflex in Harnessed Foragers Using Paired Vs. Unpaired And Discrimination Learning Paradigms: Tests For Differences Among Honeybee Subspecies in Turkey. *Apidologie*; 39: 428-435

Abramson CI, Wells H, Bozic J. 2007. A Social Insect Model For The Study Of Ethanol Induced Behavior: The Honey Bee. In: Yoshida R (Ed) *Trends In Alcohol Abuse And Alcoholism Research*. Nova Science, Hauppauge,; Pp 197-218

Anonymous. 2014. FAO statistic <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>[Access:21. July.2017]

Avarguès-Weber A, Deisig N, Giurfa M. 2011. Visual Cognition In Social Insects. *Ann Rev Entomol*; 56: 423-443

Bernadou A, Démares F, Couret-Fauvel T, Sandoz JC, Gauthier M. 2009. Effect Of Fipronil On Side-Specific Antennal Tactile Learning In The Honeybee. *J Insect Physiol*; 55: 1099-1106

Chen L, Zhang S, Srinivasan MV. 2003. Global Perception In Small Brains: Topological Pattern Recognition In Honey Bees. *Proc Nat Acad Sci U S A*. 100: 6884-6889

Dacher M, Gauthier M. 2008. Involvement Of NO-Synthase And Nicotinic Receptors In Learning In The Honey Bee. *Elsevier*. 2008; 200-2007.

Dyer AG, Spaethe J, Prack S. 2008. Comparative Psychophysics Of Bumblebee And Honeybee Colour Discrimination And Object Detection. *J Comp Physiol A* 194: 617-627

Erber J, Kierzek S, Sander E, Grandy K. 1998. Tactile Learning In The Honeybee. *J Comp Physiol A*; 183: 737-744

Faber T, Joerges J, Menzel R. 1999. Associative Learning Modifies Neural Representations Of Odors In The Insect Brain. *Nature Neurosci*; 2: 74-78

Frost EH, Shutler D, Hillier NK. 2013. Effects Of Fluvalinate On Honey Bee Learning, Memory, Responsiveness To Sucrose, And Survival. *The Journal Of Experimental Biology*, 216: 2931-2938.

Fröhlich B, Riederer M, Tautz J. 2000. Comb-Wax Discrimination By Honeybees Tested With The Proboscis Extension Reflex. *J Exp Biol*; 203:1581-1587

Getz WM, Smith KB. 1987. Olfactory Sensitivity And Discrimination Of Mixtures In The Honeybee *Apis Mellifera*. *J Comp Physiol A*; 160: 239-245

Giurfa M. 2003. Cognitive Neuroethology: Dissecting Non-Elemental Learning In A Honeybee Brain. *Curr Opin Neurobiol*; 13: 726-735

Giurfa M. 2007. Behavioral And Neural Analysis Of Associative Learning In The Honeybee: A Taste From The Magic Well. *J Comp Physiol A*; 193: 801-824

Giurfa M, Zhang S, Jenett A, Menzel R, Srinivasan MV. 2001. The Concepts Of ‘Sameness’ And ‘Difference’ In An Insect. *Nature*; 410: 930-933

Giurfa M. 2007. Behavioural And Neural Analysis Of Associative Learning In The Honey Bee: A Taste From The Magic Well. *Journal Of Comparative Physiology*; A193: 801-824. [Http://Dx.Doi.Org/10.1007/S00359-007-0235-9](http://Dx.Doi.Org/10.1007/S00359-007-0235-9) [Access:17.july.2017]

Giurfa M, Malun D. 2004. Associative Mechanosensory Conditioning Of The Proboscis Extension Reflex In Honeybees. *Learning Memory*; 294-302.

Giurfa M, Hammer M, Stach S, Stollhoff N, Müller-Deising N, Mizrycki C. 1999. Pattern Learning By Honey Bees: Conditioning Procedure And Recognition Strategy. *Animal Behaviour*; 57: 315-324.

Laska M, Galizia CG, Giurfa M, Menzel R. 1999. Olfactory Discrimination Ability And Odor Structure-Activity Relationships In Honeybees. *Chem Senses*; 24: 429-438

Menzel R, Shmida A. 1993. The Ecology Of Flower Colours And The Natural Colour Vision Of Insect Pollinators: The Israeli Flora As A Study Case. *Biol Rev*; 68: 81-120

Menzel R, Müller U. 1996. Learning And Memory In Honeybees: From Behavior To Neural Substrates. *Annual Review Of Neuroscience*; 19: 379-404. [Doi:10.1146/annurev.Ne.19.030196.002115](https://doi.org/10.1146/annurev.Ne.19.030196.002115)

Niggebrügge C, Lebouille G, Menzel R, Komischke B, Hempel De Ibarra N. 2009. Fast Learning But Coarse Discrimination Of Colours In Restrained Honeybees. *J Exp Biol*; 212: 1344-1350

Scheiner R, Kuritz-Kaiser A, Menzel R. 2005. Sensory Responsiveness And The Effects Of Equal Subjective Rewards On Tactile Learning And Memory Of Honeybees. *Learning Memory*; 626-635.

Stevanus Rio T, Martin G. 2013. Rules And Mechanisms Of Punishment Learning In Honey Bees: The Aversive Conditioning Of The Sting Extension Response. *The Journal Of Experimental Biology*; 216, 2985-2997 Published By The Company Of Biologists Ltd [Doi:10.1242/Jeb.086629](https://doi.org/10.1242/Jeb.086629)

Zhang SW, Lehrer M, Srinivasan MV. 1999. Honeybee Memory: Navigation By Associative Grouping And Recall Of Visual Stimuli. *Neurobiol Learn Mem*; 72:180-201