T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

ÇİÇEK KOKULARININ *Bombus terrestris* L. ANTEN KEMORESEPTÖR TRANSKRİPTOM PROFİLLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Tunç DABAK

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Fatih DİKMEN

Haziran, 2021

İSTANBUL

Bu çalışma, 10.06.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Dr. Öğr. Üyesi Fatih DİKMEN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Vahap ELDEM
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Nüzhet Cenk SASAL
Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin FYL-2020-36065 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 116Z386 numaralı Bombus arısının (*Bombus terrestris* L.) gelişim sürecinde anten kemoreseptörlerinin genom düzeyindeki ifade eğilimlerinin araştırılması isimli TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleşmesini mümkün kılan herkese ve özellikle:

Hayatımın her aşamasında desteklerini sürekli hissettiğim ve bu süreçte beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme,

Yüksek lisans eğitimim boyunca hoşgörüsü ve tecrübesi ile sürekli yanımda olan, her konuda desteğini gördüğüm değerli hocam ve danışmanım Dr. Fatih Dikmen'e,

Tezimin yürütülmesine destek olan, laboratuvar olanaklarını sağlayarak değerli bilgiler edinmemi teşvik eden Dr. Vahap Eldem'e,

Desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve herhangi bir sorunla karşılaştığımda bana yol gösteren Dr. Çiğdem Özenirler'e,

Öğrenim sürecimiz boyunca birlikte vakit geçirdiğimiz, tecrübelerimizi ve bilgilerimizi paylaştığımız, birlikte sevinip, birlikte üzüldüğümüz değerli laboratuvar arkadaşlarıma,

Evrenin karanlığında yolumuzu aydınlatan bilimsel çalışmalarda kullanılan, öncelikle İsmet olmak üzere tüm deney canlılarına,

Bilimin gelişmesine, etik davranışların yüceltildiği modern bir toplumun oluşmasına katkı sağlayan ve bu yolda emek harcayan herkese teşekkür ederim.

Haziran 2021 Tunç DABAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**
TABLO LİSTESİ ..... **ix**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **x**
ÖZET ..... **xi**
SUMMARY ..... **xii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **3**
2.1 BÖCEKLERDEKİ KOKU DUYUSUNUN İNSANLAR İÇİN ÖNEMİ 3
2.1.1 Model organizma olarak *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758) 3
2.1.2 Bombusların kokuya bağlı davranışları 4
2.2 KOKU ALGILAMADA ANTENİN ROLÜ 5
2.2.1 Böcek antenlerinde sensilla tipleri ve görevleri 8
2.2.1.1 Kemoreseptör görevi görenler (Feromon ve koku algılayan) *9*
2.2.1.2 Nem ve sıcaklık algılayan *10*
2.2.1.3 Hareket sensörü olarak görev alan *10*
2.2.2 Koku Alma Fizyolojisinin Moleküler Mekanizması 13
2.2.3 Mekanizmadaki proteinlerin görevi 14
2.2.4 Böceklerde Koku Reseptörü Genleri ve Evrimi 17
2.3 KOKU RESEPTÖRLERİNİN VE İLGİLİ GENLERİN İNCELENMESİNDE GÜNCEL YÖNTEMLER 21
2.3.1 RNA Dizileme 21
2.3.2 qPCR'ın transkriptom çalışmalarındaki yeri 23
2.3.3 Biyoinformatik analizlerde kullanılan programlar ve araçlar 24
3. MALZEME VE YÖNTEM **26**
3.1 TİCARİ KOLONİ YETİŞTİRME ŞARTLARI 26
3.2 DENEY DÜZENEĞİ 27
3.2.1 Arıların beslenmesi ve kokuya alıştırılması 29
3.2.2 Denek işçilerin seçimi 30

3.3 ANTEN DOKULARININ ELDE EDİLMESİ 31
3.4 TOTAL RNA İZOLASYONU 32
3.4.1 cDNA oluşturulması 32
3.5 HEDEF GENLERİN BELİRLENMESİ 33
3.6 HEDEF GENLERİN QPCR ANALİZİ 37
4. BULGULAR 38
4.1 YÖNLENDİRME DENEYİ İLE İLGİLİ BULGULAR 38
4.2 İZOLASYON SONUÇLARI 39
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 46
5.1 YÖNLENDİRME VE PER DENEMELERİ 46
5.2 RT-QPCR SONUÇLARI KAPSAMINDA KOKU İLE İLİŞKİLİ GEN İFADE FARKLILIKLARI 46
5.2.1 ORCO 47
5.2.2 OR4 48
5.2.3 OR47a, OR65a, OR10a, OR82a, OR49b ve OR9a 48
5.2.4 OR2 49
5.2.5 OR13a 49
5.2.6 OR22c 50
5.2.7 OR92a 50
5.2.8 IR25a 50
5.2.9 Koku reseptörlerinin genel değerlendirmesi 51
5.3 RT-QPCR SONUÇLARI KAPSAMINDA KOKU İLE İLİŞKİLİ OLMAYAN GEN İFADE FARKLILIKLARI 52
5.3.1 HCN3 52
5.3.2 IFT172 52
5.3.3 3-methyladenine DNA glycosylase 53
5.3.4 Hexamerin 53
5.3.5 RBF-1 54
5.3.6 Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase 3 (Nmnat3) 54
5.3.7 Akuaporin 55
5.3.8 T complex associated testis expressed protein 1 55
5.3.9 Protein rolling stone 56
5.3.10 Vitellogenin 56
5.3.11 Calcium-activated potassium channel slowpoke 57
5.3.12 Koku ile ilişkili olmayan genlerin genel değerlendirmesi 57

KAYNAKLAR **58**
EKLER **74**
ÖZGEÇMİŞ **75**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1 *Bombus terrestris* anteninin TEM (taramalı elektron mikroskop) görüntüsü.....6

Şekil 2.2 Böceklerde genel olarak görülen farklı anten tipleri.....7

Şekil 2.3 *Bombus terrestris* anteninin TEM görüntüsü ile elde edilen bazı sensillum tipleri.....8

Şekil 2.4 Böceklerdeki farklı sensilla yapıları.....9

Şekil 2.5 Olfaktör sensillum içerisinde gerçekleşen ve gerçekleştiği tahmin edilen koku alma ve sinyal iletim mekanizması 14

Şekil 2.6 Farklı böcek gruplarında tespit edilen reseptör ailelerine ait evrimsel sürecin bitkilerin evrimiyle karşılaştırılarak farklı jeolojik dönemlerde ortaya çıkan genlerin birbirleriyle olan ilişkisi.....20

Şekil 3.1 Ticari bombus yuvası katmanları.....26

Şekil 3.2 Bombus kolonisinin yuva giriş ve çıkış delikleri.....28

Şekil 3.3 Deney düzeneğinin şematik yapısı.....28

Şekil 3.4 Deney düzeneğinin üstten görünüşü.....29

Şekil 3.5 Yuva içi resimleri.....30

Şekil 3.6 Bombus arılarının anten diseksiyonları.....31

Şekil 3.7 Kurutulmuş olarak teslim alınan primerlerin sulandırılma işlemi.....37

Şekil 4.1 Dil uzatma (PER) davranışı sergileyen işçiler.....39

Şekil 4.2 Öjenol için şartlandırılmış olan arıların her bir gen ifadesinin 2 referans gen üzerinden kat artış değerleri.....45

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1 Üç ana sensilla çeşitlerinde bulunan koku algılayıcı nöron (OSN), reseptör ve koreseptör ile ilgili genler.....11

Tablo 2.2 Böceklerdeki OR gen sayıları.....17

Tablo 3.1 qPCR analizinde gruplar arası farklılık göstermesi beklenen genler için tasarlanan primerler.....34

Tablo 3.2 Primerleri tasarlanan genlerin işlevleri ve kısaltma kodları.....35

Tablo 3.3 qPCR analizinde kullanılan farklılık göstermesi beklenen genlerin çalıştığını onaylayabileceğimiz referans "housekeeping" genlerine ait primerler.....36

Tablo 3.4 Her bir PCR kuyusu için "SYBR" Green Master Mix protokolüne bağlı olarak gerçekleştirilen qPCR basamağında kullanılan hacimler.....37

Tablo 4.1 RNA örneklerinin Nanodrop Thermo 2000C ölçüm sonuçları.....39

Tablo 4.2 cDNA örneklerinin Nanodrop Thermo 2000C sonuçları.....40

Tablo 4.3 qPCR işlemi ile elde edilen C_T değerleri.....41

Tablo 4.4 $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak, deney grubuna ait değerlerin kontrol grubuna göre referans genler üzerinden kıyaslanarak belirlenen kat artış değerleri.....42

Tablo 4.5 Negatif yöndeki artışlar ile birlikte kat artış değerleri.....43

Tablo 4.6 Kontrol ve deney grupları arasında yapılan t testine dair istatistik değerleri.....44

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
g	: Bağıl merkezkaç kuvveti
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
ng	: Nanogram
µM	: Mikromolar
w/v	: Ağırlık/Hacim

Kısaltmalar	Açıklama
ASP	: Anten Spesifik Protein
bç	: Baz çifti
CSP	: Kemosensör Protein
ÇS	: Çukur Sensillum
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
GPCR	: G Proteini Kenetli Reseptör
GR	: Tat alma Reseptörü
IR	: İyonotropik Reseptör
KS	: Kıl Sensillum
OBP	: Koku Bağlayıcı Protein
ODE	: Koku Parçalayıcı Enzim
OR	: Koku Reseptörü
ORN/OSN	: Koku Reseptör Nöronu/ Koku Algılama Nöronu
Orco	: Koku reseptör ko-reseptör
PBP	: Feromon Bağlayıcı Protein
PDE	: Feromon Parçalayıcı Enzim
PER	: Proboscis Uzatma Refleksi
PR	: Feromon Reseptörü
RNA	: Ribonükleik Asit
RT-qPCR	: Ters Transkripsiyon – Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SNMP	: Duyusal Nöron Membran Proteini
TEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇİÇEK KOKULARININ *Bombus terrestris* L. ANTEN KEMORESEPTÖR TRANSKRİPTOM PROFİLLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Tunç DABAK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Fatih DİKMEN

Karasal yaşama adapte olmuş böcekler, hayatlarını devam ettirebilmek için çevrelerindeki kimyasal bilgiyi kullanmaktadır. Bu bilgiler, yuva alanı belirleme, eş seçimi, besin arayışı, av tespiti ve avcılardan kaçma gibi eylemleri gerçekleştirirken kullanılmaktadır ancak bunun için böcekler, çevrelerindeki kokuları birbirlerinden ayırt edebilmeli ve kokuya yönelik davranış farklılıkları gösterebilmelidirler. Bu davranışlar içinde arılar tarafından gerçekleştirilen besin arayışı, tarımsal ve doğal vejetasyondaki çiçekli bitkilerin tozlaştırılmasını sağlamaktadır. Bu çalışmada seralarda polinatör arı olarak sıkça kullanılan ve ticari olarak yetiştirilen *Bombus terrestris* (L.) türünün, öjenole şartlandırıldığında antenlerinde görülen gen ifade farklılıkları karşılaştırılmıştır. Böylelikle, spesifik bir kokunun ve kokuya bağlı öğrenme davranışının etkisinin gen düzeyinde yarattığı farklılıklar ele alınmıştır. Gözlenen farklılıklar sayesinde, arıların kokuya dayalı öğrenme ve davranış çalışmaları için hangi genlerin üzerinde durulması gerektiği ve koku reseptörlerinin yönelime bağlı hareketleri belirleyen genlerle yakınlığı gibi bilgiler tartışılmıştır. Bunun yanısıra, arıların seracılık ve tarımda istenilen bitki gruplarına yönlendirilmesini sağlamak adına yapılacak çalışmalar için üzerine yoğunlaşılması gereken genler ve arıların seralarda daha efektif kullanılmasını sağlamaya yönelik öneriler sunulmuştur.

Haziran 2021, 87 sayfa.

Anahtar kelimeler: RT-qPCR, Koku reseptörleri, Bombus arısı, kokuya şartlandırma, PER

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION of the EFFECT of FLORAL SCENTS on TRANSCRIPTOME PROFILES of ANTENNAL CHEMORESEPTORS of *Bombus terrestris* L.

Tunç DABAK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Fatih DİKMEN

Insects use the chemical information around them to survive by performing actions such as nest site determination, mate selection, foraging, prey detection and hiding from predators. In other words, insects must be able to distinguish between different type of scents in their environment and differ in odor-oriented behavior. The foraging activity carried out by bees enables the pollination of flowering plants in agricultural and natural vegetation. In this study, gene expression differences observed in the antennae of commercially reared *Bombus terrestris* (L.) species which is frequently used as pollinator bee in agricultural production in greenhouses when conditioned to eugenol, were compared by using RT-qPCR method. Thus, the differences caused by a specific odor and the effect of odor-related learning behavior were discussed at the gene level. In addition, the genes that should be focused on in order to direct the bees to the desired plant groups in greenhouse and agriculture as well as suggestions for the more effective use of bees in greenhouses were presented.

June 2021, 87 pages.

Keywords: RT-qPCR, Olfactory receptors, Bumblebee, odor-conditioning, PER

1. GİRİŞ

Günümüzde kayıt altına alınmış 1 milyon civarında böcek türü bulunmaktadır ve canlı çeşitliliğinin yaklaşık 70%'ini bu topluluk oluşturur (Stork, 2018). Bu durum onların dünyadaki organizmalar arasındaki en baskın yaşam formu olarak nitelenmelerine neden olmaktadır (Gullan ve Cranston, 2010; Foottit ve Adler, 2017). Dünyadaki hemen hemen her habitat içerisinde böceklere rastlamak mümkündür (Gullan ve Cranston, 2010). Bu denli başarılı olmalarının ardındaki sır, müthiş adaptasyon özellikleri ve gösterdikleri çeşitliliktir (Klowden, 2013; Suh vd., 2014; Gullan ve Cranston, 2010). Adaptif (uyumsal) özellikleri arasında her ne kadar morfolojik karakterler gözümüze daha çok çarpsa da, farklı çevre koşullarında verdikleri fizyolojik cevaplar da bu konuda onları ön plana çıkarmaktadır (Klowden, 2013). Örnek olarak, yemek bulmak ve görev ayrımlarının yapılması gibi işlemler için koloni sistemlerinde yaşayan sosyal böceklerde, iletişim ile ilgili adaptasyonlar, en az morfolojik adaptasyonlar kadar önem arz etmektedir (Hansson ve Stensmyr, 2011; Suwannapong ve Benbow, 2011). Böceklerde görülen iletişim çeşitlerinden olan kimyasal iletişimin sağlanması, koku mekanizmasının doğru çalışmasına bağlıdır. Böcekler, algıladıkları farklı kokulara göre nörolojik olarak farklı cevaplar üretirler ve böylelikle hayatta kalma başarılarını artırırlar (Goulson, 2010).

Böceklerin duyarlı olduğu kokular genelde feromonlar ve havada yayılan kokular olarak belirtilebilir (Goulson, 2010) ve bu tip kokular semiyokimyasallar olarak nitelenir (Fan J., 2011). Semiokimyasallar küçük molekül ağırlıklarına sahip çok hafif koku kimyasal maddeleri olarak tanımlanmıştır (Fan J., 2011). Böcekler semiokimyasalları hem tür içi hem de türler arası etkileşimde kullanırlar (Gullan ve Cranston, 2010; Fonta ve Masson 1987). Bu etkileşimin gerçekleşmesi için semiokimyasal bir canlı tarafından salgılanmalı veya pasif olarak etrafa yayılmalıdır. Etrafa yayılan bu semiokimyasalın bir diğer canlı tarafından algılanması ve sonuçta sinir sisteminde bir sinyalin üretilmesi gerekmektedir. Bu sinyalin oluşması için kokunun tutunacağı, bir kokuya özgü ya da geniş çaplı kokuları algılayan bir koku reseptörü (OR, olfaktör reseptör) gerekmektedir (Andersson, 2015).

Böceklerde kokuların algılanmasını sağlayan reseptörler, anten, maksillar palpus, bacaklar, ovipozitör ve sersi gibi bir çok vücut kısmında yer almaktadır. Ancak bu vücut bölümleri arasında antenler, bu işlev için en temel organ olarak belirlenmiştir (Chapman, 2013). Bu

açıdan, böceklerde koku alma/koklama eyleminin daha iyi anlaşılabilmesi için antene odaklanılması kaçınılmazdır. Kokuyu algılama biçimleri ve dolayısıyla da kokuyla iletişim dilleri çözüldükçe, insanın böceklerle olan çekişmesi de, ekolojik dengeler bozulmadan, insan hayatına uyumlu çözümler ile neticelendirilebilecektir. Bu hem ekolojik hem de sağlık ve ekonomi yönünden farklı faydalar barındırabilme potansiyeli olan bir konudur. Bu tez çalışması bu amaçla tarımsal üretimde tozlaştırıcı olarak sıklıkla faydalanılan *Bombus terrestris* (L.) türü arıların anteninde gerçekleşen koku alma eyleminin moleküler mekanizmalarından bazılarını aydınlatmayı hedefleyerek bulguların tarımsal üretimde farklı bir perspektif sunmasını amaçlamaktadır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 BÖCEKLERDEKİ KOKU DUYUSUNUN İNSANLAR İÇİN ÖNEMİ

Evrimsel süreçte böcekler için koku duyusu, hayatta kalmaları için büyük önem teşkil etmektedir (Raguso, 2004). Örneğin, dişi bir sivrisineğin yumurtalarının gelişmesi ve beslenebilmesi için diğer hayvanların kanlarına ihtiyacı vardır (Briegel, 1985). Ancak sivrisinek, diğer hayvanları belirlemede yalnızca görsel izleri değil, yöneleceği canlının bıraktığı karbondioksit ve vücut kokusunu da takip eder (Gillies, 1980). Bu yönelim ile hayatta kalma başarısını artırmış olur. Sivrisineğin hayatta kalma başarısını arttıran koku faktörü insan için dezavantaj sağlamıştır. Çünkü sineğin taşıdığı patojenlere bağlı gelişen hastalıklar insan hayatını negatif yönde etkilemiştir (Kindhauser vd., 2016; Weaver ve Lecuit, 2015; Halstead, 2007). Bu negatif etkiden kurtulmak için sinek kovucular, ilaçlamalar ve kimyasal mücadele insanların önceliklerinden biri olmuştur (Tsitoura vd., 2015; Afify vd., 2019; Syed ve Leal, 2008; Bohbot vd., 2011). Bunun yanısıra, çekirge sürüleri (Guo vd., 2020), keneler (Palsson vd., 2008), orman zararlıları olarak tanımlanan bazı böcekler (Liebholt, 2012) ve tarım zararlılarına (Peyrovi vd., 2013) karşı da benzer şekilde koku ile yanıltıcı veya farklı yönlendirici mücadele yöntemleri geliştirilmiştir. Tüm bunlarla birlikte, insan hayatına yararı olan böceklerden faydalanmamız veya faydalı olan böcekleri korumamız için de koku duyusunun nasıl çalıştığını anlamamız gerekmektedir (Singh vd., 2015).

2.1.1 Model organizma olarak *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758)

Koku duyusunu anlamak ve mekanizmasını tespit etmek için bir çok hayvan modeli kullanılmıştır (Vogt ve Riddiford, 1981; Swarup vd., 2011; Ishida vd., 2004). Bu hayvan modellerinden birisi de *Bombus terrestris* (L.)'dir (Fonta ve Masson, 1987). *Bombus* cinsi arılar, gerçek sosyal yaşam gösteren (ösosyal) ve koloni oluşturan arılardır. Dünya üzerinde 250 kadar türe sahiptir (Williams vd., 2008) ve ülkemizde ise 47 türü yaşamaktadır (Rasmont vd., 2009). Bu cins içerisindeki türlerden, ülkemizde en geniş yayılım alanına sahip olan ve son 20 yıldır örtü altı tarımda en çok kullanılan tür ise *B.terrestris*'tir (Gösterit ve Gürel, 2014). Tarımda çokça tercih edilmelerinin sebeplerinden biri, büyük vücut yapıları ve vücudunu çevreleyen yoğun kıl tabakası sayesinde bal arılarına göre daha çok polen taşıyabilmeleridir (Free ve Williams, 1972). Ayrıca uygun olmayan hava koşullarında bile (rüzgarlı, 15 ^{o}C altındaki sıcaklıklarda ve hafif yağmurda) bal arısı çalışmazken bombuslar çalışabilmektedir

(Heinrich, 1979). Bu da onları özellikle ılıman kuşakta sert geçen erken bahar dönemleri için alternatif bir tozlaştırıcı haline getirmektedir. Bunların yanında bombus arıları örtü altı yetiştiriciliğinde veya tozlaştırma kafeslerinde kullanıma da çok uygundurlar (Dabak ve Özenirler, 2018). Çünkü küçük koloni yapısı sayesinde, seralarda rahatlıkla strese maruz kalmadan çiçekleri tozlaştırabilmektedirler (Robert vd., 2017). Günümüzde, domates ve patlıcan gibi Solanaceae ailesine ait bitki yetiştirilen seralarda tozlaştırıcı arı olarak kullanılmaktadır (Teppner, 2005; Vergara ve Buendia, 2012) çünkü domates bitkisinin çiçeklerinin polen salınımının gerçekleşmesi için çiçeğin belirli bir frekansta titreşime (buzzing) maruz kalması gerekmektedir (De Luca vd., 2012). Bal arısı bu titreşimi sağlayamadığından domates tozlaşması için faydasız bir tür olarak karşımıza çıkar (Zhang vd., 2015). Ancak bombus güçlü gövde kaslarıyla çiçek üzerinde yeterli bir titreşim oluşturur ve bu da Solanaceae ailesine üye tarımsal üretimde kullanılan çiçekli bitkilerin polen salınımını uyarır (De Luca vd., 2012). Bu açıdan bombus arıları tarımsal üretimde ayrı bir öneme sahiptir. Bu da onları, beslenme davranışını etkileyen dolayısıyla bitki tercihlerini belirleyen koku gibi faktörlerin araştırılmasında önemli bir model organizma yapmaktadır.

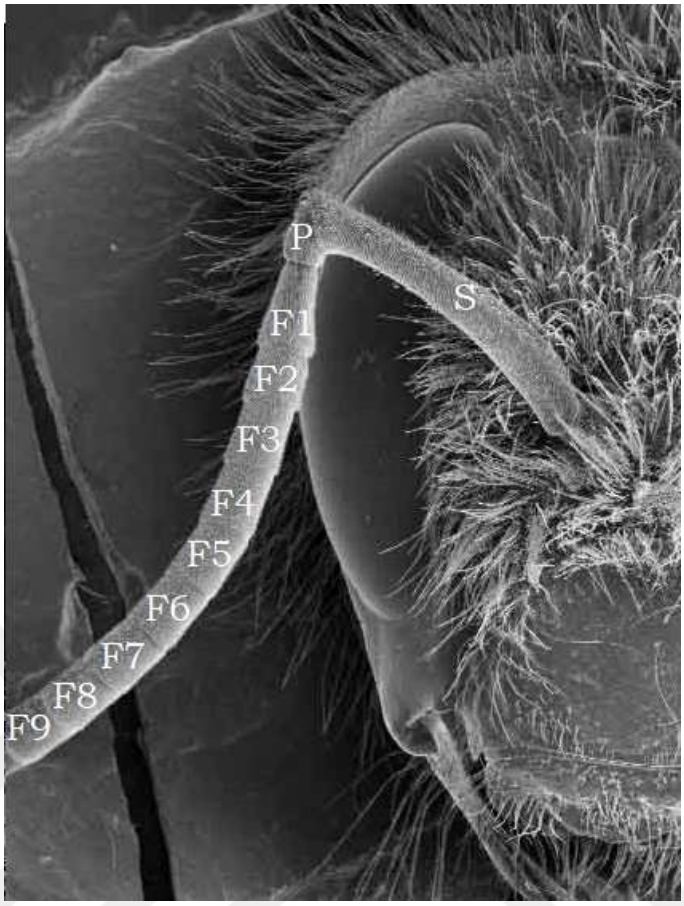
2.1.2 Bombusların kokuya bağlı davranışları

Doğal bir bombus kolonisinin varlığı, kraliçe arının aktivitesine bağlıdır. Bir önceki sene gelişmiş ve çiftleşmiş olan kraliçe, kış uykusuna yatmak ve diğer sene koloni kurmaya başlamak için uygun yuva aramaya başlar. Çoğunlukla diğer canlılar (fare, yılan, kirpi ve diğer böcekler) tarafından daha önceden kullanılmış, terkedilmiş ve genellikle yer altındaki korunaklı bölgelerde yuva alanını belirler (Alford, 1969) ancak taş duvarlarda (Skovgaard, 1936) ve çürük ağaç gövdelerinde kışladıkları da bilinmektedir (Tkalcu, 1960, 1961; Haeseler 1972). Kışlayan kraliçe söğüt ağaçlarının çiçeklenmesiyle örtüşen bir zaman aralığında, erken bahar döneminde havaların ısınmaya başlamasıyla uykusundan uyanır (Dylewska, 1962). Ardından yumurtalarını, kendi topladığı polen, nektar ve vücut salgılarından oluşturduğu küpleri andıran odacıklar içerisine bırakır (Sladen, 1912). İlk larvalar ergin evreye ulaşana kadar yuva oluşturma, yavru bakımı ve yuva ısısını sabitleme faaliyetlerini kraliçe tek başına gerçekleştirir (Heinrich, 1972). İlk ergin işçiler geliştikten sonra kraliçe artık yuvayı terketmez ve işçiler genel olarak polen ve nektar toplama faaliyetlerini gerçekleştiren tarlacılar (forager) ve yavru bakımı ile yuva inşaasını üstlenen bakıcılar (nurser) olmak üzere birbirlerinden farklı 2 görev üstlenirler (Goulson, 2010). Hayatta kalabilmek için çiçek nektarı ve polenine ihtiyaç duyan

koloninin polen ve nektar ihtiyacına göre farklı sayıda işçiler bu ihtiyacı gidermek için yuvayı tarlacılık faaliyetleri gerçekleştirmek üzere terk eder (Cartar ve Dill, 1990). Çiçek tercihlerini oluştururken, ilk uçuşuna başlayan tarlacı işçi etrafındaki çiçekleri ziyaret eder ve bunlar içerisinden en çok ödülü (nektar/polen kalitesi ve miktarı, nektardaki şeker oranı gibi etmenler) hangi çiçekten alıyor ise tarlacılık faaliyetini o bitkiyle sürdürür (Martin vd., 2018). Bu yönelim "çiçek sabitlemesi" (floral fidelty) veya "yiyecek arama sadakati" (foraging constancy) olarak adlandırılmıştır ve arının az enerji harcayarak daha zengin içerikli besin toplamasını sağlayan bir davranış şeklidir (Gegear ve Laverty, 2005; Dornhaus ve Chittka, 2005). Bu davranışı gerçekleştirirken, etraftaki alternatif besin kaynaklarını görmezden gelerek sadece seçtiği bitkiye odaklanır ve bu bitkiye tekrar tekrar ulaşım sağlayabilmek için etrafındaki yer işaretlerini, coğrafik etmenleri ve nektar-bitki kokusunu izler (Philippides vd., 2013; Dornhaus ve Chittka, 1999). Bu açıdan tarlacı işçiler, yuvaya döndüklerinde topladıkları besin içeriklerini kovandaki işçilere tattırarak onlara da ödül varlığını belirtmeye çalışır. Bu haberleşme bal arılarındaki dansa çok benzemez ve bu açıdan yön veya mesafe belirtilmez (Goulson, 2010). Ama diğer işçilere çarpan ve feromon salgılayan bombus arıları en azından etraftaki güzel besin kaynaklarının varlığını bildirir (Dornhaus vd., 2003). Bu işaret, daha önceden bu bitkiye yönelim göstermemiş olan kolonideki arıların bu bitkilere yönelim göstermelerini sağlamaktadır (Kawaguchi vd., 2007). Bu da onların belirli bir kokuyu takip ettiklerini bizlere göstermektedir. Beslenme noktasında kokuyu bu denli etkili bir şekilde kullanan model organizmalardan birisi olması, bu canlı türü ile çalışmayı anlamlı kılan en önemli faktörlerdendir.

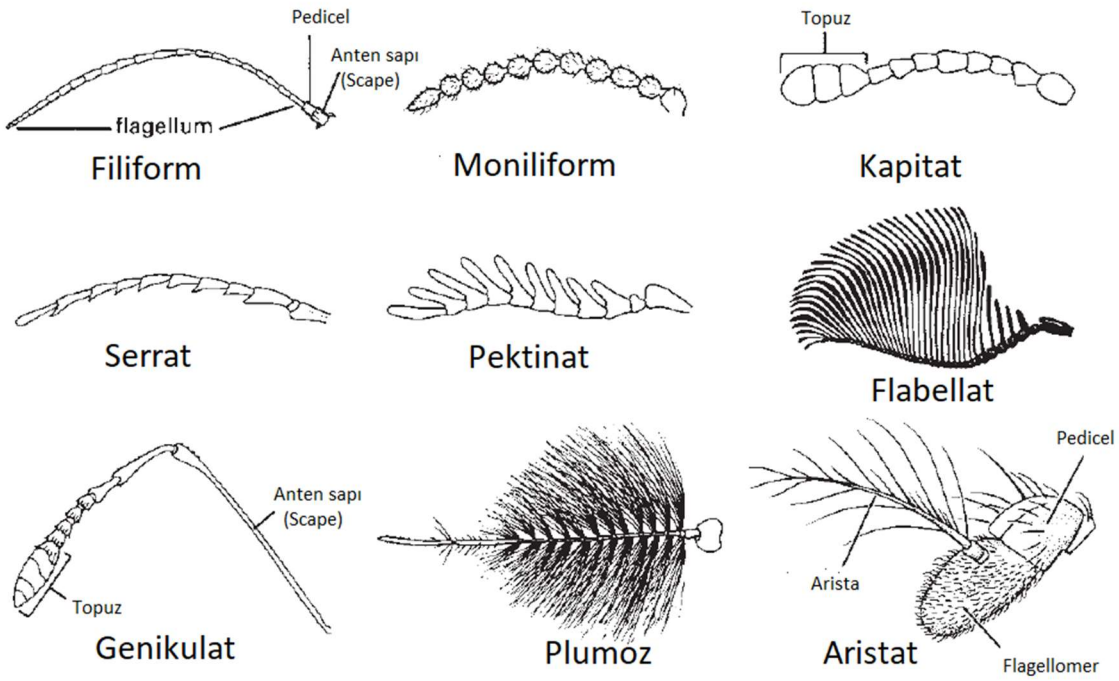
2.2 KOKU ALGILAMADA ANTENİN ROLÜ

Böceklerde koku algılayan ana organ antenler olarak belirlenmiştir (Chapman, 2013). Antenler, segmentli yapılardır. İlk segmenti olan scapus ile böceğin baş kısmına bağlanır. Scapusun devamında pedicel adı verilen bir segment bulunmaktadır. Pedicelin bünyesinde antenin hareket ettirilmesine yardımcı kas bağlantıları ve sensör hücreleri barındıran Johnston's organı yer alır. Ardından gelen segmentlerin her biri flagellomer olarak, tamamı ise flagellum olarak adlandırılır. Bu bölüm anten yüzeyinde en çok sensilla bulunduran kısımdır (Goulson, 2010) (Şekil 2.1).



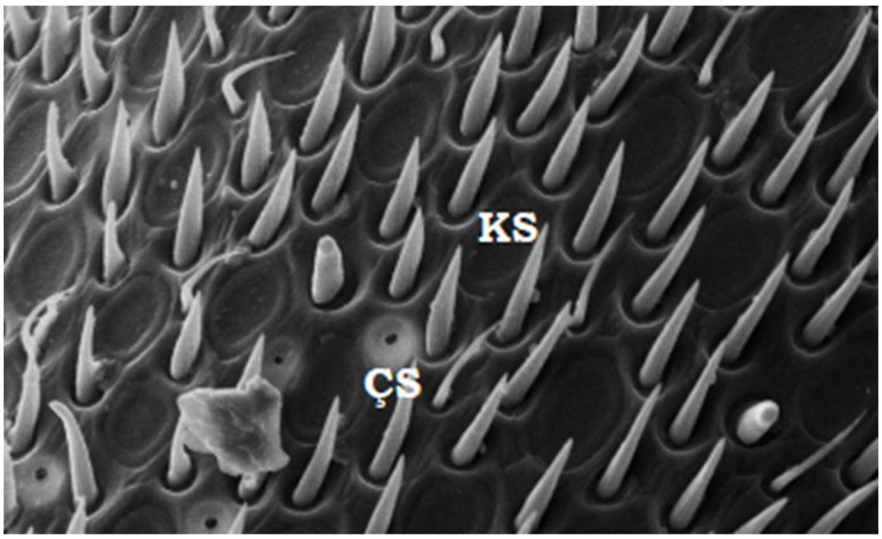
Şekil 2.1 *Bombus terrestris* anteninin TEM (taramalı elektron mikroskobu) görüntüsü P: Pedicel, S: Anten sapı Scape, **F1-F9**: Flagellomer

Farklı böcek gruplarında farklı anten tipleriyle karşılaşmak mümkündür. Genel olarak anten tipleri flagellum kısmındaki değişimlere göre isimlendirilmişlerdir ve kabaca 9 farklı tip en çok göze çarpar (Gullan ve Cranston, 2010) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Böceklerde genel olarak görülebilen farklı anten tipleri (Gullan ve Cranston, 2010'dan değiştirilerek alınmıştır).

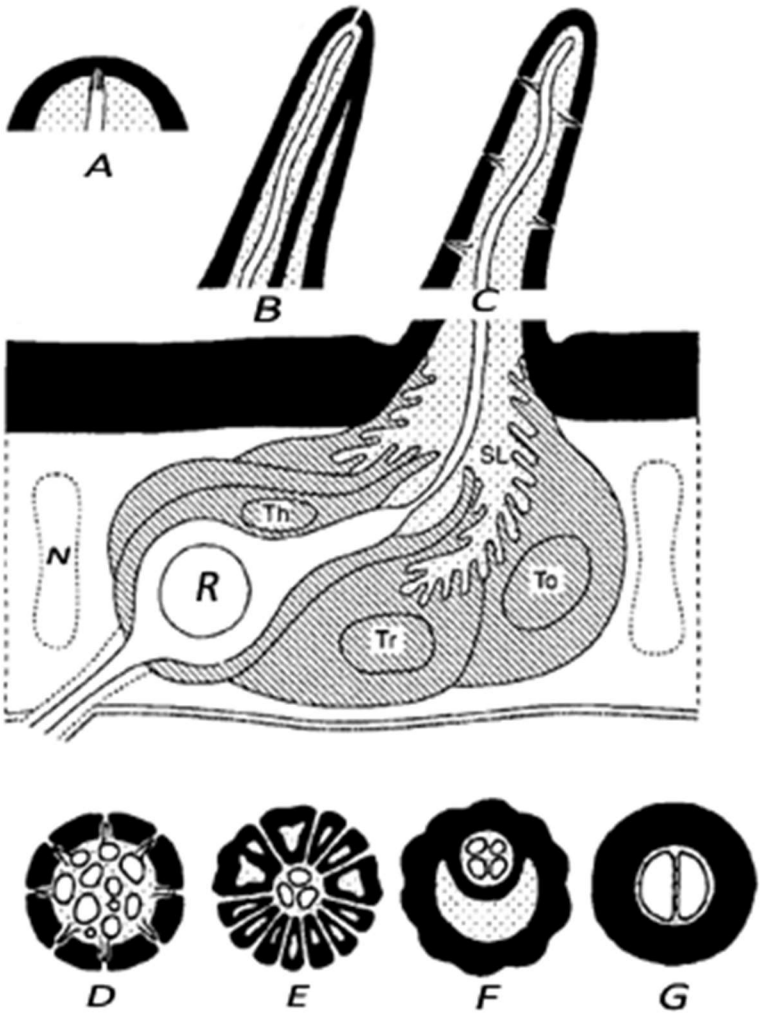
Antenlerin yüzeyi, böceğin dış iskeletini oluşturan kutikülar yapı ile kaplanmıştır (Goulson, 2010). Bu kutikülar yapı, taramalı elektron mikroskopu (TEM) ile incelendiğinde kutiküla yüzeyinde bulunan farklı yapılarda sensilla tipleri görülmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 *Bombus terrestris* anteninin TEM görüntüsü ile elde edilen bazı sensillum tipleri **KS**: Kıl yapısındaki sensillum, **ÇS**: Çukur yapısındaki sensillum

2.2.1 Böcek antenlerinde sensilla tipleri ve görevleri

Antenler koku alma duyusunda en önemli yeri işgal eder ancak antenler koku almanın yanısıra, sıcaklık, nem, zayıf elektrik alanları, rüzgar yönü, tat ve karbondioksit yoğunluğunu da algılarlar (Agren ve Hallberg, 1996; Sutton vd., 2016). Bu kadar çeşitli etmenleri algılamak için özelleşmiş antenlerin üzerinde sensilla adı verilen ve birçok çeşidi bulunan ufak kıl benzeri yapılar belirlenmiştir. Sensilla işlevleri ve şekilleri türler ve hatta cinsiyetler arası farklılık göstermektedir (Steinbrecht, 1996). Farklı şekildeki sensilla farklı isimler almıştır (Syed, 2015). Bu değişik sensilla tipleri Şekil 2.4'te gösterilmektedir.



Şekil 2.4 Böceklerdeki farklı sensilla yapıları. **A-C**: Farklı şekildeki sensilla uzantıları. **D-G**: Sensillum enine kesitleri. Kutikula siyah olarak gösterilmiştir. **A**: Çan şekilli sensillum. B ve F: Tat algılayıcı (gustatory) sensillum. **C ve D**: Tek duvarlı olfaktör sensillum. **E**: Çift duvarlı olfaktör sensillum. **G**: Porsuz sıcaklık ve nem (thermo-hygro) reseptörü. **N**: Farklılaşmamış epidermal hücreler. R: Nöron hücresi; bir veya daha fazla bipolar reseptör nöron hücresi olmak üzere beyne bir akson ile ve sensillum içerisine ise dendrit uzantısı ile erişir (A-G 'deki beyaz profiller). **Th, Tr ve To**: Nöron hücresini ve sensillum lenf sıvısını çevreleyen 3 epitel hücre. (Steinbrecht, 1996'dan değiştirilerek alınmıştır).

2.2.1.1 Kemoreseptör görevi görenler (Feromon ve koku algılayan)

Trikoid sensilla, uzun sivri ya da küt uçlu kıl benzeri yapıdadır (Smith, 2009; Simpson, 2005; Shanbhag vd., 1999) ve feromonlara özelleşmiş nöronlara sahip oldukları düşünülmektedir (Brito vd., 2016).

Bazikonik sensilla, daha ufak boyutlarda ve çatallanmış bir görünüme sahiptir (Steinbrecht, 1996).

Plakoid sensilla ise, bir fissür ile çevirili ve radyal olarak çizgili oval bir plaka olarak karakterize edilmiştir (Agren ve Hallberg, 1996).

Coeloconic sensillanın, çoğunlukla genel kokuları algılayan nöronlara sahip oldukları düşünülmektedir (Brito vd., 2016) ve kütikular yapıdaki anten yüzeyinden içeriye girinti yapmış şekilde çukur oluşturan yapılardır (Steinbrecht, 1996).

2.2.1.2 Nem ve sıcaklık algılayan

Ampullacea sensilla, kütikular yapıdaki anten yüzeyinden içeriye girinti yapmış halde çukur oluşturan yapılardır. Ampullacea sensilla, ceoloconic sensillaya göre daha derinde ve ufak hacimdedir. Çift kutikular yapıdaki çukuru dolduracak kadar geniş çaplı dendrit yapılarına sahiptirler (Smith, 2009).

2.2.1.3 Hareket sensörü olarak görev alan

Çan şekilli sensillanın, taşıdığı kıl bir kubbe yapısına indirgenmiştir (Gupta, 1992) ve yapısı bir çan görünümü almıştır. Genellikle tek bir bipolar nörona sahiptirler ve titreşimin algılanmasını sağlarlar (Simpson, 2005).

Her bir sensilla içerisinde uzanan koku algılayıcı nöron (OSN veya ORN) dendritlerinin yüzeyinde bulunan koku reseptörleri (OR), koku ko-reseptörü (Orco) olan bir başka protein ile bitişik bir halde iyon kapısı olarak işlev görmektedir. Böylece, diğer canlılardaki koku reseptörlerinden farklı bir çalışma mekanizmasına sahiptir (Leal, 2013). Bunun yanı sıra, antenlerde görevli proteinler ve genler, antenlerin morfolojik karakterlerinden ziyade kullanıldığı ortamdaki işlevleri ve uyum özelliklerine bağlı olarak aktifleşmekte olduğu tespit edilmiştir (Steinbrecht, 1996).

Sensilla tiplerine (basiconica, trichodea, placodea) bağlı olarak taksonomik tür ve kast ayrımının yapılabileceği de ortaya konmuştur (Shang vd., 2010). Böceklerdeki anten tiplerinin (serrat, pektinat, plumoz, stylat, moniliform, klavat, kapitat, flabellat, genikulat, aristat ve setace) farklı olabildiği gibi sensilla tiplerinin de türler ve cinsiyetler arasında farklı olabildiği belirtilmiştir (Gullan ve Cranston, 2010). Farklı sensilla tiplerinde farklı reseptör ailelerinin

bulunduğu göz önüne alındığında, belirli sensilla tiplerini bulunduran antenlerin koku algılanmasında farklı kompozisyonlar sergileyerek türler arası davranış farklılıklarını belirlemede rol üstlendiği belirtilmiştir (Shang vd., 2010). Koku algılamaya bağlı gösterilen davranışlar ile seçici baskıların şekillendirdiği reseptör kompozisyonlarının farklı böcek grupları için aynı olmayacağı belirtilmiştir. Böylelikle, farklı baskılar altında şekillenmiş böcek grupları arasındaki, antenlerde bulunan sensilla tiplerinin sayıları, yerleri, üzerlerinde özelleşmiş protein aileleri ve proteinlerin işleyişleri farklılık göstermektedir. Öyle ki, *Drosophila melanogaster* Meigen 1830, türünde bulunan genel koku reseptörleri (OR) hakkında bilinen mekanizmaların, kelebeklerde bulunan feromon algılayıcı reseptörlerdeki (PR) mekanizma ile aynı şekilde çalışmadığı bilinmektedir (Leal, 2013). Bu nedenle, farklı sensilla tiplerindeki reseptörlerde gerçekleşen mekanizmaların benzerlik ve farklılıkların açıklanması, ayrıca görevli genlerin tespit edilmesi, böylelikle böceklerdeki farklı kompozisyonlarda bulunan koku alma mekanizmalarının aydınlatılması kritik bir önem taşımaktadır. Buna bağlı olarak, sensilla tiplerine özelleşmiş bazı OSN, OR ve Orco genleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1 Üç ana sensilla çeşitlerinde bulunan koku algılayıcı nöron (OSN), reseptör ve ko-reseptör ile ilgili genler (Münch ve Galizia, 2016'dan değiştirilerek alınmıştır).

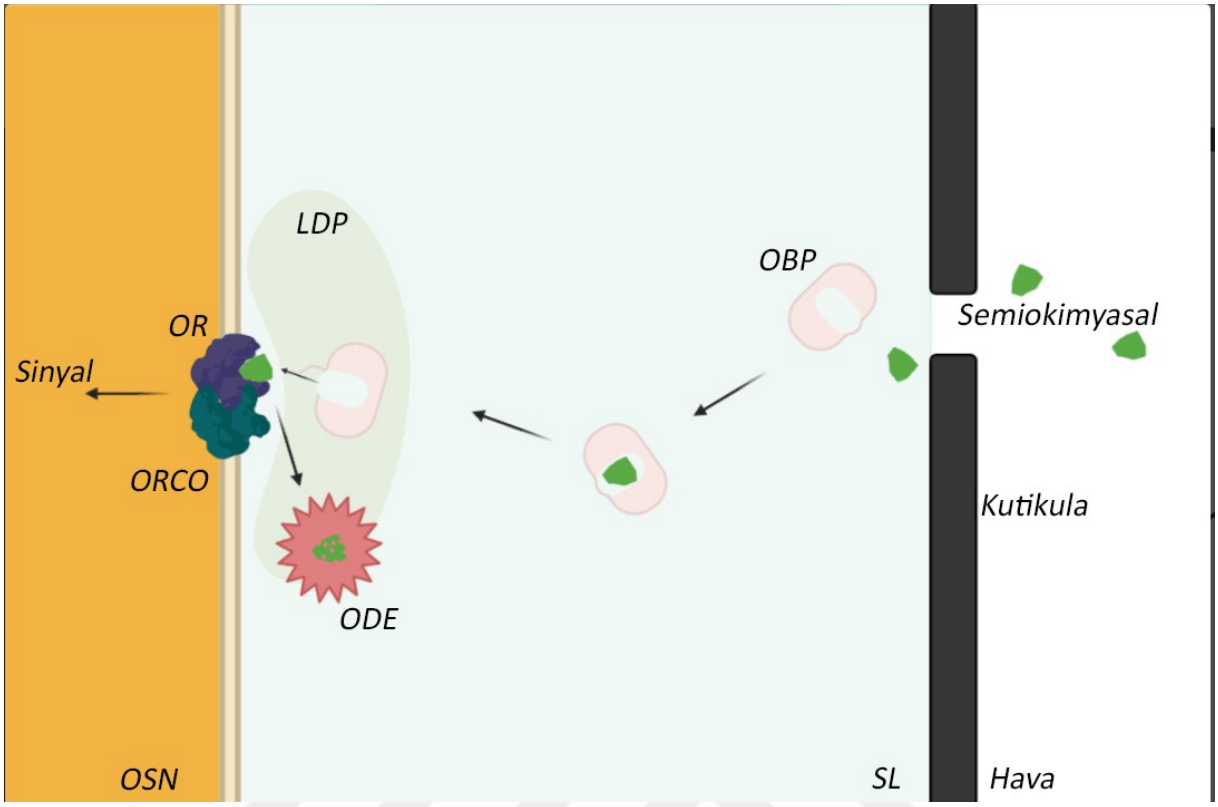
Sensilla	OSN	Reseptör	Koreseptör
TRICHODEA	at1A	Or67d	Orco
	at2A	Or83c	Orco
	at2B	Or23a	Orco
	at3A	Or19a, Or19b	Orco
	at3	Or2a	Orco
	at3	Or43a	Orco
	at4A	Or47b	Orco
	at4B	Or65a, b, c	Orco
	at4C	Or88a	Orco
BASICONICA	ab1A	Or42b	Orco
	ab1B	Or92a	Orco
	ab1C	Gr21a, Gr63a	Orco
	ab1D	Or10a, Gr10a	Orco
	ab2A	Or59b	Orco

	ab2B	Or33b, Or85a	Orco
	ab2B	Or33b	Orco
	ab2B	Or85a	Orco
	ab3A	Or22a, Or22b	Orco
	ab3B	Or85b	Orco
	ab4A	Or7a	Orco
	ab4B	Or33a, Or56a	Orco
	ab4B	Or33a	Orco
	ab4B	Or56a	Orco
	ab5A	Or82a	Orco
	ab5B	Or33b, Or47a	Orco
	ab5B	Or33b	Orco
	ab5B	Or47a	Orco
	ab6A	Or13a	Orco
	ab6B	Or49b	Orco
	ab7A	Or98a	Orco
	ab7B	Or67c	Orco
	ab8A	Or43b	Orco
	ab8B	Or9a	Orco
	ab9	Or67b	Orco
	ab9	Or69aA, Or69aB	Orco
	ab10A	Or67a	Orco
	ab10B	Or49a, Or85f	Orco
	ab10B	Or49a	Orco
	ab10B	Or85f	Orco
COELOCONICA	ac1	Ir31a	Ir8a
	ac1	Ir75d	Ir25a
	ac1	Ir92a	Ir25a, Ir76b
	ac2	Ir75a	Ir8a
	ac2	Ir75d	Ir25a
	ac2	Ir41a	Ir25a, Ir76b
	ac3A	Ir75a, Ir75b, Ir75c	Ir8a
	ac3B	Or35a	Orco, Ir76b

	ac3B	Or35a	Orco, Ir76b
	ac4	Ir84a	Ir8a
	ac4	Ir75d	Ir25a
	ac4	Ir76a	Ir25a, Ir76b

2.2.2 Koku Alma Fizyolojisinin Moleküler Mekanizması

Bir semiyokimyasal molekülünün böcekte sinyal oluşturabilmesi için böceğin reseptörleri tarafından algılanması gerekmektedir. Bunun için koku molekülünün öncelikle anten kutikulasını geçip antenin içindeki hemolenfe ulaşması gerekmektedir (Kaupp, 2010). Sensillum yüzeyinde bulunan porlardan içeriye giren ve sensillum lenfine ulaşan semiyokimyasal bir feromon ise, bu sıvıda bulunan feromon bağlayıcı protein (PBP), eğer bir koku ise koku bağlayıcı protein (OBP) tarafından tutulur (Swarup vd., 2011) ve sensillum lenfi boyunca olfaktör reseptör nöronun (ORN) dendritlerinin yüzeyinde bulunan ve lokalize olarak düşük pH bölgesi oluşmuş alanda koku reseptörlerine (OR) iletilir (Buck ve Axel, 1991; Leal vd., 2005; Venthur ve Zhou, 2018). İlk olarak *D. melanogaster*'de keşfedilmiş olan OR'ler, koku reseptör ko-reseptörü (Orco) adı verilen ve evrimsel olarak korunmuş bir yapıyla kompleks halindedir (Anfora vd., 2011; Brito vd., 2016; Clyne vd., 1999; Steinbrecht, 1996). OR-Orco kompleksi ile koku birleşince, sinirlerde elektrik sinyali oluşur. Böylece ORN'den merkezi sinir sistemine sinyal iletilir (Hansson, 2002; Brito vd., 2016) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Olfaktör sensillum içerisinde gerçekleşen ve gerçekleştiği tahmin edilen koku alma ve sinyal iletim mekanizması (Brito, 2016'dan değiştirilerek alınmıştır). **LDP**: Lokalize düşük pH bölgesi. **OBP**: Koku bağlayıcı protein. **ODE**: Koku yıkıcı enzim. **OR**: Koku (Olfaktör) reseptör. **ORCO**: ko-reseptör. **OSN**: Koku algılayıcı nöron. **SL**: Sensillum lenfi

Sinyal iletiminin ardından, böcek tarafından verilecek tepki sinyalin üretildiği reseptöre göre değişiklik göstermektedir ve buna bağlı olarak anten topolojisi değiştiğinde, böceğin davranışları ve ekolojik rolüde de değişim gözlenmektedir (Fonta ve Mason, 1984; Syed 2015). Bu değişimler ve farklılıklar birçok araştırmacının bu konu üzerinde çalışmalarını yoğunlaştırmasına sebep olmuştur (Hansson ve Stensmyr, 2011; Shen vd., 2015; Andersson vd., 2015; Brand vd., 2018; Elgar vd., 2018; Grabe ve Sachse, 2018).

2.2.3 Mekanizmadaki proteinlerin görevi

Böceklerde 6 farklı gen ailesinin koku molekülleriyle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bunlar kokunun algılanmasıyla alakalı olarak; koku reseptörleri (OR), tat reseptörleri (GR), iyonotropik reseptörler (IR)'dir. Böcek OR'leri, moleküler olarak incelendiklerinde omurgalılarda bulunan G-proteine bağlı OR'lerden farklı olarak GR'lerin soyundan geldiği kabul edilmektedir (Fleischer vd., 2018). OR'ler semiyokimyasalları elektrik sinyaline

çevirmekle görevlidirler (Leal, 2013). Geniş yelpazede koku çeşitlerine yanıt verenler "genel OR"ler olarak, dar koku repertuarına cevap verenler ise "spesifik OR"ler olarak tanımlanmıştır (Carey ve Carlson, 2011). Fizyolojik olarak ise Orco ile heteromerik kompleks halinde bulunur ve seçici olmayan katyon kapısı görevi görür (Sato vd., 2008; Wicher vd., 2008). OR'ler uygun bileşikler ile bağlandıklarında hızlı iyonotropik sinyaller üreterek ilgili nöronların depolarizasyonunu tetiklerler (Nakagawa ve Vosshall, 2009; Leal, 2013). Böylelikle, OSN aracılığıyla sinyal anten lobuna iletilir ve böcek beyni tarafından algılanır. GR'ler de OR'ler ile aynı aileyi paylaşırlar ama tat alma ile alakalı nöronlarda aktiftirler (Abuin vd., 2011). Özellkikle şeker ve karbondioksit içerikli ürünleri algılamada rol oynarlar (Yang vd., 2017). IR'ler ise asetat ve amin benzeri içeriklere sahip moleküllerle aktifleşen iyonotropik glutamat reseptör protein ailesinin bir üyesidir ve sadece kimyasal algılamada görev yaparlar (Benton vd., 2009).

Kokunun taşınmasıyla alakalı proteinler ise; koku bağlayıcı proteinler (OBP), kemosensör proteinler (CSP) ve duyusal nöron membran proteinleridir (SNMP) (Suh vd., 2014).

OBP proteinlerini kodlayan genler, periferik olfaktör dokularda en çok ifade edilen genler arasında yer alır (Brito vd., 2016). OBP'lerin ve CSP'lerin koku alma prosedüründe görev alan ilk protein olduğu düşünülmektedir (Suh vd., 2014; Venthur vd., 2014). OBP, neredeyse 40 yıl önce Vogt ve Riddiford (1981) tarafından keşfedilmiş ve artık günümüzde kendi içerisinde 3 gruba ayrılmışlardır; genel koku bağlayıcı proteinler (GOBP), feromon bağlayıcı proteinler (PBP) ve anten spesifik proteinler (ASP) (Venthur vd., 2014).

Koku taşıyıcı proteinlerin genetik ifadeleri ve bunların düzeyleri kullanılarak koku ile reseptör arasında ilişki kurulabilir. Ancak OBP'nin koku ile OR arasında bağ kurmasını sağlarken nasıl bir kompozisyon içerisinde olduğu konusunda farklı iki görüş bulunmaktadır. Bu görüşlerden birisi, kokunun kendiliğinden OR'yi aktifleştirebildiğini belirtir. Diğer görüş, koku ile OBP kompleksinin beraberliğinde OR'nin aktifleştiğini söyler (Leal, 2013).

Koku ve feromon reseptörlerin bulunduğu dendritlerin yüzeyleri negatif yüklüdür (Keil, 1984) ve buna ek olarak OR/Orco kompleksi tutunduğu koku molekülüne bağlı olarak elektriksel yük değişimlerine sebep olmaktadır. Böylelikle moleküler yığılmalara ve lokal pH farklılıklarına yol açmaktadır. İpek böceklerindeki BmorPBP1 bağlayıcı proteini bir feromon olan bombykol molekülünü sensillar lenfte yüksek pH'ta iken yüksek afinite ile bağladığı, ancak düşük pH'de

feromon için afinite göstermediği tespit edilmiştir. Ayrıca yüksek veya nötr pH'tan (B-formu, açık form) proteinin düşük pH'ına dönüşümünün (kapalı form) fizyolojik olarak önemli olduğu gösterilmiştir (Wojtasek ve Leal, 1999). Böylece bağlayıcı proteinlerin, pH farklarına göre 2 farklı konformasyonda bulunabildiği tespit edilmiştir. Bir başka deyişle, düşük pH ortamında bağlayıcı proteinler yapısal farklılıklardan dolayı koku molekülleri ile bağ kuramamaktadır. Yani, sensillum lenf içerisine giren koku, koku bağlayıcı proteinler tarafından tutulup negatif yüklü dendrit yüzeyine doğru gider ve dendrit yüzeyi çevresinde oluşan lokalize düşük pH ile yapısal bir değişiklik yaşayarak tuttuğu koku molekülünü serbest bırakır. Böylece koku, OR tarafından yakalanır ve şu ana kadar yürütülmüş olan biyokimyasal, biyofiziksel ve yapısal çalışmalar sonucunda en azından güvelerin feromon reseptörleri (PR) için kokuların tek başına OR'yi aktifleştirebildiği teorisi desteklenmektedir (Leal vd., 2005; Wojtasek ve Leal, 1999). Ancak, dünya üzerindeki böcek çeşitliliği göz önünde bulundurulduğunda, bir böcek grubu için belirlenen feromon mekanizmasının diğer böcek gruplarındaki koku mekanizması için bire bir geçerli olması mümkün görünmemektedir. Öyle ki, koku seçiciliğinde, OBP-koku kompleksi oluşmadan, reseptör uyarımının gerçekleşmediği ve OR'nin aktifleşmediği konusu da aşikardır (Xu vd., 2005). *D. melanogaster* için "Lush" isminde bir OBP "genetik olarak söndürülerek" (knockdown) ifade edilememesi sağlanmış ve normalde nöron tarafından algılanan yağ asitli bir bileşik olan Z11-18OAc sinek tarafından algılanamamıştır (Xu vd., 2005). Bu durum, OBP-koku kompleksinin koku algılama için oluşması gerektiğini göstermektedir.

Buna ek olarak, böceğin her bir koku farklılığını algılaması, koku değişimlerini anlık olarak yorumlayabilmesi ve avına yönelmesi, avcısından kaçması gibi yönelimleri yapabilmesi için kokuların bağlandıktan sonra reseptörleri terk etmeleri gerekmektedir. Bu reseptörlerin nasıl terk edildiğini anlamak ve buna bağlı olarak reseptörlere özgü kokuların parçalanma metodlarını keşfetmek ise zararlı böcekler ile mücadele için büyük bir önem taşımaktadır. Bu olayın gerçekleşmesine ait farklı hipotezler üretilmiştir. Bunlardan birisi ve en çok kabul göreni; koku parçalayıcı enzimlerin (ODE) hem feromon hem de kokuları, OR çevresinde hızlı bir biçimde yok ederek sinyal inaktivasyonunu gerçekleştirmesidir (Durand vd., 2011). Bir diğeri ise kokuların inaktivasyonunda ODE'lerin yerine çöpçü moleküller (Kaissling, 2001) ya da moleküler tuzakların (Ishida vd. 2004) kullanılmasıdır (Leal, 2013). Bir molekülün (enzimin) ODE olarak tanımlanması için tek bir kriter bulunmaktadır: Sensillum lenfi içerisinde yer alması ve koku molekülünü yıkması (Vogt, 2005). Koku molekülünü yıkan bu enzimlerin feromon yıktıkları da keşfedilmiş ve feromon yıkıcı enzim (PDE) olarak da adlandırılmışlardır

(Ishida ve Leal, 2005). Buna bağlı olarak, güvelerde yapılmış deneysel gözlemler, feromonların PBP'lerin içindeki bağlanma boşluğunda kapsüllenmiş şekilde sensillum lenfi içinde taşındığını böylece feromonu parçalayan enzimlerden (ODE) korunduğu düşünülmektedir. Bu enzimlerin semiyokimyasalları yok ettiği bilinmektedir ancak ne kadar hızlı olduğu konusunda hala şüpheler bulunmaktadır. Bu sebeple, enzimlerin yeterli hızda yıkıcı olamadığı durumlarda semiyokimyasalların OBP benzeri proteinlerce tutulduğu veya hapsedildiği düşünülmektedir (Leal, 2013).

2.2.4 Böceklerde Koku Reseptörü Genleri ve Evrimi

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda kullanılan böceklere ait koku reseptörü gen sayıları Tablo-2'de verilmiştir. Tanımlanan OR'lerin yaklaşık %20'lik aminoasit homolojisi ile birbirlerinden ayrıldıkları gözlemlenmiş ve bu durum böcek OR genlerinin oldukça atasal olduğunu göstermiştir (Sato ve Touhara, 2008).

Tablo 2.2 Böceklerdeki OR gen sayıları (Brand ve Ramirez, 2017'den genişletilerek uyarlanmıştır.)

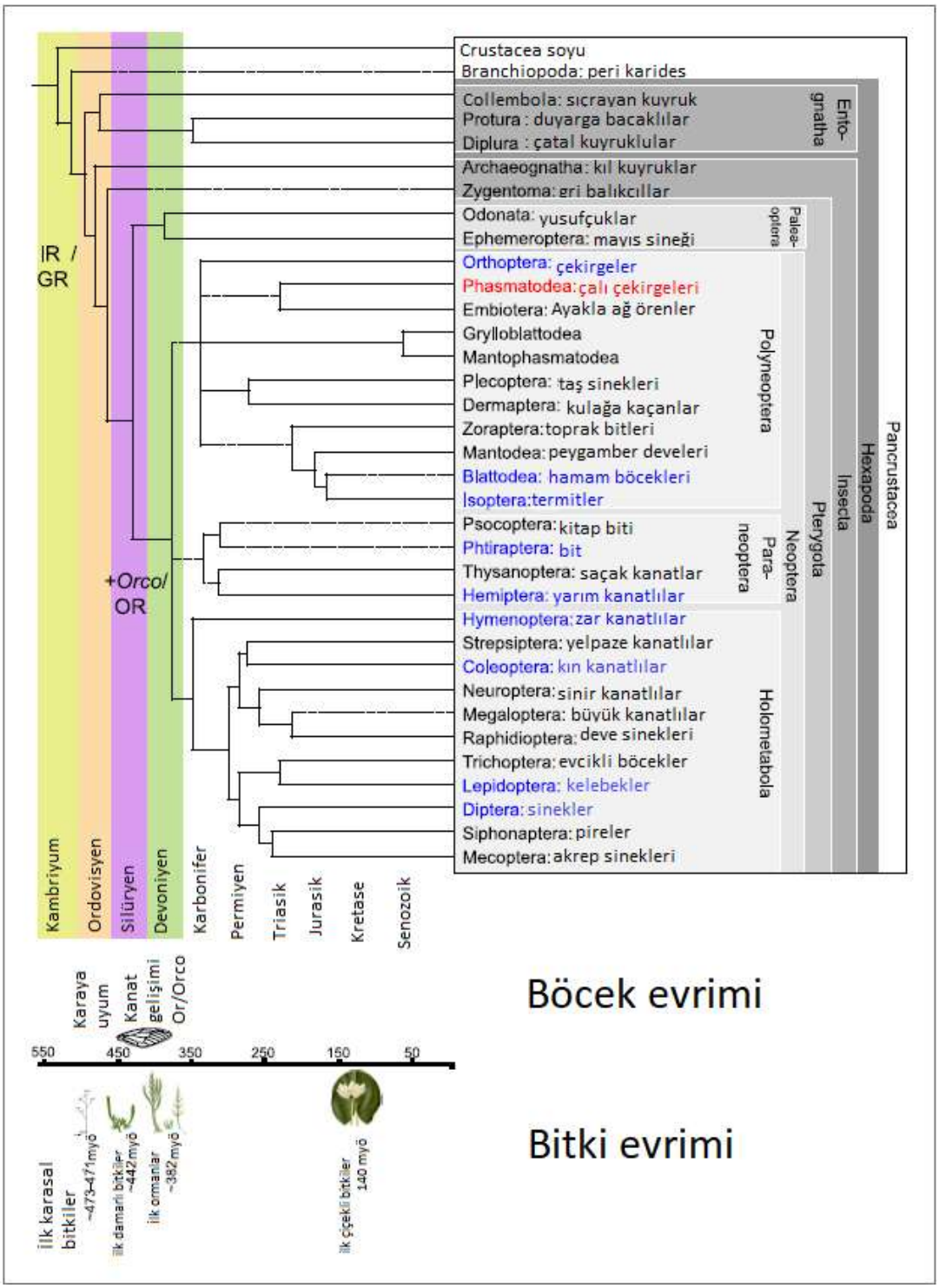
Tür Adları	OR gen sayıları	Referans
Meyve sineği (*Drosophila melanogaster*)	**62**	Clyne vd., 1999; Gao ve Chess 1999; Vosshall vd., 1999
Sıtma sivrisineği (*Anopheles gambiae*)	**79**	Hill vd., 2002
Sarı humma sivrisineği (*Aedes aegypti*)	**131**	Bohbot vd., 2007
İpek böceği (*Bombyx mori*)	**48**	Nakagawa vd., 2005
Un b**iti** (*Tribolium castaneum*)	**265**	Engsontia vd., 2008
Lahana yaprakgüvesi (*Plutella xylostella*)	**54**	Yang vd., 2017
Bal arısı (*Apis mellifera*)	**177**	Robertson ve Wanner, 2006; Croset vd., 2010
Orkide arısı (*Euglossa viridisima*)	**85**	Brand vd., 2015
Orkide arısı (*Eufriesea mexicana*)	**142**	Brand ve Ramirez, 2017

İğnesiz arı (*Melipona quadrifasciata*)	**196**	Brand ve Ramirez, 2017
Orkide arısı (*Euglossa dilemma*)	**183**	Brand ve Ramirez, 2017
Orkide arısı (*Euglossa flammea*)	**115**	Brand ve Ramirez, 2017
Orkide arısı (*Euglossa imperialis*)	**108**	Brand ve Ramirez, 2017
Orkide arısı (*Eulaema bombiformis*)	**115**	Brand ve Ramirez, 2017
Orkide arısı (*Eulaema meriana*)	**110**	Brand ve Ramirez, 2017
Bombus arısı (*Bombus terrestris*)	**166**	Sadd vd., 2015

Böcek antenlerinde OR ve Orco proteinlerinin birlikte çalışma mekanizmasının nasıl geliştiğini ve böcek gruplarında ortak olarak muhafaza edilmiş genlerin varlığını anlamak için bazı çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalara göre, bitkilerin çiçekli veya çiçeksiz olma durumu göz önüne alınarak böceklerin koku reseptörlerinin değiştiği ve ilk karasal bitkilerin ortaya çıktığı Kambiyen döneminden, ilk ormanların oluşumuna ve kanatlı böceklerin evrilmesine kadar geçen Silüryen döneminde (Şekil 2.6) OR ve Orco proteinlerinin beraber çalışmaya başladığını göstermiştir (Penalva-Arana vd., 2009; Croset vd., 2010; Rota-Stabelli vd., 2013; Missbach vd., 2014). Missbach vd. (2014), çalışmasına göre böceklerde kanat görülmeye başladığında, koku algılamanın OR ve Orco proteinlerinin beraber çalışmasına bağlı olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 2.6). Bunun yanı sıra, OR genleri böcekler arasında çeşitlilik gösterirken (Krieger, 2003), Orco (Or83b) geni genel olarak korunmuştur (Vosshal ve Hansson, 2011). Böceklere evrimsel olarak en yakın alt filum olan Crustacea içerisinde *Daphnia pulex* üzerine yapılan bir genom çalışmasında OR ve Orco genlerine rastlanmayıp yalnızca böceklerle ortak olarak GR genlerine rastlanmıştır (Penalva-Arana vd., 2009). Ardından yapılan bir başka çalışma ile CSP ve GR genlerinin tüm büyük arthropod gruplarında bulunduğu tespit edilmiş ancak OBP ve OR genlerinin böceklere özgü oldukları, OBP'lerin ise karasal yaşama uyum sağlamış böceklerde ve OR'lerden bağımsız olarak evrimleştiği belirlenmiştir (Missbach vd., 2015). Bu durum OBP, OR ve Orco genlerinin böceklere özgü olduklarını göstermektedir. Buna

ek olarak IR genleri, *Daphnia* cinsi (Croset vd., 2010), amerikan ıstakozu (*Homarus americanus*) (Hollins vd., 2003) ve dikenli ıstakoz (*Panulirus argus*) (Tadesse vd., 2011) türlerinde ve Protostomia (*Capitella capitata*, *Aplysia californica*) grubu üyelerde belirlenmiştir (Croset vd., 2010). Buna bağlı olarak Crustacea alt filumunun, böceklerle yakın akraba olduğu göz önüne alındığında, fonksiyonel olarak IR genlerinin OR genlerinin atasal formları oldukları tahmin edilmiştir (Missbach vd., 2014). Ancak evrimsel olarak bu gen ailelerinin hangi kökenden oluştuğu araştırmaya muhtaç bir konudur ve OBP barındıran arthropod grupları ile bulundurmayan gruplar arasında yapılacak genomik çalışmaların karşılaştırılmasına ihtiyaç vardır (Missbach vd., 2015).

Tablo 2.2'deki bilgiler incelendiğinde, *Bombus* OR repertuarının (Sadd vd., 2015), *A. mellifera*'ya göre biraz daha az sayıda olduğu söylenebilir. *A. mellifera* kemoreseptör repertuarının (Robertson ve Manner, 2006) karşılaştırılması ile bombus arılarının repertuarının daha çok tat alma (GR) üzerine olduğu görülmektedir. Tabloya göre, OR'lere ait gen bölgelerinin Hymenoptera'da özellikle gerçek sosyal yaşama sahip türlerde (özellikle bal arısı) uzadığı düşünülmektedir. Fakat soliter yaşam gösteren arıların da genomlarında yapılan çalışmalarla soliter, primitif eusosyal ve gelişmiş eusosyal Hymenoptera türlerinin OR repertuarlarının çok çeşitlilik gösterdiği belirlenirken; OR sayıları ile sosyal yaşam tarzı arasında hiçbir korelasyon olmadığı tespit edilmiştir (Karpe vd., 2017). Öte yandan Brand ve Ramírez (2017), OR gen repertuar boyutunun polen toplayan arı soyları arasında önemli ölçüde farklı olduğunu göstermektedir. Ayrıca arı soylarında, karıncaya veya yaban arılarına göre genişleyen OR'lerin çiçek kokusuyla da ilişkili olabileceği ve bu konuda net fikir sahibi olabilmemiz için daha ileri deneysel çalışmalara ihtiyaç olduğu öne sürülmektedir (Karpe vd., 2017). Yapılan bu çalışmalarda, sosyal yaşamdan ziyade beslenme davranışlarındaki farklılıklarına göre bu repertuvarın değişimi dikkat çekmektedir. Buna göre bitkisel beslenen arıların, parazitik, kleptoparazitik ve karnivor arılardan daha az OR repertuvarına sahip olduğu, dolayısıyla polen toplayan arılarda OR repertuvarının evrimsel olarak azaldığı belirlenmiştir (Obiero vd., 2021). Böylelikle, böceklerin sosyallik derecesi ile OR gen repertuvarı arasındaki korelasyonun doğrudan bir ilişkisinin olmadığı, bu durumun beslenme davranışları üzerinden incelenmesi gerektiği netlik kazanmıştır. Tablo 2.2'den anlaşılacağı gibi bombus arısında 166 koku alma reseptörü (OR) bulunmaktadır. Buna rağmen farklı kastlara ait ya da farklı çiçeklere özelleşmiş arılar arasında bu tarz reseptörlerin genom bazında ifade düzeyleri henüz netlik kazanmamıştır (Sanchez, 2011).



Şekil 2.6 Farklı böcek gruplarında tespit edilen reseptör ailelerine ait evrimsel sürecin bitkilerin evrimiyle karşılaştırılarak farklı jeolojik dönemlerde ortaya çıkan genlerin birbirleriyle olan ilişkisi (Missbach vd. 2014'ten Türkçeleştirilerek alınmıştır).

2.3 KOKU RESEPTÖRLERİNİN VE İLGİLİ GENLERİN İNCELENMESİNDE GÜNCEL YÖNTEMLER

Bir çok gen ailesinin ve binlerce transkriptomun dahil olduğu bu koku işleme sürecini incelemek ve anlamak, büyük bir verinin değerlendirilmesi anlamına gelmektedir. Bu yüzden genomik bir bakış açısı ile ele alınmasında büyük fayda vardır (Grosse-Wilde, 2011). Reseptörleri ve bir arada çalıştıkları mekanizmaları, proteinleri ve genleri incelerken genomik veya transkriptomik bir bakış açısı elde etmek için reseptörleri moleküler olarak incelemeye yarayan bir takım yollar vardır. Bunlar, elde edilen biyolojik örnekten RNA elde etmek ve elde edilen RNA'ları moleküler ve biyoinformatik metotlarla inceleyerek genom ve transkriptom karşılaştırmaları yapılması şeklindedir (Velculescu vd., 1997). Bu noktada transkriptom çalışmalarının geçmişinin 1990'lı yıllarda cDNA kütüphanelerinin kurulmasıyla başlandığını ve hızla ilerleyen teknolojik gelişmeler neticesinde günümüzde genel olarak 2 farklı teknik ile incelendiğini belirtmekte fayda vardır. Bunlardan birisi hibridizasyon temelli ve önceden belirlenmiş dizinlerin sayısını elde etmeye yarayan DNA microarray, diğeri ise RNA-seq ismindeki tüm transkriptleri elde etmeye yarayan dizileme tabanlı yaklaşımdır (Wang vd., 2009; Taub vd., 2009). Bir organizmanın farklı dokularda, zamanlarda veya durumlarda genlerindeki ifadesini ölçmek o canlıya ait genlerin düzenlenmesi ile ilgili bilgiler verir. Transkriptom analizleri, insanlardaki organların farklı durumlarda nasıl çalıştıklarıyla alakalı bilgiler vererek çoğunlukla, hastalık (kanser gibi) durumlarında hücrelerin tepkileri ve buna karşı yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlamanın yanı sıra farklı canlılarda veya farklı koşullardaki aynı organizmalardaki değişimleri de göz önüne sererek canlıların doğaya nasıl adapte olduklarını anlamamızda önemli bir yer teşkil eder (Dunning vd., 2013; Cao ve Jiang, 2015). Bu açıdan koku algılamanın moleküler temellerini ortaya çıkarmak için günümüzde RNA dizileme, qPCR ve uygun biyoinformatik analizler kullanılmaktadır.

2.3.1 RNA Dizileme

RNA dizileme (RNA-seq), izole edilmiş RNA'daki mevcut transkriptleri teşhis etmek için kullanılan yüksek verimli dizileme teknolojisi ile bilgisayar temelli hesaplama yöntemlerinin kombinasyonunu ifade eder (Wang vd., 2009). Oluşturduğu nükleotid diziler 30 baz çifti (bç) ile 10000 bç arasında değişebilir ancak genel olarak 100 bç uzunluğunda nükleotidler oluşturulur. RNA-dizileme tekniği, RNA transkriptini çok kısa parçalara bölerek bilgisayar ortamında referans bir genoma ya da kendi aralarında hizalayarak diziyi oluşturabilir

(McGettigan, 2013). Böylece düşük ve yüksek bolluktaki RNA'ların tespit edilmesini model olmayan organizmalarda dahi mümkün kılar. RNA-dizileme, DNA microarray'de olmayan bu özellik sayesinde günümüzde en çok tercih edilen dizileme metotlarındandır (Cheng vd., 2018). Çalışmalarda RNA-dizileme kullanma tercihlerinden birisi de genomdaki genlerin teşhisini yapmasının yanı sıra, belirli bir zamandaki aktif gen sayısını da elde edebiliyor oluşudur. Buna ek olarak, dizileme sonucunda farklı boyutlardaki baz çiftleri jel elektroforez ile kısalık ve uzunluklarına göre ayrılabilir (Kryndushkin vd., 2003). Zor olarak nitelendirilebilecek bir özelliği ise, bilgisayar ortamında ufak hale getirilmiş dizinlerin birleştirilmesi ve anlamlı sonuçların alınabilmesidir (Martin ve Wang, 2011). Bunu kolaylaştırmak için gelişen teknoloji ve biyonformatik analizlerin ilerlemesi ile yıllar içerisinde transkriptom analizlerinde kullanılabilecek bir seri program ve araçlar oluşturulmuştur (Cheng vd., 2018; Gongora-Castillo ve Buell, 2013).

Ökaryotik canlıların genomunun büyük bir kısmı, protein kodlamayan dizilerden oluşmuştur. Protein kodlayan kısım ise, genomun %3'ünü oluşturmaktadır (Romaine vd., 2015). Bu gen dizileri, protein kodlamamasına karşın, dışarıdan gelen etkilere cevap olarak ve gen düzenlenmesinde görev alacak kodlayıcı olmayan RNA'ları (ncRNA) üretir (Pandey ve Kanduri, 2011) . Baz çifti uzunluklarına göre uzun ve kısa ncRNA'lar bulunmaktadır.

Kısa ncRNA terimi, 100 nükleotitten kısa olan regülatör RNA'lar için kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, görevlerine, boyutlarına ve ilişkide oldukları proteinlere göre alt kategorilere ayrılmaktadırlar; siRNA, miRNA, piRNA gibi. Alt kategorilerden biri olan mikroRNA (miRNA) terimi, 1993 yılında Wightman vd. ve Lee vd. tarafından çevresel etkilerden çok fazla etkilenme potansiyellerine sahip olmalarından, farklı yapısından ve hücresel değişimleri hızlı bir şekilde düzenlemelerinden dolayı diğer RNA'lardan ayrılmıştır (Nellen ve Hammann, 2005). Yaklaşık 22 nükleotit uzunluğu civarındadırlar ve kendi alt kategorisi içerisinde, yerine getirdikleri işlevlere ve bulundukları yerlere göre farklı isimler alırlar (Romaine vd., 2015). Ancak genel olarak kısa ncRNA'ların görevleri, RNA ile uyarılan transkripsiyonel susturma ve RNA'ya bağlı RNA polimeraz kompleksleri (RITS-RDRC'ler) olarak bilinen baskıcı kromatin komplekslerini aynı kökenli genlere yönlendirerek gen ifadesini transkripsiyon seviyesinde düzenlemek ve RNA tarafından uyarılan susturucu kompleksler (RISC) olarak bilinen efektör kompleksleri post transkripsiyonel seviyede yönlendirerek, hedef mRNA'yı parçalatmak veya

translasyonel inhibisyon sağlamaktır (Bartel 2004, 2009; Grewal ve Jia, 2007; Malone ve Hannon, 2009; Ghildiyal ve Zamore, 2009).

Uzun kodlayıcı olmayan RNA (lncRNA) terimi ise 200 nükleotitten uzun gen düzenlenmesinde görevli RNA'lar için kullanılmaktadır ve son zamanlarda genlere özgü çalışmalar ışığında lncRNA'ların fonksiyonları sınırlı sayıda belirlenebilmiştir (Sun ve Kraus, 2015). LncRNA'ların belirlendiği böcek türleri *Drosophila melanogaster* (Brown vd., 2014), *Anopheles gambiae* (Jenkins vd., 2015), *Apis mellifera* (Jayakodi vd, 2015; Kiya vd., 2012) ve *Bombyx mori* (Wu vd., 2016) ile sınırlıdır.

Protein kodlamayan RNA'lar arasında lncRNA'lar, biyolojik fonksiyonları açısından en az karakterize edilmiş olanlardır. lncRNA'ların çoğu RNA polimeraz II tarafından transkribe edilir ve 5' metil ucu ile polyA kuyruğuna sahiplerdir. Konum olarak (mRNA genine göre) dört farklı şekilde sınıflandırılabilirler.

i. Sens, mRNA ile aynı iplik üzerinden transkribe edilebilir.
ii. Antisens, mRNA ile karşılıklı olan iplik üzerinden transkribe edilebilir.
iii. İntronik, lncRNA'nın transkripsiyon bölgesi bir başka genin intron bölgesinde bulunabilir.
iv. İntergenik, mRNA genlerinin dışında kalan bir bölgeden transkribe edilebilir.

Ökaryotik genomda birkaç bin lncRNA'nın bulunduğu tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, günümüzdeki en zorlayıcı konulardan birisi, yaygın olarak transkribe olan ncRNA'lar içerisinden fonksiyonel lncRNA'ların teşhis edilebilmesidir (Satyavathi vd, 2017).

Fonksiyonu açıklanmış olan lncRNA'ların sayısı az olsa da düzenleyici görevdeki bu RNA çeşitlerinin önemi göz ardı edilmemektedir ve gün geçtikçe fonksiyonları ve yapısal özellikleri aydınlatılmaya çalışılmaktadır (Söderbom, 2005).

2.3.2 qPCR'ın transkriptom çalışmalarındaki yeri

Tüm organizmalardaki hücreler, gen ifadelerini tek zincirli RNA'lar ile düzenler. Hücredeki bir genin ifade düzeyi, içerisindeki RNA transkriptinin kopya sayısı ile ölçülebilir. Ancak, hücredeki RNA transkriptinin miktarını ölçmek mümkün olmadığından ölçüm yapabilmek için sayılarının artırılması gerekmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), hücredeki DNA'nın

artırılmasına yönelik kullanılan bir metoddur. Hücre içerisindeki RNA'ların artırılması içinse öncelikle RNA'ların ters transkriptaz (RT) enzimi ile komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilmeleri gerekir. RNA'ların artırılması için, içerisinde primerler, deoksiribonükleotidler, DNA polimeraz içeren solüsyonlu bir cDNA şablonu kullanılır. Florofor içeren bir madde de bu karışıma eklenir. Böylece "termal cycler" tarafından her bir döngüde uyarılarak ışıma yapan floroforların sayısı elde edilebilir. Elde edilen bilgiler bilgisayar ortamında hesaplanarak elde edilen mRNA'ların miktarları ölçülebilir. Bunun yanı sıra önceden belirlenmiş bir DNA dizininin varlığı veya yokluğu da aynı şekilde hesaplanır (Watson vd., 2004). qPCR, gen ifadesi çalışmalarında kullanılan modern tekniklerden biridir ve her bir PCR döngüsü sonunda uzun ve kısa kodlama yapan ve yapmayan RNA'ların ifade profilini belirlemesi, araştırmacılar tarafından sıkça kullanılmasını sağlamıştır (Cellerino ve Sanguanini, 2018).

2.3.3 Biyoinformatik analizlerde kullanılan programlar ve araçlar

Karşılaştırmalı transkriptomik analizler için kullanılan ve gerekli hesaplamaları kolaylaştırıp görselleştiren programlar, biyologlar için vazgeçilmez olmuştur (Cheng vd., 2018). Referans genoma sahip olan ve olmayan türler (*de novo*) için RNA dizileme sonucunda elde edilen diziler farklı araçlar ve metodlar kullanılarak işlenir. Model organizma olmayıp ve yüksek kaliteli bir genomu bulunmayan canlılar için öncelikle referans niteliğinde bir *de novo* transkriptom dizini kurulmalıdır. Bunun için son yıllarda, Trinity, SOAPdenovo-trans ve ABYSS gibi araçlar geliştirilmiştir (Grabherr vd., 2011; Xie vd., 2014; Simpson vd., 2009). Bu programlarla referans transkriptom oluşturulduktan sonra, elde edilen kısa okumalar bu referans transkriptom üzerinde eşleştirilir. Her transkripte ait okumalar normalize edilir ve birbirleri arasında karşılaştırılır (Gongora-Castillo ve Buell, 2013). Transkriptlerdeki bollukların ölçümü RSEM ile yapılabilir (Li ve Dewey, 2011). Bollukları ölçülmüş transkriptlerin ifade sonuçları görselleştirilir. Bahsedilen basamaklar model organizma olmayan canlıların transkript değerlerini elde etmek için yeterlidir.

Model organizma olan veya tamamlanmış bir genoma sahip olan türler için yapılması gereken ise temel olarak, veri bankasından elde edilen genomun kalitesinin ölçülmesi için FastQC (Andrew, 2012) veya multiQC (Ewels vd., 2016) gibi programlar ile taranarak kalitesiz okumalar belirlenir. Bu kalitesiz okumalar fastp (Chen vd., 2018) veya Trimmomatic (Bolger vd., 2014) programlarıyla elenir. Ardından, deney sonucu elde edilen okuma dizinleri ile genom üzerinde ilişkili bölgeler Bowtie (Langmead, 2008) veya Bowtie2 (Langmead ve Salzberg,

2012) gibi programlar ile hizalandırılır. Son olarak ise farklı ifade olan genler veya gelişim basamakları belirlenerek, referans genom ile aralarındaki değişimler anlaşılabilir (Geib vd., 2014).

Geçtiğimiz yıllarda, farklı dokular ve özel durumlarda yetiştirilen canlılarda farklı ifade olan genlerin belirlenmesi için çok sayıda çalışma yapılmıştır (Fu vd., 2016; Tetreau vd., 2015). Bu genlerin doğru belirlenmesi için araştırmacılar sürekli yeni cihazlar, yöntemler ve yaklaşımlar geliştirmeye çalışmaktadır.

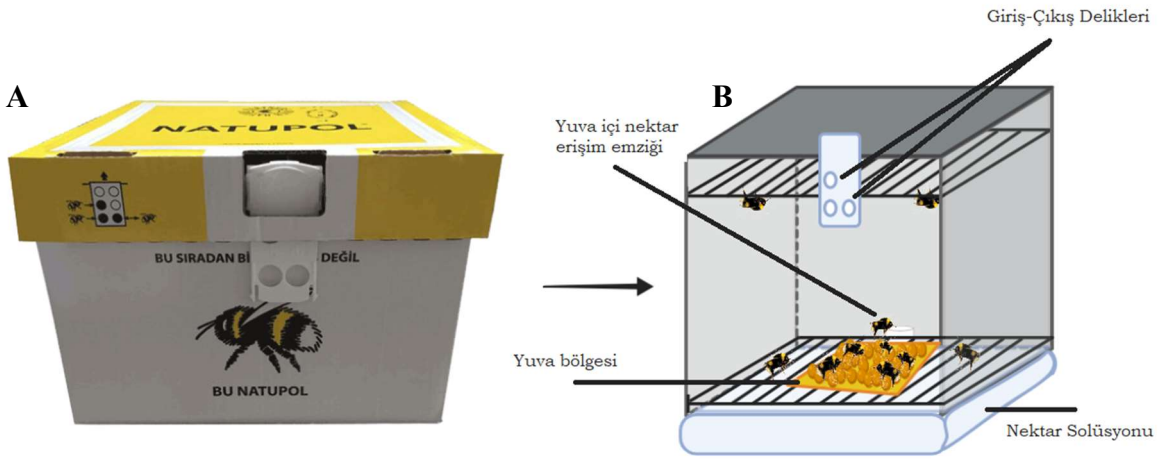
3. MALZEME VE YÖNTEM

Tez çalışması kapsamında çiçek kokusuna yönelmiş ve hiç kokuya maruz kalmamış bombus arılarının antenlerindeki koku alma ve algılama ile ilgili moleküler mekanizmalardaki oluşması muhtemel farklıların ortaya konması için bir deney düzeneği oluşturulmuştur. Bunun için Türkiye'de üretim yapan Koppert Biyolojik Mücadele ve Polinasyon Sistemleri Ltd. Şti. firmasının ürettiği Natupol markalı *Bombus terrestis* türüne ait kolonilerinden temin edilen bombus arısı bireylerinin antenleri disekte edilerek bu antenlere özgü RNA transkriptleri analiz edilmeye çalışılmıştır.

Bu çerçevede yürütülen çalışmada, koloni yetiştirme, kokuya yönlendirme deney düzeneği oluşturma, RNA izolasyonu, RNA dizi analizi ve qPCR analizi gibi aşamalar bulunmaktadır.

3.1 TİCARİ KOLONİ YETİŞTİRME ŞARTLARI

Temin edilen ticari *Bombus* kolonisi karton bir kutu içerisinde yer almaktadır. Bu kutu içine, bir paket polen, koloni, kraliçe ve alt kısmında koloninin şeker ihtiyacını karşılaması için yerleştirilmiş bir sıvı şeker solüsyonu bulunmaktadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Ticari bombus yuvası katmanları **A.** Bombus yuvasının dış kutusu **B.** Yuvanın tasarım şeması

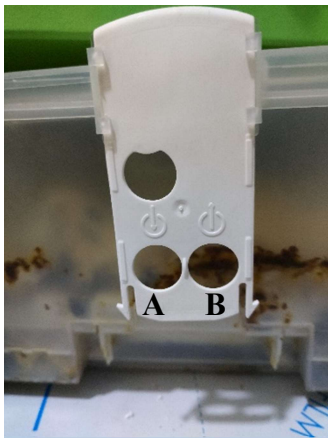
Genellikle domates seralarında kullanılmak için tasarlanan bu kutunun içinde bulunan paket içerisindeki polenler koloninin ilk larvalarını yetiştirmesi için yeterlidir ve ardından işçi sayısı

artan koloni serbestçe gezebildiği sera içerisindeki bitkilerden polen toplayarak protein ve yağ ihtiyaçlarını karşılayabilmektedir. Firma tarafından kullanılması önerilen karton kutu içerisindeki şekerli solüsyon, koloninin tarlacılık faaliyetlerini gerçekleştirmesi için enerji ihtiyacını karşılamaktadır (Martin vd., 2019). Ancak koloni yeterince gelişip serada dolaşmaya bırakıldığında bu şekerli solüsyon kapatılabilir ve arılar sadece dışarıdan beslenmeye yönlendirilebilir.

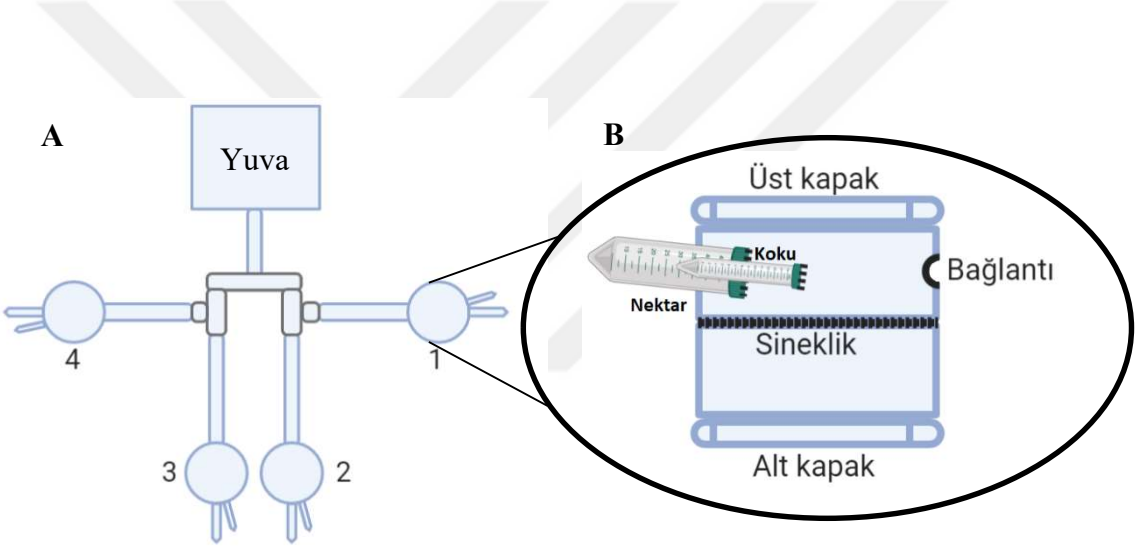
Bu çalışma dahilinde yuvadaki arıların serbest uçuşuna izin vermeyecek bir düzenek kurulmuştur. Koloni, deneylerde HiMedia Laboratories şirketinden temin edilen ve saf koku olarak kullanılan öjenol (*4-Allylguaiacol; 4-Allyl-2-methoxyphenol*) ile temas etmeden önce standart şartlarda 10 gün boyunca kendi şekerli suyu ve polenleri ile yetiştirilmiştir. 26 Haziran 2020 tarihinde alınan koloni, 10 gün boyunca kutuya bağlı nektar solüsyonu ve temin edilen polenler dışında hiç bir etkiye maruz bırakılmadan gözlenmiş ve deneylerimizde kontrol grubu olarak kullanılmak üzere seçilen arıların anten izolasyonları 7 Temmuz tarihinde gerçekleştirilmiştir. Deney grubu ise 8 Temmuz tarihinde koku ile muamele edilmeye başlanmış ve 20, 21 ve 22 Temmuz tarihlerinde izolasyon aşamasına alınmıştır. İzolasyon aşamasına alınan işçi arıların tarlacı olarak seçilim kriterleri, yuva dışarısına çıkmaları ve dış kaynaklı nektar ve polen toplama davranışlarına bağlı olarak belirlenmiştir. Bu aşamada rastgele dolaşmaları değil, PER (proboscis extension reflex) olarak belirtilen nektar toplamak için dilini uzatma davranışı nektar kaynağına yönelimin gösterge davranışı olarak belirlenmiş ve denek bireyler buna göre seçilmiştir.

3.2 DENEY DÜZENEĞİ

Koppert firması tarafından temin edilen bombus arısı yuvası bir giriş ve bir çıkış deliğine sahiptir (Şekil 3.2). Kokuya yönelim deneyi için, giriş ve çıkış deliklerini kapsayacak şekilde ve arıların içerisinde rahatça hareket edebildikleri 6 cm çapında bir su borusu yuvaya eklenmiştir. Plastik konteynerleri birbirine bağlayan 4 cm çapındaki plastik borularla deney düzeneğinin girişine yerleştirilen 6 cm çaplık borunun birleştirilmesi sağlanmış ve dışarıdan gelecek kokuları engellemek adına kapalı bir devre oluşturulmuştur (Şekil 3.3 A ve B, Şekil 3.4). Bu sayede arıların dış dünya ile bağlantısı sınırlandırılmıştır. Deneyler sırasında, öncelikle arıların bu kapalı devre içerisinde günlük hareketleri 24 saat boyunca kaydedilmiş, ardından konteynerlerden birine nektar ve koku konduğundaki davranış değişimi gözlenmiştir.



Şekil 3.2 Bombus kolonisinin yuva giriş ve çıkış delikleri. **A.** Giriş deliği **B.** Çıkış deliği

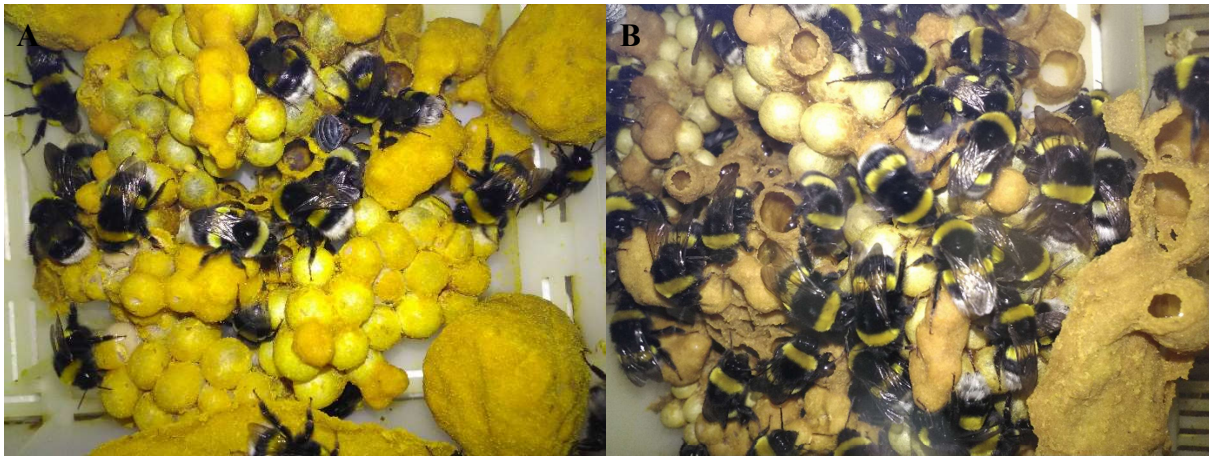


Şekil 3.3 Deney düzeneğinin şematik yapısı. **A.** Üstten görünüş **B.** 1-4 numaralı ödül kutularının şematik yapısı

Şekil 3.4 Deney düzeneğinin üstten görünüşü

3.2.1 Arıların beslenmesi ve kokuya alıştırılması

Koloni alındığı ilk gün deney düzeneğine bağlanmıştır ancak 10 gün boyunca kutuya bağlı nektar solüsyonu ve firma tarafından sağlanan polenler dışında hiç bir etkiye maruz bırakılmadan gözlenmiştir. Hiç bir etkiye maruz bırakılmayan işçilerden tarlacı oldukları belirlenen kontrol grubunu oluşturacak 18 birey toplanmıştır. Deney boyunca 10 saat gece, 14 saat gündüz fotoperiyodu sağlanmıştır. 10 gün sonrasında, koloninin birey sayısı yeterli yoğunluğa ulaşmış (Şekil 3.5 A ve B) ve kokuya yönlenmesini sağlamak üzere deneyler başlatılmıştır. Kutudaki nektar, deney başlangıcında dışarıya çıkmayı teşvik etmek için 2 gün boyunca kapalı tutulmuş ve tarlacı arılar deney düzeneğinde serbestçe gezmeye alıştıklarında kutunun altındaki nektar kapağı tekrar açılmıştır. Böylece nektarla bağdaştırılmış kokuya yönelen arılar mecburiyetten öte tercihlerinin o yönde olması sebebiyle numaralandırılmış beslenme kaplarında beslenmişlerdir.



Şekil 3.5 Yuva içi resimleri **A**. Deneye başlamadan koloni durumu **B**. Deney başlangıcındaki koloni durumu

3.2.2 Denek işçilerin seçimi

Deney süresince PER (Proboscis Extention Reflex) metotları kullanılarak çalışmalar yürütülmüştür. PER metodları önceki çalışmalarla desteklenmiş ve yönlenme deneylerinde sıkça kullanılan bir metoddur. Genel olarak arılara, %40-%60 oranındaki şeker solüsyonları verilir. Şeker solüsyonlarıyla beraber (solüsyon içerisinde veya dışından) istenen kokuya maruz bırakılır. Arıların şeker ödülüyle birlikte kokuya alıştırılması esas alınır ve deney düzeneğinden şeker solüsyonu çıkarılır ve ardından yalnızca koku verilir. Nektar olmamasına karşın arılarda dil (proboscis) uzatma davranışı veya refleksi (PER) gözlenmesi durumu, arının kokuya yönlendiğini teyit eder (Giurfa ve Malun, 2004; Masterman vd., 2000; Laloi vd., 2003; Riveros ve Gronenberg, 2009).

Deney düzeneğinde bu sistemin sağlanması için şu aşamalar kaydedilmiştir:

i. Kullanılan 50 ppm öjenol sırasıyla numaralandırılmış kutulara, ikişer günlük aralıklarla yanında %50 (w/v) nektar ile bırakılmıştır. Böylece nektar ile beslenen arılar, kokuya maruz bırakılarak nektar ve kokunun ilişkili olduğu öğretilmeyi amaçlanmıştır.

ii. Koku ve nektar, ikişer günlük kutu değişimlerinde ve nektarların bitip yenilenmesi gerektiğinde tazelenmiştir.

iii. Kutu değişimlerinde bir önceki kutu yıkanarak koku ve nektar izlerinden arınması sağlanmış, böylece arılar her bir kutunun gidiş yoluna ve düzeneğin sınırlarına alıştırılmıştır.

iv. Arıların alışması gözlendikten sonra bütün düzenek tekrar yıkanarak kokulardan ve izlerden arındırılmıştır.

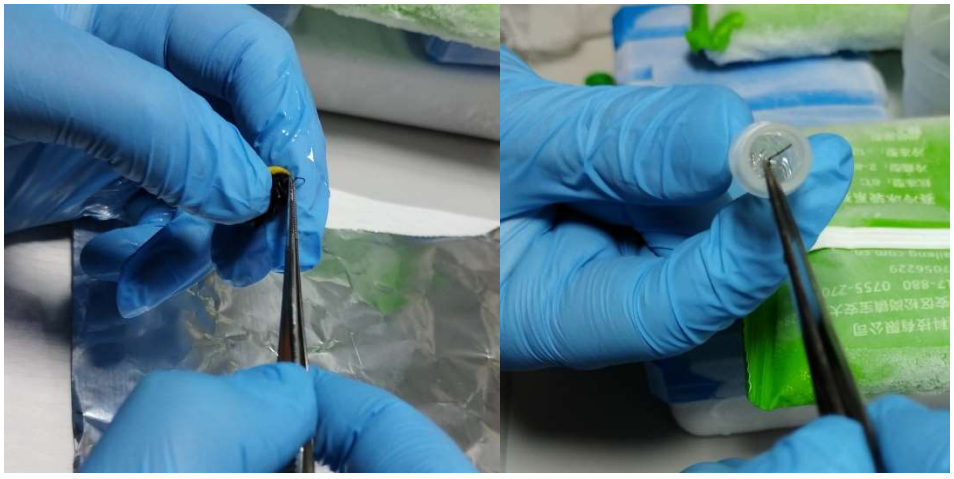
v. Arıların boş kutularda 2 gün boyunca gezmeleri sağlanmıştır.

vi. Ardından 1 numaralı kutuya nektar olmaksızın koku bırakılmıştır.

vii. 1 numaralı kutudaki koku sekiz saatin ardından alınıp 2 numaralı kutuya tazelenerek bırakılmıştır.

3.3 ANTEN DOKULARININ ELDE EDİLMESİ

Yönlenme deneyleri kapsamında yapılacak qPCR analizleri için, dış ödül kaplarındaki nektara yönelen tarlacı işçi arılar arasından, kokuya yönlenen ve kokuya maruz bırakılmayanlar seçilmiştir. Kontrol grubu için, toplamda 18 birey kullanılarak, 3 bireyin anten çiftleri 1 tüpte olacak şekilde 6 örnek grubu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra deney grubu için, 84 birey kullanılarak 6 bireyin anten çiftleri 1 tüpte olacak şekilde 14 örnek grubu oluşturularak bunlar önce -20 C'de 1 saat tutularak öldürülmüş, ardından hızlı bir şekilde anten diseksiyonları yapılarak (Şekil 3.6) RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6 Bombus arılarının anten diseksiyonları

3.4 TOTAL RNA İZOLASYONU

Diseksiyonu yapılan antenler, 1.4 mm çapında seramik boncuklar içeren 2 ml hacmindeki tüplerde üreticinin belirttiği yöntemler takip edilerek 1 ml TRIzol Reagent ile muamele edilmiştir. Nükleoprotein kompleksinin çözünmesi için 80 saniye boyunca 6000 g'de MagNA Lyser (Roche) makinesi ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işleminin ardından RNA içeren şeffaf sıvı, pipet ile alınarak santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Ardından üzerlerine 200 ml kloroform eklenen tüpler, soğutmalı santrifüjde (4 °C) 12000 g'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu üzerinde oluşan şeffaf sıvı alınarak, yeni tüplere aktarılmıştır. Bu tüplerin üzerine 0.5 ml izopropanol eklendikten sonra 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 10 dakika boyunca 12000 g'de soğutmalı santrifüj ile muamele edilen tüplerde RNA çökeltisi oluşturulmuştur. Çökeltiyi çevreleyen sıvı uzaklaştırılarak ve çökelti üzerine %75'lik 1 ml etanol eklenerek, tekrar 7500 g'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası çökelti etrafındaki sıvı uzaklaştırıldı ve 20 µl "RNAse free water" eklenerek çökeltinin çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen RNA'dan 3 µl alınarak kalite ve miktar tayini için ayrıldı ve geri kalan 17 µl RNA içeren tüpler -80 °C 'de saklanmıştır. Bu ölçümler Nanodrop Thermo 2000C (Thermo) ve Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo) ile üretici yönergeleri takip edilerek ölçülmüştür.

3.4.1 cDNA oluşturulması

RNA izolasyonu yapıldıktan sonra Nanodrop cihazı ile ölçümleri yapılan tüplerden, 260/280 oranı 1,80 üzeri olan örneklem tüpleri seçilmiştir. -80 ºC den alınan seçilmiş tüpler buzda çözündürülerek RNA degredasyonuna izin verilmeksizin eritilerek ve toplam hacmi 25 µl ve derişimi 25 ng/µl olacak şekilde nuclease free-water ile seyreltilmiştir. Elde edilen seyreltilmiş RNA çözeltisi, cDNA'ya çevirme basamaklarında stok çözelti olarak kullanılmıştır. Bu stok çözeltiden 8 µl alınarak üzerine, 1 µl Oligo $(dT)_{18}$ Primer, 12 µl nuclease free-water 4 µl 5X reaction buffer, 1 µl RiboLock Rnase inhibitor (20 U/µl), 1 µl RevertAid M-MulV RT (200 U/µl) eklendikten sonra elde edilen karışım pipetaj ile homojenize edilerek random hexamer protokolü gereği 5 dk boyunca 25 ºC ve ardından 60 dk boyunca 42 ºC'de TC 5000 (Techne) cihazıyla inkübe edilmiştir. Böylelikle cDNA iplikçikleri elde edilmiş ve Nanodrop Thermo 2000C cihazıyla ölçümleri yapılmıştır.

3.5 HEDEF GENLERİN BELİRLENMESİ

118Z386 numaralı "Bombus arısının (*Bombus terrestris* L.) gelişim sürecinde anten kemoreseptörlerinin genom düzeyindeki ifade eğilimlerinin araştırılması" adlı TÜBİTAK destekli projemiz kapsamında yürütülen dizileme çalışmaları ve biyoinformatik analizler sonucu bu çalışmada hedeflenen genler belirlenmiştir.

Proje dahilinde ham olarak elde edilen kısa ve uzun RNA kütüphaneleri MultiQC v0.11.8 (Ewels vd., 2016) programıyla görselleştirilerek kalitesiz bazlar tespit edilmiş ve fastp v0.20 (Chen vd., 2018) programı kullanılarak düşük kaliteli okumalardan arındırılmıştır (parametreler: -q 30 u 20 –cut_front –cut_tail –cut_right). Kapsamlı transkriptom profil oluşturulması, genom tabanlı ve *de novo* birleştirmesiyle oluşturulmuş transkriptomları kapsayan bir yaklaşımla yürütülmüştür. Referans temelli analiz için "Bombus_terrestris.Bter_1.0.dna_sm.toplevel (Bter_1.0)" genom verisi Ensembl Metazoa veritabanından (https://metazoa.ensembl.org/index.html) elde edilmiştir. Uzun RNA-Dizileme reaksiyonu sonucu elde edilen yüksek kaliteli okumalar bombus genomuna "Hisat2 v2.1.0" (Kim vd., 2019) yazılımı ile hizalanmıştır. ".bam" formatında elde edilen hizalanmış dosyalardan "StringTie v1.3.6" (Pertea vd., 2016) yazılımı kullanılarak transkriptler oluşturulmuştur. *De novo* transkriptom analizi ise Trinity v2.8.5 (Haas vd., 2013) yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

Hem referans-temelli hem de *de novo* transkript analizi sonucu elde edilen transkriptler tekrar genoma hizalanmıştır ve kapsamlı transkript modeli oluşturulmuştur. Final transkript dosyası olarak elde edilen bu transkriptler ile annotasyon ve gen ifade analizi yürütülmüştür.

qPCR aşamasında kokuya şartlanmış deney grubu ve kokusuz ortamda yetiştirilmiş kontrol grubu arasındaki gen ifade farklarının gözlenebileceği en anlamlı genlerin değişimlerinin tespit edilmesi hedeflenmiştir ve bu genlere bağlı olarak primerler tasarlanmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 qPCR analizinde gruplar arası farklılık göstermesi beklenen genler için tasarlanan primerler

Genbank ID	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (3'-5')
XM_012311926.2	AACCTTGTCATGCCATTACGAG	ATTCTGCAACATCTTCCACTCG
XM_003402160.3	TCGCCCCATACTTTGAACAATC	CGATGCTTAACCATACCTCGAC
XM_003393852.3	GCACTGCGATACTTCTGTTCAT	CATACCGAACGCCATAGATGTC
XM_003400832.3	ATACGCAATGCTCGATAATGGG	GGCCAGCACCATAAAAGTAGTT
XM_020868183.1	GCCTCTGAATCTCACAATTGGG	TCCATTGCATGTAACACCGAAA

XM_003402727.3	TTGGACCAGCATTACGTTCATC	CGCAACATCAACCTTGGTATCT
XM_003393385.3	CTAAAGGCCATGATGTTTCGGT	GTTCGCCTTTCCTCTTCTGATC
XM_020866400.1	TCAAAGGGTATGGAAGAGGATTCA	TGGTGGTTTCAATGTTTCTGCT
XM_020866596.1	CAGTGCAGATAACAACCGACAT	GTAGCGCAAACCATGGATGATA
XM_020866828.1	CGTCGGTAACTCGGTGTATTTC	AAACTGGGTCTTGACCTCTCAT
XM_003401068.3	CTGGACGATACGATCAGCTCTA	CAGAGCGATAATGAACTGCAGT
XM_003401128.2	AGGAGACGGTGTTGAAAGTAGT	AAACTTCCAGAGACAGGCTGTA
XM_020866827.1	GTGATACTATCCTGCGGCATTC	TTCGTTATAATCCTCAACCGCG
XM_020866939.1	GCCATAACAGCGACTTTCTTCT	CTCGGCATCACTGTTGTCTAAG
XM_020866297.1	GTAATTGGGCATCGTGGGATAC	TCAATGTTACCAGGTAGCCACT
XM_012312226.1	CCATGAGAAGCACATTGATGGT	GTGTTGTAGGGGAAATAGCCAC
XM_012312100.2	TTTCGAGATCACATGGCTAGGA	ACAACAGTTAATTGACCGCACA
XM_012312225.2	GACTGTTTGGATCAACGGCATA	CACCATTGTTTCTCGTTCGGTA
XM_020868393.1	AACTGCTCCTTTAAGACCCGAT	GCCGCTACCCTCATTTCTAAAT
XM_003401730.3	GATGGTATTTGACGAGGCACAA	TGGGAAATCGTGGTTGATCATG
XM_012321372.2	TTGACGGTCACAATTCATCGAG	TGTCGATGATTGTTTGTCACGT
XM_003401371.3	GTGGCAGTTATAACCCTCCAAC	GATATAACACCGCCAACCACAA
XM_003393741.3	TTCTAGACCCGGACTGTATGTG	TTCGATGTTCTTGTGATTCCGG
MSTRG.5637	CTTCAACGCTTCTTGGATGGAT	CCTAAATACCCAGGGATTTGCG
XM_012319776.1	CCTACCGAGTCAACAAGCAAAT	ACTTCACCGACTTCTAACCACT
XM_012311157.2	GGTCTTGGTCGTGGGATTAAAG	CCTTGAAGAAGAGCTGCTACAC
XM_020863516.1	GAAAGACTGTACGTGTTCCTGG	AACGCTAAATATGAGGCACACC
XM_012308862.2	TGCTGGGATTGATAGACAGAGT	GGATCGAATATGCTGCACCAAT
XM_003393464.3	GGCTTGTTCAATTGTACCTGGA	GGTGTTGTTCTTCATGCTCGTA

Tasarlanan primerlerin dizinleri NCBI Nucleotide Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) internet sitesinden nükleotid blast araması yapılarak homolog taramaları gerçekleştirilmiştir ve primer özgüllükleri teyit edilmiştir. Ardından yapılan işlemlerde, genlere ait isimler Genbank ID'leri dikkate alınarak kısa kodlar halinde kullanılmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2 Primerleri tasarlanan genlerin işlevleri ve kısaltma kodları

Genbank ID	**Kısa kod**	**Gen adı**	**Gen işlevi**
XM_012311926.2	926	LOC100650043	*Bombus terrestris* calcium-activated potassium channel slowpoke, transcript variant X12, mRNA
XM_003402160.3	160	LOC100644584	*Bombus terrestris* ionotropic receptor 25a, transcript variant X1, mRNA
XM_003393852.3	852	LOC100643968	*Bombus terrestris* aquaporin AQPAe.a-like, mRNA

XM_003400832.3	832	LOC100649637	*Bombus terrestris* odorant receptor 67c-like
XM_020868183.1	183	LOC105666960	*Bombus terrestris* putative odorant receptor 92a, mRNA
XM_003402727.3	727	LOC100631089	*Bombus terrestris* odorant receptor 2, mRNA
XM_003393385.3	385	LOC100644510	*Bombus terrestris* odorant receptor 82a, mRNA
XM_020866400.1	400	LOC100644224	*Bombus terrestris* putative 3-methyladenine DNA glycosylase, transcript variant X2, mRNA
XM_020866596.1	596	LOC100649513	*Bombus terrestris* putative odorant receptor 92a, mRNA
XM_020866828.1	828	LOC100647875	*Bombus terrestris* odorant receptor 65a, transcript variant X2, mRNA
XM_003401068.3	68	LOC100647995	*Bombus terrestris* odorant receptor Or2, mRNA
XM_003401128.2	128	LOC100646127	*Bombus terrestris* odorant receptor 22c-like, mRNA
XM_020866827.1	827	LOC100646243	*Bombus terrestris* odorant receptor 47a, mRNA
XM_020866939.1	939	LOC100647639	*Bombus terrestris* odorant receptor 10a-like, mRNA
XM_020866297.1	297	LOC110119825	*Bombus terrestris* odorant receptor 49b-like, mRNA
XM_012312226.1	226	LOC105666099	*Bombus terrestris* odorant receptor 4-like, mRNA
XM_012312100.2	100	LOC100650815	*Bombus terrestris* odorant receptor 13a, mRNA
XM_012312225.2	225	LOC100650930	*Bombus terrestris* odorant receptor 9a, mRNA
XM_020868393.1	393	LOC100644917	*Bombus terrestris* vitellogenin, transcript variant X3, mRNA
XM_003401730.3	730	LOC100650380	*Bombus terrestris* hexamerin, mRNA
XM_012321372.2	372	LOC100643318	*Bombus terrestris* rabphilin-1, transcript variant X1, mRNA
XM_003401371.3	371	LOC117230436	*Bombus vosnesenskii* nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase 3, transcript variant X4, mRNA
XM_003393741.3	741	LOC100650392	*Bombus terrestris* ATP-binding cassette sub-family A member 13, mRNA
MSTRG.5637	MSTRG	LOC117238291	*Bombus vosnesenskii* potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 3, transcript variant X6, mRNA
XM_012319776.1	776	LOC100647919	*Bombus terrestris* intraflagellar transport protein 172 homolog, mRNA

XM_012311157.2	157	LOC100648787	*Bombus terrestris* T-complex-associated testis-expressed protein 1, mRNA
XM_020863516.1	516	LOC100646827	*Bombus terrestris* potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 1, mRNA
XM_012308862.2	862	LOC100650764	*Bombus terrestris* protein rolling stone, transcript variant X3, mRNA
XM_003393464.3	464	LOC117239854	*Bombus vosnesenskii* protein tipE , transcript variant X5, misc_RNA

Kontrol ve deney grubu arasında farklılık görülmesi beklenen genlerin qPCR analizi ile tespitinin doğru olup olmadığını anlamak için gen ifadesi koşullara bağlı olarak değişmeyen housekeeping genlerini tespit edecek primerler kullanılmıştır (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 qPCR analizinde kullanılan farklılık göstermesi beklenen genlerin çalıştığını onaylayabileceğimiz referans "housekeeping" genlerine ait primerler

GenBank ID	**Forward Primer (5'-3')**	**Reverse Primer (3'-5')**
EF1α	AGAATGGACAAACCCGTGAG	CACAAATGCTACCGCAACAG
GAPDH-Bee	TTTTGAAATCGTTGAGGGTCTT	CCATCACGCCATAACTTTCC
RPL13	GGTTTAACCAGCCAGCTAGAAA	CTCCACAGGTCTTGGTGCAA
RPL23	GGGAAAACCTGAACTTAGGAAAA	ACCCTTTCATTTCTCCCTTGTTA
PLA2	GGTCACACCGAAACCAGATT	TCGCAACACTTCGTCATTTC

Oligomer Biyoteknoloji A.Ş.'ye siparişi verilip kurutulmuş olarak teslim alınan primerler, firma tarafından verilen yönergeler takip edilerek 100 µM derişimle nuclease free water kullanılarak stok haline getirilmiştir (Şekil 3.7).

Şekil 3.7 Kurutulmuş olarak teslim alınan primerlerin sulandırılma işlemi

3.6 HEDEF GENLERİN QPCR ANALİZİ

Oluşturulan cDNA'lar ve belirlenen hedef genlere ait primerler, Jena Bioscience PowerUp "SYBR" Green Master Mix protokolüne (Tablo 3.4) uygun olarak PCR kuyucuklarına ekilmiş ve Light Cycler 480 (Thermo) cihazında ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ölçümleri gerçekleştirilen örneklerin C_T değerleri LightCycler® 480 Software v1.5 adlı program ile hesaplanarak değerler kaydedilmiştir. Kontrol ve deney gruplarına ait C_T değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlılığı R v4.0.3 programı aracılığı ile t-testi kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen C_T değerleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduyla hesaplanarak kat artış değerleri belirlenmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001). Daha sonra kat artış değerlerinin negatif yönde artış gösterenleri, Schmittgen ve Livak (2008) referans yayınında belirtilen geri dönüşüm yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

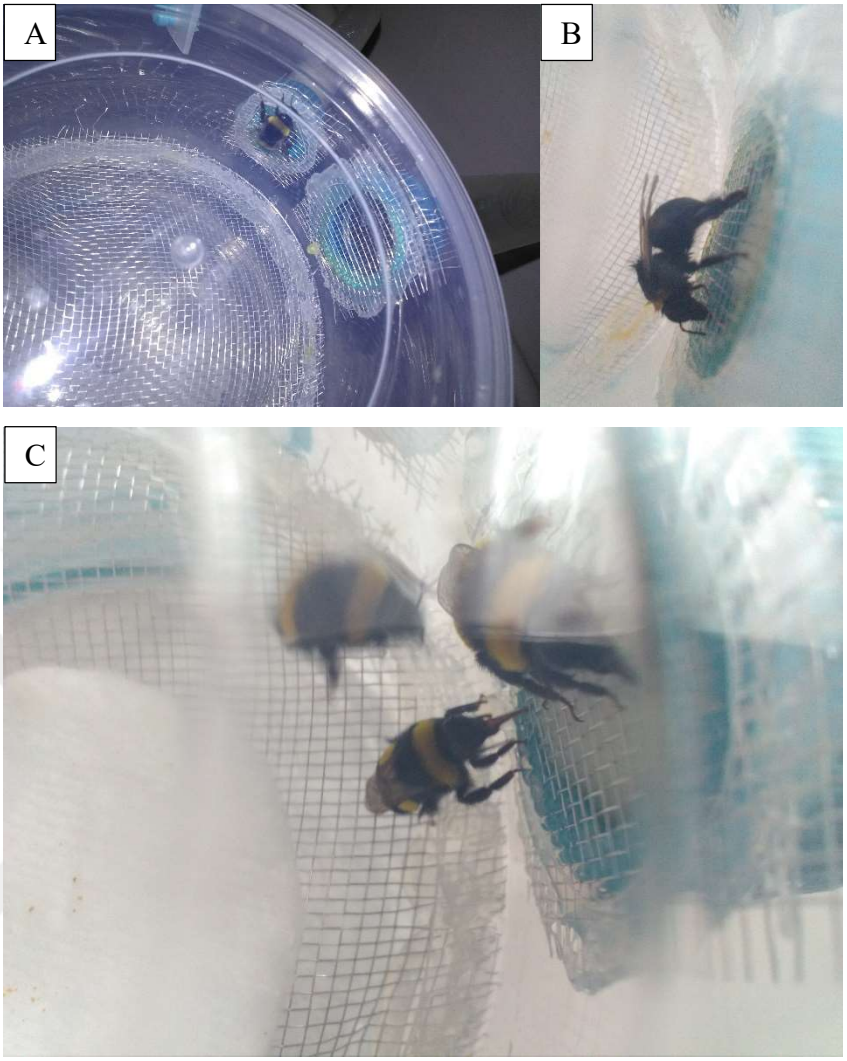
Tablo 3.4 Her bir PCR kuyusu için "SYBR" Green Master Mix protokolüne bağlı olarak gerçekleştirilen qPCR basamağında kullanılan hacimler

İçerik	**Hacim (20 µl)**
qPCR SyberMaster	10 µl
Forward Primer (10 µM)	0.6 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,6 µl
cDNA	1,5 µl
PCR Tampon Suyu	7,3 µl

4. BULGULAR

4.1 YÖNLENDİRME DENEYİ İLE İLGİLİ BULGULAR

Arıların deney kutuları içerisinde serbestçe gezdikleri ve deney düzeneğine tamamen adapte oldukları gözlendikten sonra, düzeneğin tamamı kokulardan arındırılmak üzere yıkanarak 1 numaralı kutuya yalnızca koku bırakılmıştır. Nektar olmaksızın 1 numaralı kutuya arıların yönlendiği ve tüp içerisine dil uzatma davranışları görüldükten sonra, bu gözlemin tekrarlanması ve davranışın güvenirliğinin anlaşılması için 1 numaralı kutudaki koku alınarak 2 numaralı kutuya tazelenip bırakılmıştır. Bu deney basamağın sonunda 1 numaralı kutuda dil uzatma davranışı yapan arıların tamamı 2 numaralı kutuya yönelerek aynı şekilde nektar olması gereken tüp içerisine dil uzatma davranışları göstermiştir (Şekil 4.1). Böylece yönlendirme deneyi başarılı kabul edilmiştir.



Şekil 4.1 Dil uzatma (PER) davranışı sergileyen işçiler **A,B**. 1 numaralı kutuda kokuya yönelim, **C**. 2 numaralı kutuya yönelim

4.2 İZOLASYON SONUÇLARI

Beslenen arıların kokusuz ortamda yetiştirilip kontrol grubunu oluşturan tarlacı kastına ait işçileri ve kokulu ortamda yetiştirilip deney grubunu oluşturan bireylerinin RNA izolasyonu yapıldıktan sonra kalite ve miktar tayini ölçümleri sonucu gösterildiği gibidir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 RNA örneklerinin Nanodrop Thermo 2000C ölçüm sonuçları (**1-6.** Kontrol grubu sonuçları **7-20.** Deney grubu sonuçları)

Örnek No.	**Nükl. Asit Kon.**	**A260**	**A280**	**260/280**	**260/230**	**Birim**
1	167,9	4,197	2,412	1,74	0,3	ng/µl

2	243,8	6,095	3,26	1,87	0,57	ng/µl
3	220,8	5,52	3,038	1,82	0,38	ng/µl
4	217,8	5,446	3,006	1,81	0,36	ng/µl
5	143,9	3,597	2,11	1,7	0,25	ng/µl
6	139,5	3,488	2,014	1,73	0,23	ng/µl
7	61	1,524	0,909	1,68	0,32	ng/µl
8	273,3	6,833	3,608	1,89	0,47	ng/µl
9	116,3	2,907	1,711	1,7	0,43	ng/µl
10	156	3,899	2,226	1,75	0,26	ng/µl
11	97,9	2,446	1,47	1,66	0,37	ng/µl
12	35,9	0,898	0,542	1,66	0,37	ng/µl
13	45	1,125	0,614	1,83	0,5	ng/µl
14	70,1	1,752	0,898	1,95	0,76	ng/µl
15	49,1	1,227	0,697	1,76	0,33	ng/µl
16	95,8	2,396	1,353	1,77	0,34	ng/µl
17	153,1	3,828	2,29	1,67	0,38	ng/µl
18	171,9	4,299	2,48	1,73	0,32	ng/µl
19	162,2	4,054	2,145	1,89	0,51	ng/µl
20	157,6	3,939	2,089	1,89	0,73	ng/µl

Sonuçlara göre kalite ve miktar bakımından yeterli olarak görülen 2, 3, 4, 8, 13, 14, 19 ve 20 grupları cDNA üretilmek üzere seçilmiştir. Seçilen gruplar üzerinden üretilen cDNA'lara ait kalite ve miktar tayinleri Tablo 4.2'deki gibidir.

Tablo 4.2 cDNA örneklerinin Nanodrop Thermo 2000C sonuçları

Örnek No	**Nükl. Asit Kon.**	**A260**	**A280**	**260/280**	**260/230**	**Birim**
2	1093	21,859	14,622	1,49	0,94	ng/µl
3	2131,9	42,639	26,064	1,64	1,8	ng/µl
4	2809,9	56,197	34,001	1,65	1,85	ng/µl
8	2921,5	58,431	35,335	1,65	1,8	ng/µl
13	3384,1	67,683	39,828	1,7	1,96	ng/µl

14	3499,6	69,993	41,457	1,69	1,99	ng/µl
19	2796,7	55,934	33,318	1,68	1,92	ng/µl
20	3303,4	66,067	38,999	1,69	1,94	ng/µl

Üretilen cDNA'lar içerisinden; 2,3 ve 4 numaralı örnekler kontrol grubunu, 8,13 ve 20 kodlu örnekler ise deney grubunu oluşturacak şekilde qPCR SYBR Master kiti (Jena bioscience) protokolüne uygun olarak kullanılmıştır. Light Cycler 480 (Thermo) cihazıyla qPCR işlemleri yapılan örneklerin C_T değerleri Tablo 4.3'teki gibidir.

Tablo 4.3 qPCR işlemi ile elde edilen CT değerleri

Gen kodu	**2 (Kontrol)**	**3 (Kontrol)**	**4 (Kontrol)**	**20 (Deney)**	**13 (Deney)**	**8 (Deney)**
EF1α	29,74	32,44	31	22,22	23,98	25,62
GAPDH	27,45	27,48	27,47	20,84	21,16	21
RPL13	29,46	29,92	29,69	22,67	22,77	22,47
RPL23	31,85	31,25	31,55	26,2	25,7	25,9
PLA2	31,88	31,56	31,72	25,93	26,65	26,3
926	29,81	31,18	30,5	24,61	25,86	25,2
160	30,48	30,69	30,27	29,06	28,72	28,9
852	34,33	33,79	34	26,22	28,17	27,2
832	33,94	36,26	30,65	26,82	28,17	27,5
183	35,81	36,98	36,4	30,21	30,17	30
727	29,66	31,74	30,7	22,51	22,86	22,6
385	34,02	34,52	34,2	26,86	27,55	27,2
400	34,27	36,04	35,1	26,89	27,64	27,2
596	34,44	36,18	35,3	30	29,75	30
828	33,97	35,71	34,8	26,86	27,24	27
372	33,42	35,18	34,3	25,81	27,87	27
371	33,46	34,94	34,2	25,83	27,84	26,8
741	32,33	33,21	32,7	24,7	26,43	29,71
MSTRG	36,52	37,09	36,8	26,82	27,99	27,5
776	33,44	36,05	34,75	25,51	26,8	26,2
157	34,94	35,98	35,4	27,71	29,55	28,6
516	30,87	30	29,28	27,97	29,82	28,9
862	31,97	34,31	33	24,79	26,01	29,99
464	29,5	29,55	29,47	27,26	28,73	28
68	33,08	36,85	35	26,89	28,02	27,4
128	32,1	32,3	31,9	31,25	31,18	31,22
827	35,05	35,18	35,12	26,8	27,68	27,2
939	35,79	37,65	36,7	29,33	29,98	29,6
297	35,24	35,92	35,5	27,83	29,46	28,6

226	34,22	35,13	34,7	26,11	27,47	26,7
100	29,7	29,91	29,57	26,52	28,04	27,2
225	38,62	37,46	38	30,81	32,19	31,64
393	34,99	35,69	32,14	27,64	29,27	28,4
730	35,91	37,08	36,5	28,21	29,8	28,54

Elde edilen C_T değerlerinin $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduyla belirlenen kat artış değerleri ise Tablo 4.4'te belirtilmiştir.

Tablo 4.4 $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak, deney grubuna ait değerlerin kontrol grubuna göre referans genler üzerinden kıyaslanarak belirlenen kat artış değerleri

Gen kodu	**EF1α**	**GAPDH**	**RPL13**	**RPL23**	**PLA2**
926	0,28	0,44	0,29	0,79	0,90
160	0,02	0,03	0,02	0,06	0,07
852	0,83	1,30	0,86	2,34	2,67
832	0,50	0,79	0,52	1,42	1,62
183	0,55	0,87	0,58	1,57	1,79
727	1,90	2,98	1,99	5,38	6,13
385	0,95	1,49	0,99	2,69	3,07
400	1,71	2,69	1,79	4,85	5,53
596	0,30	0,47	0,32	0,85	0,97
828	1,59	2,51	1,67	4,52	5,16
372	1,22	1,92	1,28	3,46	3,94
371	1,19	1,88	1,25	3,39	3,86
741	0,40	0,63	0,42	1,14	1,30
MSTRG	4,75	7,46	4,97	13,45	15,35
776	2,74	4,32	2,87	7,78	8,88
157	0,81	1,28	0,85	2,30	2,63
516	0,02	0,03	0,02	0,05	0,05
862	0,52	0,81	0,54	1,46	1,67
464	0,02	0,03	0,02	0,06	0,07
68	1,34	2,10	1,40	3,79	4,33
128	0,01	0,02	0,01	0,04	0,04
827	1,71	2,68	1,79	4,83	5,51
939	0,97	1,53	1,02	2,75	3,14
297	0,87	1,37	0,91	2,47	2,82
226	1,75	2,74	1,83	4,95	5,64
100	0,04	0,06	0,04	0,11	0,13
225	0,64	1,01	0,67	1,82	2,08
393	0,41	0,65	0,43	1,16	1,33
730	1,44	2,27	1,51	4,08	4,66

Kat artış değerleri elde edilen genler, Schmittgen ve Livak (2008) tarafından belirtilen geri dönüşüm metodu kullanılarak negatif yönde artış gösteren değerler ile birlikte Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5 Negatif yöndeki artışlar ile birlikte kat artış değerleri

Gen kodu	EF1α	GAPDH	RPL13	RPL23	PLA2
926	-3,60	-2,29	-3,43	-1,27	-1,11
160	-46,31	-29,45	-44,22	-16,34	-14,32
852	-1,21	1,30	-1,16	2,34	2,67
832	-2,00	-1,27	-1,91	1,42	1,62
183	-1,80	-1,15	-1,72	1,57	1,79
727	1,90	2,98	1,99	5,38	6,13
385	-1,05	1,49	-1,01	2,69	3,07
400	1,71	2,69	1,79	4,85	5,53
596	-3,32	-2,11	-3,17	-1,17	-1,03
828	1,59	2,51	1,67	4,52	5,16
372	1,22	1,92	1,28	3,46	3,94
371	1,19	1,88	1,25	3,39	3,86
741	-2,50	-1,59	-2,38	1,14	1,30
MSTRG	4,75	7,46	4,97	13,45	15,35
776	2,74	4,32	2,87	7,78	8,88
157	-1,23	1,28	-1,18	2,30	2,63
516	-62,54	-39,76	-59,71	-22,06	-19,34
862	-1,94	-1,23	-1,85	1,46	1,67
464	-48,84	-31,05	-46,63	-17,23	-15,10
68	1,34	2,10	1,40	3,79	4,33
128	-75,41	-47,95	-72,00	-26,60	-23,32
827	1,71	2,68	1,79	4,83	5,51
939	-1,03	1,53	1,02	2,75	3,14
297	-1,15	1,37	-1,09	2,47	2,82
226	1,75	2,74	1,83	4,95	5,64
100	-25,05	-15,93	-23,92	-8,84	-7,75
225	-1,56	1,01	-1,49	1,82	2,08
393	-2,43	-1,55	-2,32	1,16	1,33
730	1,44	2,27	1,51	4,08	4,66

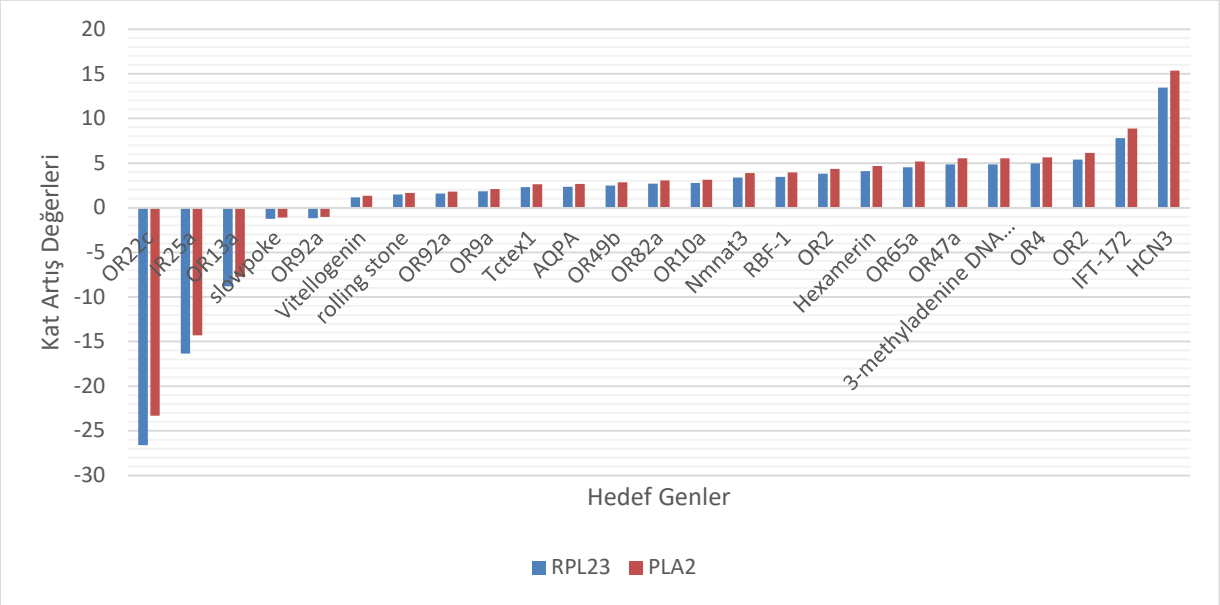
Bu tablo incelendiğinde, referans gen olarak kullanılan EF1α, GAPDH ve RPL13 genlerine ait değerlerin, 160, 516, 464, 128 ve 100 kodlu hedef genlere ait sonuçlar için düzenli ve dengeli sonuçlar vermediği göze çarpmaktadır. Bu sebeple bu referans genler hesaplamalardan çıkarılmış ve karşılaştırmalarda yalnızca RPL23 ve PLA2 referans genlerine ait değerler

kullanılmıştır. Bu iki referans gen ve hedef genler için elde edilen C_T değerlerinin kontrol ve deney grubu arasındaki anlamlı sonuçların belirlenmesi adına R v4.0.3 programında gerçekleştirilen t testine bağlı olarak bulunan değerler ve daha sonrasında R v4.0.3 programında normalize *p* değerlerinin hesaplanmasıyla elde edilen FDR değerleri Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6 Kontrol ve deney grupları arasında yapılan t testine dair istatistik değerleri (FDR değerlerine göre anlamlılık gösterenler asteriks (*) ile işaretlenmiştir.)

Hedef Gen	Ort. Ct. Değ.	*p* değeri	Norm. *p* değeri (FDR)	RPL23 için kat artış değ.	PLA2 için kat artış değ.
***MSTRG**	32,12	0,000184	0,002686689	13,45	15,35
***226**	30,72	0,000187	0,002686689	4,95	5,64
***225**	34,79	0,000291	0,002686689	1,82	2,08
***730**	32,67	0,000395	0,002686689	4,08	4,66
***926**	27,86	0,000621	0,002686689	-1,27	-1,11
***160**	29,69	0,000651	0,002686689	-16,34	-14,32
***371**	30,51	0,000783	0,002686689	3,39	3,86
***372**	30,60	0,00079	0,002686689	3,46	3,94
***827**	31,17	0,000834	0,002686689	4,83	5,51
***157**	32,03	0,001202	0,003398273	2,30	2,63
***400**	31,19	0,001289	0,003398273	4,85	5,53
***297**	32,09	0,0015	0,003625	2,47	2,82
***183**	33,26	0,002165	0,004642071	1,57	1,79
***776**	30,46	0,002241	0,004642071	7,78	8,88
***939**	33,18	0,002663	0,005148467	2,75	3,14
***828**	30,93	0,002911	0,005276187	4,52	5,16
***852**	30,62	0,004166	0,007106706	2,34	2,67
***727**	26,68	0,004506	0,007259667	5,38	6,13
***596**	32,61	0,007301	0,011143632	-1,17	-1,03
***068**	31,21	0,01418	0,02001	3,79	4,33
***128**	31,66	0,01449	0,02001	-26,60	-23,32
***385**	30,73	0,01922	0,02512913	2,69	3,07
***393**	31,36	0,01993	0,02512913	1,16	1,33
***100**	28,49	0,02545	0,030752083	-8,84	-7,75
***862**	30,01	0,04296	0,0498336	1,46	1,67
741	29,85	0,05474	0,061056154	1,14	1,30
832	30,56	0,05703	0,061254444	1,42	1,62
464	28,75	0,07027	0,072779643	-17,23	-15,10
516	29,47	0,1786	0,1786	-22,06	-19,34

Görülen tabloda FDR değerine göre anlamlı olmayan genler çıkarıldıktan sonra her iki referans gene bağlı olarak ifadeleri değişen genler Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2 Öjenol için şartlandırılmış olan arıların her bir gen ifadesinin 2 referans gen üzerinden kat artış değerleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 YÖNLENDİRME VE PER DENEMELERİ

Pham-Delegue vd., (1993), Ditzen vd. (2008) ve Jakobsen vd. (1995)'nin çalışmalarıyla daha önceden denenmiş ve başarılı sonuçlar alınmış düzenekler baz alınarak hazırladığımız deney düzeneği (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4) kapsamına PER davranışı takip edilerek arıların kokuya yönelmesi takip edilmiştir (Şekil 4.1). Yönlenme davranışını tetiklemesi için Fonta ve Masson (1984), Goyret ve Farina (2005) ve Young vd. (2018) tarafından yapılan deneyler baz alınarak saf öjenol (*4-Allylguaiacol; 4-Allyl-2-methoxyphenol*) kokusu seçilmiştir. Bu kokunun, belirtilen çalışmalar kapsamına arılarda elektro-fizyolojik tepkilere yol açtığı belirlenmişti. Yaptığımız çalışmalarda da bu bulgulara paralel sonuçlar elde edilmiş, deney düzeneğinin ve kullanılan kokunun bombus işçilerinde yönlenmeyi teşvik edici oldukları saptanmıştır. Böylelikle deneylerimizde kullanılan tasarımın kokuya şartlandırma deneyleri çerçevesinde kullanımı uygun olduğu düşünülmektedir.

5.2 RT-qPCR SONUÇLARI KAPSAMINDA KOKU İLE İLİŞKİLİ GEN İFADE FARKLILIKLARI

Çalışmamız kapsamında ele alınan, öjenol kokusu ile proboscis uzatma refleksi (PER) gerçekleştiren tarlacı kastına ait bombus arıları ile herhangi bir şartlandırmaya maruz kalmamış bombus arıları arasındaki gen ifade farklılıklarını anlamak adına seçilen 29 gen içerisinden 25 gene ait değerler istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir (Tablo 4.6). Bu genler içerisinden ise 13 adet gen (ORCO, OR4, OR47a, OR65a, OR10a, OR82a, OR49b, OR9a, OR2, OR13a, OR22c ve OR92a (2)) koku alma ile ilgili olan koku reseptörlerine, 1 gen ise koku reseptörleriyle birlikte çalışan koreseptör görevi gören iyonotropik reseptöre ait genlerdir (IR25a). Bu genlerin kat artış değerleri incelendiğinde, kokuya şartlanmış olan arılarda en çok artış gösteren genlerin ORCO, OR4, OR47a, OR65a ve OR2 reseptör genleri (LOC100631089, LOC105666099, LOC100646243, LOC10064787 ve LOC100647995) olduğu, diğer genlerde ise bu kat artışın giderek azaldığı görülmektedir (Şekil 4.2). Dolayısıyla bu genlerin koku spesifik olarak aktifleştiği ve kokuya bağımlı davranış farklılıklarının oluşmasında rol aldıkları, buna ek olarak diğer artış gösteren koku reseptör genlerin ise geniş yelpazede kokuları algılayan reseptörlerle ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Bu düşüncemiz daha önceki yapılmış çalışmalar (Karpe vd., 2017; McBride vd., 2014; Richgels ve Rollmann, 2012; Scialo vd., 2012)

ve tespit edilen genler ile uyum göstermektedir. Dolayısıyla bu çalışma kapsamındaki bilgiler de göz önünde bulundurulduğunda, spesifik kokular ile tetiklenen reseptörlerin kokuya bağımlı davranışlar üzerinde etkisinin, genel kokuları algılayan reseptörlere göre daha yüksek olduğu belirtilebilir. Bu açıdan deney kapsamındaki bulgular her bir reseptör için, gen ifade değişimlerinin değerleri göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir.

Değerlendirilen genlerden, kokuya bağımlı davranış farklılıklarının oluşturma potansiyeli yüksek olarak belirlenen genler üzerinde yapılacak daha detaylı ve spesifik çalışmalar ile (örn. knock-in/ knock-down) tozlaştırma servisini gerçekleştiren arıların belirli bitki gruplarına yönlendirilmelerine dair genetik gelişmeler veya belirli kokulara özelleşmiş olan reseptörler ile birlikte biyosensör geliştirme uygulamalarının önünün açılabileceği düşünülmektedir. Hem doğal kökenli hem de endüstriyel köken alabilen fenol ve türevlerinin tespit edilmesi, doğada insan aktivitesi sonucu biriken fenolün çevreye verdiği zararı azaltmak için gerekli olduğu vurgulanmıştır. Ancak, günümüzdeki fenol birikmesinin tespit edilmesi için ağır makinelere ve kompleks örneklemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısıyla, fenol tespitinin gerçekleştirilmesinin pahalı ve yavaş olduğu görülmektedir (Karim ve Fakhruddin, 2012). Bu sebeple, pratik ve ucuz bir metot olan biyosensör geliştirme çalışmalarının ilerletilmesi gerekmektedir. Dolayısıyla, çalışmamızda kullandığımız alil uçlu gayakol yapısında ve fenol olarak sınıflandırılan bir çeşit aromatik yağ olan öjenol (NCBI, 2021) karşısında gen ifadeleri yüksek miktarda değişen reseptörlerin, biyosensör geliştirme çalışmalarında kullanılmak üzere potansiyel reseptörler olabilecekleri düşünülmektedir. Biyosensörlerin veya arıların şartlandırılmasının fenol tespitinin dışında, askeri veya askeri olmayan alanlarda madde tespit edilmesi üzerine yapılan çalışmalar için de yön gösterebilecektir (Bromenshenk vd., 2015).

Bu açılardan koku ile ilişkili olup da ifadesi artan genler ile ilgili daha detaylı değerlendirmeler şöyle sıralanabilir:

5.2.1 ORCO

Odorant reseptör koreseptörü (ORCO) kodlayan LOC100631089 geni için kat artışı 5,75 olarak belirlenmiştir. Orco farklı böcek gruplarında korunmuş bir koreseptör olarak bulunmaktadır (Missbach, vd. 2014). Dolayısıyla koku reseptörleri ile kompleks oluşturduğundan dolayı koku reseptörleri ile birlikte ifade olarak koku ile ilişkili genler içerisinde en yüksek kat artış oranın bu gene ait olması kaçınılmaz görünmektedir. Şekil 2.6'da görüldüğü üzere, silüryen döneminden itibaren görülen tüm kanatlı böceklerde korunarak günümüze kadar gelmiş olan

bu proteinin evrimsel basamaklarının daha detaylı bir şekilde aydınlatılması gerekmektedir. Bu sebeple bu ilişkiyi aydınlatmak için evrimsel çalışmalar yürütülmüştür (Vosshal ve Hansson, 2011; Rota-Stabelli vd., 2013; Missbach vd., 2015). Ancak, çalışmamızdan elde ettiğimiz bilgiler doğrultusunda, ilkel böcek grupları ve antensiz diğer arthropod gruplarıyla birlikte yapılacak gen düzeyinde reseptör karşılaştırmalarının ihtiyaç duyulduğunu düşünmekteyiz. Bu tarz çalışmalar, Orco ve OR'lerin ilişkilerinin nasıl başladığını ve hangi süreçlerin etkisiyle bu proteinlerin kompleks yapısı oluşturduğunu anlamamıza ışık tutacaktır.

5.2.2 OR4

OR4 reseptörünü kodlayan LOC105666099 geni çalışmamız kapsamında koku karşısında 5,4 kat artış göstermiştir. Bu gen bal arılarında, kraliçe arının mandibular bezlerinden salgılanan feromonları algılamayı sağlayan bir alt ailenin içerisinde bulunduğu bildirilmiştir (Karpe vd., 2017). Dolayısıyla, öjenol kokusunun kraliçe feromonundan bağımsız olarak doğrudan ya da kraliçe feromonunun etkisini artırarak dolaylı olarak arıların antenlerindeki bu reseptörü büyük oranda etkiledikleri düşünülmektedir. Dolaylı olarak bu artışı sağlaması, öjenolün yuva içerisindeki kraliçenin feromon salgılama kapasitesini artırabilir olduğu düşüncesini oluşturmaktadır. Bundan ayrı olarak, OR4'ü kodlayan genlerin sivrisineklerdeki homolog türevlerinin besine yönelme ile yakın ilişkili olduğu belirtilmiştir. (McBride vd., 2014). Bu sebeple, bombus arılarındaki OR4 reseptörlerinin besin tercihlerinin oluşması ve bitkiye yönelimde de görev alabileceği düşünülmektedir.

5.2.3 OR47a, OR65a, OR10a, OR82a, OR49b ve OR9a

Yao vd. (2005), çalışmasında *Drosophila*'da farklı kokulara bağlı olarak antenlerdeki nöronların elektrofizyolojik olarak tepki miktarlarını hesaplayabilmiştir. Bu çalışmayı takiben Hallem ve Carlson (2006), 31 adet koku reseptörünü 100'den fazla koku ile endojen koku reseptörleri içermeyen mutant anten nöronu (boş nöron) kullanarak, farklı reseptörlerin elektrofizyolojik olarak kokulara olan tepkilerini ölçmüşlerdir. Buna göre, OR9a ve OR82a için anlık nöron uyarımının öjenol kokusu kullanıldığında uyarıcı oldukları ama uyarımın az olduğu tespit edilmiş. Bununla birlikte OR10a için bu uyarıcı etkinin nispeten daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmadaki öjenole yönlendirme ile arılardaki bu genlerin ifadesindeki kat artış değerlerinin OR9a, OR82a ve OR10a için ortalama sırasıyla 1,9; 2,8 ve 2,9 olarak görülmektedir. Buna bağlı olarak boş nöronların uyarılma sıklıkları ile gen ifade değerlerinin

birbirleri ile korelasyon gösterdiği görülmektedir. Ancak bizim yaptığımız çalışmalar ile daha önceki elektrofizyolojik ölçüm sonuçları farklı sonuçlar ortaya koymuştur. Buna göre elektrofizyolojik olarak öjenole karşı hiç tepki vermeyen OR49b geni için bizim çalışmamızda 2,6 kat pozitif artış belirlenmiştir. Benzer şekilde elektrofizyolojik tepkide öjenol kokusuna tepkisi az olan OR47a ve OR65a genlerinin ifade artış değerleri bizim çalışmamızda sırasıyla 5,2 ve 4,8 olarak bulunmuştur. Buna göre, bazı reseptörlerin gen ifadesi ile üzerinde bulundukları OSN'lere ait elektrofizyolojik tepkilerin korelasyon gösterdiği ve bazıları için ise bu durumun oluşmadığı görülmektedir. Tüm bunlar göze alındığında, korelasyon göstermeyen genlerin ve çalışmamızda pozitif yönde artış göstermiş olan OR47a, OR65a ve OR49b'nin yönelim davranışının kontrol mekanizmasında rol aldıkları düşünülmektedir. Belirtilen üç gen içerisinden OR47a'nın ethyl hexanoate kokusuna bağımlı olarak davranış farklılıklarında rol aldığının gösterilmesi bu düşüncemizi destekler niteliktedir (Richgels ve Rollmann, 2012). Ancak kokular için kullanılan dilüsyon farklılıklarının da bu durum için belirleyici olabilir. Çünkü farklı oranda seyreltilmiş kimyasallar için koku reseptörlerinin ve nöronların tepkilerinde farklılık görülebilmektedir (Hallem ve Carlson, 2006).

5.2.4 OR2

Çalışmamızda bu reseptörü kodlayan genin (LOC100647995), öjenol ile muamele edildiğinde, deney grubunda ortalama 4,06 kat daha fazla ifade edildiği gözlemlenmiştir. Bu sebeple, bu genin hem davranışsal olarak yönelimde hem de koku ve öğrenme ile doğrudan bir ilişkisi olduğu da düşünülmektedir. Bunun dışında, sivrisinekler üzerinde yapılan çalışmalarda OR2'nin 2-methylphenol, benzaldehyde, indole, ve 3-methylindole kokularının tespitinde görev aldığı da farklı çalışmalarda ifade edilmiştir (Scialo vd., 2012). Dolayısıyla bu reseptörün spesifik kokulara özelleşmiş olduğu görülmektedir.

5.2.5 OR13a

Koku reseptörlerinden olan OR13a geni (LOC100650815) çalışmamızda, öjenol ile etkileşiminde referans genlere göre ortalama olarak 8,2 kat indirgendiği görülmektedir. Bai ve Carlson (2010)'ın yaptığı çalışmalarda öjenol benzeri aromatik bir koku olan ve defne bitkisinde doğal olarak bulunan (Abaul vd., 1995) 3-octanol'ün, OR13a üzerinde sinyal oluşumunu tetiklediği belirlenmiştir. Aynı çalışmada OR13a reseptörünün hexanol ve 1-octan-3-ol kokularına da yüksek oranda tepki verdiği tespit edilmiştir. Ancak yaptığımız çalışma

kapsamında kullanılan öjenol dozunun OR13a için yüksek oranda indirgeyici rolü olduğu belirlenmiştir.

5.2.6 OR22c

OR22c reseptörü, daha önceki çalışmalarda öjenol ile aynı koku ailesinde olan (benzyl acetate ve anisole gibi) aromatik kokular ile muamele edilmiş ancak herhangi bir elektrofizyolojik yanıt alınamamıştır (Hoare vd., 2011; Montague vd., 2011). Bir diğer çalışmada OR22c'nin 2-acetylpyridine kokusunun 10^{-2} ile 10^{-3} dilüsyon oranlarının reseptörde tepki oluşturduğu belirlenmiştir. Aynı koku 10^{-4} oranında sulandırılarak kullanıldığında ise reseptör tepkisi büyük oranda yok olmuştur (Mathew vd., 2013). Ancak, ilerleyen çalışmalarda OR22c'nin methyl salicylate kokusunu 10^{-6} dilüsyon oranında bile rahatlıkla algıladığı belirlenmiştir. Buna ek olarak, bu kokunun (methyl salicylate) diğer reseptörler tarafından algılanma oranı oldukça düşük olarak gözlemlenmiştir (Si vd., 2019). Dolayısıyla, OR22c'nin spesifik kokuları algılayan bir reseptör olduğu buradan anlaşılmaktadır. Çalışmamızda ise OR22c reseptörünün, öjenol ile karşılaştığında kontrole oranla 25 kat daha az ifade edildiği belirlenerek, inhibe olduğu saptanmıştır.

5.2.7 OR92a

OR92a reseptörüne ait iki gen için (LOC105666960 ve LOC100649513) kat artış değerleri sırasıyla ortalama 1,7 ve -1,1 olarak görülmektedir. Bu genlerin öjenol'den ya da kokuya bağlı yönelimlerden etkilenmedikleri gözlemlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda, *Drosophila* tarafından bu reseptörün doğuştan gelen yiyecek bulma davranışları esnasında ve elma sirkesi kokusunun algılanmasında rol aldığı tespit edilmiştir (Semmelhack ve Wang, 2009). Böcek yaşlandıkça yiyecek bulma kapasitesinin azalışının ise bu reseptörde gerçekleşen kaspaz aktivasyonu ile oluştuğu belirlenmiştir (Chihara vd., 2014). Ancak, çalışmamız ile birlikte bu reseptörün gen ifadesinin öjenol karşısında önemli ölçüde farklılaşmadığı tespit edilmiştir.

5.2.8 IR25a

İyonotropik reseptör 25a (IR25a)'nın böcek IR'leri içerisinde yüksek oranda korunduğu belirtilmiştir (Croset vd., 2010; Groh-Lunow vd., 2015). Dolayısıyla üzerinde en çok çalışılan IR'lerdendir. Bunun yanısıra, IR25a, diğer reseptörler ile birlikte çalışarak aslında bir koreseptör olarak çalışmakta olduğu (Abuin vd., 2011; Wicher, 2012; Rytz vd., 2013) ve farklı

tepkisel mekanizmaların (görsel yönelim ve koku algılama) tetiklenmesini sağladığı da bilinmektedir (Núñez-Acuña vd., 2019). Ayrıca, IR25a'nın *Drosophila*'larda sıcaklığa bağlı olarak sirkadiyen ritmin düzenlenmesinden sorumlu olduğu tespit edilmiştir (Chen vd., 2015). Bunun yanı sıra, bu reseptörün IR21a reseptörüyle birlikte çalışarak serinlik algılayıcı rolünün olduğu belirlenmiş ve termoregülasyonda önemli bir basamakta yer aldığı gösterilerek soğuk ortamı bu reseptörler sayesinde tespit edip, ortamdan uzaklaşma davranışını (termotaksi) gerçekleştirdikleri anlaşılmıştır (Ni vd., 2016). Çalışmamızda, IR25a geninin negatif yönde 15,3 kat indirgendiği görülmektedir. Kokuya yönlendirilen deney grubu ile kokusuz ortamda yetiştirilen kontrol grubu arasında sıcaklık farkının olmaması, IR25a'nın termoregülasyon görevinden bağımsız olarak indirgenmiş olması gerektiğini göstermektedir. Deneylerimizdeki gruplar arasındaki tek farkın, arıların kokuya maruz bırakılarak refleksif hareket göstermeleridir. Dolayısıyla, IR25a'nın koreseptörlüğünü yaptığı koku reseptörlerinin de indirgenmiş olabileceği düşünülmektedir. Deneyimiz içerisinde görülen koku reseptörlerinden bu denli indirgenmiş olan tek reseptör OR22c olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum ile birlikte, IR25a'nın OSN'lerin %88'in de ifade olması (Task vd., 2020) göz önüne alındığında, IR25a ve OR22c'nin birlikte çalışabileceğini gösterir niteliktedir. Ancak çalışmamızda kısıtlı veriler bu birlikteliği ispatlayacak kadar kuvvetli olmadığından bu konunun ileriki çalışmalarda test edilmesi gerektiğini önermekteyiz.

5.2.9 Koku reseptörlerinin genel değerlendirmesi

Bu tez kapsamında, istatiksel olarak iki durum arasında anlamlı farklılık gösteren genler içerisinden OR2, OR4, OR47a, OR65a ve OR22c genlerinin öjenol ile karşılaştıklarında gen ifadelerinin önemli ölçüde değiştiği dolayısıyla spesifik kokuları algılamada rol aldıkları ve bu genlere ek olarak OR49b geninin de kokuya bağlı davranış mekanizması içerisinde rol aldığı düşünülmektedir. Ancak bu düşüncemizin, bu genler özelinde yapılacak çalışmalarca farklı dilüsyonlarda kokular için şartlandırılmış arılar kullanılarak teyit edilmesi gerekmektedir. Böylelikle arıların seralarda, bahçelerde ve özel alanlarda istenilen bitkilere yönelimlerini sağlayacak çalışmalara ya da koku spesifik biyosensörlerin geliştirilmesine, böylelikle büyük maliyetler ile gerçekleştirilen koku tespit çalışmalarına alternatif ucuz ve modüler gelişmelere ön ayak olunabileceği düşünülmektedir. Öyle ki, çalışmamızda fenol olarak sınıflandırılan öjenol kullanılması, bu tez çalışmasında öne çıkan koku reseptörlerinin üzerinde daha detaylı

çalışmalar yapılarak pahalı ve uzun süren fenol içerikli kimyasalların tespiti için alternatif metotlar geliştirebilecek biyoteknolojik çalışmaların gerçekleşebileceği öngörülmektedir.

5.3 RT-qPCR SONUÇLARI KAPSAMINDA KOKU İLE İLİŞKİLİ OLMAYAN GEN İFADE FARKLILIKLARI

İstatistiksel açıdan anlamlılık gösteren 25 gen içerisinde 12 gen (HCN3, IFT-172, 3-methyladenine DNA glycosylase, hexamerin, RBF-1, Nmnat3, Akuaporin (AQPA), Tctex-1, rost, vitellogenin ve slowpoke) koku algılama ile doğrudan ilişkili olmayan ancak anten dokusundaki ifadelerinin belirlenmesi hedeflenen genlerdir. Bu genler içerisinden pozitif yönde en yüksek artışı gösterenler sırasıyla 14,4 ve 8,3 kat artışı gösteren HCN3 ve IFT172 genleri olmuştur ve bu genlerin koku ile şartlandırılmış arılarda yüksek miktarda ifade edilmesi, arıların beyin aktivitelerinin oldukça arttığını göstermektedir. Bunun yanı sıra, en az ifade olan gen ise 1,2 kat oranında indirgenen slowpoke (LOC100650043) geni olmuştur. Gen ifadesindeki azalma önemli ölçüde görülmemektedir ancak bu genin ifadesinin artmamış olması, öjenol kokusunun arılarda herhangi bir bağımlılık etkisi yaratmamış olduğunu gösterir niteliktedir.

5.3.1 HCN3

Koku reseptörlerinden bağımsız olarak pozitif yönde en yüksek kat artışı (14,4) gösteren hiperpolarizasyon ile aktive olan siklik nükleotid katyon kapılı bir kanal (HCN3) kodlanmasından sorumlu gen (LOC117238291) olmuştur. HCN kanalları beyinde geniş ölçekte ifade olurlar ve nöronların ritmik aktivitesi, membranların dinlenme potansiyelinin belirlenmesi ve dendritik entagrasyon gibi işlevlerin yerine getirilmesini sağlarlar (Chu ve Zhen, 2010). Dolayısıyla deneyimizde sürekli koku eşliğinde besinlerini alan işçi arıların antenlerinde HCN3 geninin aktivitesinin bu denli artması, kokuya maruz kalan arıların beyin aktivitelerinin, sinyal iletimlerinin arttığını göstermektedir.

5.3.2 IFT172

Kat artış değeri ikinci en yüksek olan gen ise intraflagellar transport protein 172 homolog (IFT172) olarak (LOC100647919) karşımıza çıkmaktadır. Bu gen, nöronlarda primer sil yapısının oluşmasında doğrudan etkilidir (Green ve Mykytyn, 2010) ve ikincil olarak hedgehog sinyal iletiminde etkilidir. Hedgehog sinyal iletimi gelişim basamaklarında embriyonik hücrelere bilgi taşıyarak hücre farklılaşmasını sağlamaktadır ve yetişkin *Drosophila*

bireylerinde ise kokuya verilen cevabın düzenlenmesinde görev almaktadır. Bu düzenlenmenin OSN içerisindeki primer sillerin içerisinde OR'lerin taşınması ile yapıldığı gösterilmiştir (Sanchez vd., 2016). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, bu genin öjenol ile etkileşimde olan antenlerde önemli ölçüde arttığını göstermiştir ve bu durum öjenol varlığında aktivitesi artan OR'lerin OSN yüzeyinde daha fazla bulunabileceğini göstermektedir ancak bunun doğrudan tespit edilebileceği deneyler ile bu bulgu teyit edilmelidir.

5.3.3 3-methyladenine DNA glycosylase

3-methyladenine DNA glycosylase enzimini kodlayan gen (LOC100644224), deney grubunda ortalama 5,1 oranında artış göstermiştir. Bu enzim DNA'ların oluşumunda görülen hatalı baz eşleşmelerinin tamirini ve tespitini gerçekleştirir (Hedglin ve O'Brien, 2018). Bu hataların, kokuya özel olarak ifadesi artan genlerin normalden daha hızlı bir şekilde çalışmasının sonucunda gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir.

5.3.4 Hexamerin

Hexamerinler, omurgasızlarda bakır iyonlarını bağlayıp oksijen taşınmasını sağlayan hemosiyanin proteininden köken almış depo proteinleridir. Hexamerinin metamorfoz aşamasında aminoasit tedarik etme görevlerine ek olarak; gonad gelişimi, yumurta üretimi ve tarlacılık faaliyetlerini desteklemek üzere depo proteinleri olarak görev yaptıkları tespit edilmiştir (Martins vd., 2010). Çalışmamız ile kokuya bağlı olarak yönlendirme yapılmış arılarda bu gen (LOC100650380) pozitif yönde ortalama 4,4 kat artış göstermiştir. Bu artış bizlere, tarlacı kastına ait işçilerin kokuya bağlı olarak besine yönlendirilmelerinin tarlacılık potansiyellerinin artmış olabileceğine ve tarlacılık faaliyetlerini gerçekleştirecek arıların enerji ihtiyaçlarını karşılamaları için besin (yağ) depolarının yönlendirme yapılmamış olan işçilere nazaran daha gelişmiş olabileceğini göstermektedir. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda, ticari olarak yetiştirilen bombus arılarının, tozlaştırmasını gerçekleştirecekleri seralara yerleştirmeden önce yerleştirilecekleri seralardaki bitki kokularına göre önceden yönlendirilmesi, seralara yerleştirilen arıların daha etkili biçimde tozlaştırma servisini yerine getirmeleri anlamına gelebilir. Ancak bu durumun daha sonraki çalışmalar ile sera ortamlarında karşılaştırmalı olarak denenmesi gerekmektedir.

5.3.5 RBF-1

Kat artış değeri, koku ile muamele edilen arılarda, normal durumdaki arılara oranla 3,72 kat daha fazla ifade olan Rabphilin-1 (RBF-1), eksositoz ile nörotransmitter peptitler içeren veziküller salgılanmasını sağlayan yoğun çekirdekli vezikül (DSV) adında bir nöron bölgesinin aktifleştirilmesinde rol almaktadır. Çalışmamız, öjenol kokusunun rabphilin aktivitesini arttırdığını ortaya koymaktadır. Raphilin'in azalması durumunda ise, vezikül içerisinde taşınan nörotransmitter maddeler sinapslarda stabil bir durumda aktarım sağlayamamaktadır (docking esnasında), dolayısıyla sinaptik iletim büyük ölçüde sekteye uğramaktadır (WanJuan vd., 2012). Azalan sinyal iletimi, canlıda üretilen nörotransmitter maddelerin birikmesini ve bu durum arttığında "neuronal ceroid lipofuscinosis" yada "Batten hastalığı" olarak bilinen motor fonksiyonlarının yavaşlamasına sebep olan bir durumun oluşmasını sağlayabilmektedir (Grünewald vd., 2017). Bu durum göz önünde bulundurulduğunda RBF-1 gen ifadesinin artışı ile canlı sağlığının pozitif yönde etkilendiği ya da koku ile muamele edilen arılardaki beyin aktivitesinin artması sonucunda bu genin daha fazla ifade edildiği söylenebilir. Dolayısıyla bu durumun, özellikle koku ile uyarılma sayesinde mi yoksa beyin aktivitesinin herhangi bir şekilde artmasıyla birlikte gen ifadesinin artış gösterip göstermediğini anlamak için kokular ile başka uyarıcılar karşılaştırılarak belirlenmelidir.

5.3.6 Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase 3 (Nmnat3)

Nmnat3 enzimi, NAD biyosentetik yolağında merkez enzim rolündedir (Berger vd., 2005) ve nikotinamid mononükleotidler ile adenozin trifosfat (ATP) kullanarak NAD^+ oluşumunu katalizmektedir ve mitokondride bulunan Nmnat3 enziminin yüksek oranda sentezlenmesinin, akson dejenerasyonunu engelleyici bir etki oluşturduğu daha önceki çalışmalarca belirlenmiştir. Buna ek olarak, akson dejenerasyonu, programlanmış hücre ölümünden bağımsız olarak, nörodejeneratif hastalıklarda veya travmatik yaralanmalar ile gerçekleşen hücrelerin ölümü olarak tanımlanabilir (Sasaki vd., 2006). Böylelikle, bu enzimin substratları olan ve NAD öncülleri olarak görev yapan nikotinamidlerin, bulundukları ortamda dolaylı olarak akson dejenerasyonunu engelleyici etki oluşturdukları da belirlenmiştir. Dolayısıyla, çalışmamızda bu genin ortalama 3,6 oranında artış göstermesi, koku ile sürekli olarak tetiklenen nöronların aksonlarının dejenerasyona uğramaması için bu enzimin ifadesinin artmış olabileceğini göstermektedir. Nmnat3 enziminin substratı olan nikotinamid (B3 vitamini), NAD^+ yapısında bulunmaktadır ve glikoliz, sitrik asit döngüsü ve elektron taşıma sisteminde enerji üretimi için

kullanılmaktadır (Belenky vd., 2007). Bunun dışında, çalışmamızdaki Hexamerin seviyesinin 4,4 kat artışı ile birlikte arılardaki yağ deposunun artmış olabileceği düşünülmektedir ve böylece arılardaki enerji metabolizmasındaki yağ asitlerinin kullanımının artması ile üretilen ATP'nin NAD^+ üretimini artırdığı ve böylece Nmnat3 enzim aktivitesinin artmış olabileceği olası görülmektedir.

5.3.7 Akuaporin

Çoğu akuaporinin birincil işlevi, aktif çözünen madde taşınması ile oluşan ozmotik basınca göre suyu hücre zarları boyunca taşımaktır (Verkman, 2013). Memelilerde geniş ölçekte çalışılmış olan akuaporinlerin fonksiyonları ve filogenetik sınıflandırmaları genom biliminin gelişmesiyle daha sonradan böceklerde de tanımlanmıştır. Buna bağlı olarak, böceklerde akuaporin ailesinin 7 üyesi bulunmaktadır ve bunlardan ise 6 tanesi su taşıma ile ilgili proteinler ile ilişkiliyken, farklılık gösteren 1 tanesi *Drosophila*'da tanımlanmış olan Big Brain (BIB) genidir (Spring vd., 2009). Su taşımak ile görevli olan akuaporinlerin, yüksek sıvı diyetine sahip böceklerde beslenmenin devamlılığı için vücutlarından fazla suyun uzaklaştırılmasında ve kış uykusuna ihtiyaç duyan böceklerde hücrelerde gliserol biriktirerek donmaya karşı koruma oluşturmasına dair fonksiyonları da açıklanmıştır (Campbell vd., 2008). Su taşımanın dışında göreve sahip olan BIB geninin, tirozin-kinaz aktivitesi ile düzenlenen ve seçici olmayan katyon kapısı olarak görev gördüğü belirtilmiştir (Yanochko ve Yool, 2002). Diğer böcek gruplarında da BIB homoloğu genlerin benzer fonksiyonlarının oldukları belirtilmiştir (Campbell vd., 2008). Buna ek olarak, akuaporinlerin, hücreler arası boşluktaki potasyum iyonlarının nöron uyarımından sonra tekrar hücre içine alınmasında işlev görerek, sinirsel iletim hızı üzerinde de etkisinin oldukları düşünülmektedir (Verkman, 2013). Tüm bunlara bağlı olarak, çalışmamızda akuaporin geninin ifadesinin deney grubunda 2,5 kat arttığı görülmektedir. Öjenolün etkisinin nöron aktivitesini artırdığı göz önüne alındığında bu durum, Verkman (2013)'ın akuaporinlerin nöronların uyarımındaki etkisi hakkındaki düşüncelerini destekler niteliktedir.

5.3.8 T complex associated testis expressed protein 1

T complex testis expressed protein 1 (Tctex1), geni özellikle erkek bireylerde spermatogonez aşamasında yüksek miktarda ifade edilmektedir. Tctex1 geninden farklı olarak Tctex5 geni üzerinde yapılan çalışmada, farklı boyutlarda transkribe edilmekte oldukları saptanmıştır (~1,5 kb – ~0,5 kb) ve hemen hemen tüm dokularda görülmektedir ancak orta boyutta olan

izoformların (~1kb) beyin dokusuna özelleşmiş olduğu saptanmıştır (Han vd., 2007). Ancak bu gen henüz böcekler üzerinden çalışılmamıştır. Yapılan çalışmalarda genel olarak fare ve insanlar üzerine yoğunlaşılmış olup, pankreas, testis ve spermatozoa dokularında çalışılmıştır (Castaneda vd., 2017; Han vd., 2008; Zhao vd., 2017). Ancak çalışmamızda görülen kat artış değerinin ortalama 2,4 olması, bu genin böceklerdeki sinirsel iletim yollarında veya reseptörlerde görevli olabileceklerini göstermektedir. Han vd. (2007)'nin çalışmasında görülen ~1kb boyutundaki izoformların beyin dokusuna özelleşmiş oldukları belirtilmişti. Bu bilgi doğrultusunda, sinirsel iletim yollarında da bu genin farklı izoformlarının görülmesi olası gözükmektedir. Bu sebeple, Tctex geninin böcekler ile birlikte çalışılması ve fonksiyonlarının aydınlatılması, böceklerdeki sinirsel iletimin ve tepkisel mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sunacağı düşünülmektedir.

5.3.9 Protein rolling stone

Protein rolling stone (rost) geni miyogenez basamaklarında miyoblastların birleşmesinde rol aldığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak, yetişkin sineklerde merkezi sinir sisteminde ifade edildikleri de saptanmıştır (Paululat vd., 1997). Ancak merkezi sinir sistemindeki rolünün tam olarak ne olduğu belirlenememiştir. Çalışmamızda kokuya bağımlı olarak nöron aktivitesi artan işçi arıların antenlerinde bu proteinin ifadesinin ortalama 1,6 kat artış gösterdiği belirlenmiştir. Her ne kadar yüksek oranda bir artış görünmese de, rost geninin sinirsel iletime bağlı olarak ifadesinin değiştiği gözlemlenmiştir. Bu sebeple, bu genin merkezi sinir sisteminin dışındaki duyusal nöronlarda da ifade edildiği düşünülmektedir.

5.3.10 Vitellogenin

Memelilerde yağ depolama işi gören, vitellogenin (LOC100644917), bal arılarında üreme sistemini geliştiren bir hormon olarak tespit edilmiştir (Amdam vd., 2012). Bunun yanısıra, işçilerin kraliçe feromonu arttıkça üreme sistemlerindeki gelişimlerinin azaldığı ve böylelikle kraliçelerin kolonilerini yönetirken aktif oldukları dönemde hem otoritesini kaybetmemesi, hem de kast ayrımına yönelik bir adaptasyon olduğu belirtilmektedir (Cnaani vd., 1996; Leonhardt vd., 2016). Yaptığımız çalışma ile öjenole bağlı olarak, bu genin çalışma oranının ortalama 1,2 kat arttığı görülmektedir. Bu artış, öjenol kokusunun kraliçenin feromon salgısını veya işçilerin üzerinde kurduğu baskın olma etkisini az bir miktar artırmış olarak görünse de, önemli bir artış olmadığı görülmektedir.

5.3.11 Calcium-activated potassium channel slowpoke

Drosophila'da bulunan kalsiyum ile aktifleşen potasyum kanalı slowpoke geni nöron, kas, trake hücreleri ve orta bağırsakta ifade edilmektedir (Brenner ve Atkinson, 1997). Diğer iyon kanalları gibi bu kanallarda protein kinazlar, fosfatazlar ve diğer düzenleyici proteinler tarafından kontrol edilmektedir (Zhou vd., 2002). Bunun yanısıra böceklerdeki bu kanalların, bitkilerin tehditlere karşı havaya saldığı dimetil disülfit gibi böceklerde öldürücü etki yaratan uçucu sülfür bileşenleri ile inhibe edildiği, dolayısıyla sinirsel iletimdeki yavaşlamadan dolayı böceklerde öldürücü etki gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Dugravot vd., 2003). Bir başka çalışmada ise *Drosophila*'larda etanolün sineklerdeki uyuşturucu etkisinin bu kanallar olmadığı taktirde tolere edilemediği gözlemlenmiştir (Cowmeadow vd., 2005). Bu tolerans, sineklerde zararlı ajanlara karşı hızlı adaptasyonların gerçekleşmesinde slowpoke geninin önemli olduğunu göstermektedir. Ancak, toleransın gelişmesi böceklerde uyuşturucu ajanın daha yüksek miktarda tüketilmesine ve bağımlılık oluşmasına sebep olmaktadır (Cowmeadow vd., 2005). Çalışmamızda, öjenol ile bu kanallarda 1,2 katlık bir indirgenme belirlenmiştir. Böylece öjenolün böceklerdeki sinirsel iletimi yavaşlatacak düzeyde veya zararlı düzeyde nörolojik bir etki göstermediği dolayısıyla herhangi bir bağımlılık etkisi yaratmadığı görülmektedir.

5.3.12 Koku ile ilişkili olmayan genlerin genel değerlendirmesi

Kokuya yönlendirilen gruptaki hexamerin geninde görülen artış, tarlacılık yapmakla görevli arıların bir kokuyu besin ile ilişkilendirdiklerinde tarlacılık potansiyellerinin artmış olabileceğini gösterir niteliktedir. Bu sebeple, bu gen özelinde seralara yerleştirilecek arıların daha önceden yerleştirilecekleri sera içerisindeki kokulara yönlendirilmesinin tarlacılık servisini artırabileceği düşünülmektedir. Ancak bu durumu teyit edecek karşılaştırmalı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca bu tez ile birlikte elde edilmesi hedeflenen bilgilere ek olarak; rost geninin antenlerde de ifade olabileceği, öjenol kokusunun arılarda bağımlılık yapmadığı, Tctex-1 geninin, sinirsel iletim yollarında veya reseptörlerde görevli olabilecekleri ortaya çıkarılmış olup, akuaporinlerin nöron uyarımında etkisinin olduğu düşüncesi desteklenmiş, öjenol varlığında aktivitesi artan OR'lerin OSN yüzeyinde daha fazla bulunabileceğini, OR13a'nın ve özellikle OR22c'nin inhibe edici ajanının 50ppm çözünürlüğündeki öjenol olabileceği yönündeki bulgular önerilmiştir.

KAYNAKLAR

Abaul, J., Bourgeois, P., Bessiere, J.M. 1995. Chemical composition of the essential oils of chemotypes of Pimenta racemosa var.racemosa (P. Miller) J.W. Moore (Bois d'Inde) of Guadeloupe (FWI) .Flavor and Fragrance Journal, 10(5): 319-321.

Abuin, L., Bargeton, B., Ulbrich, M., Isacoff, E. Y., Kellenberger, S. ve Benton, R. 2011. Functional Architecture of Olfactory Ionotropic Glutamate Receptors. Neuron, 69(1): 44-60. doi:10.1016/j.neuron.2010.11.042

Afify, A., Betz, J.F., Riabinina, O., Lahondere, C. ve Potter, C.J. 2019. Commonly Used Insect Repellents Hide Human Odors from Anopheles Mosquitoes. Current Biology, 29, 1-12.

Agren, L. ve Hallberg, E. 1996. Flagellar sensilla of bumble bee males (Hymenopera, Apidae, Bombus). Apidologie, 27, 433-444.

Alford, D.V. 1969. A study of the hybernation of the bumblebees (Hymenoptera: Bombidae) in southern England. Journal of Animal Ecology, 38, 149-170.

Amdam, G.V., Fennern, E. ve Havukainen, H. 2012. Vitellogenin in Honey Bee Behavior and Lifespan. C.G. Galizia et al. (eds.), Honeybee Neurobiology and Behavior: A Tribute to Randolf Menzel, 17-29. doi 10.1007/978-94-007-2099-2_2.

Andrew S. 2012. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Institue, http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc.

Andersson, M.N., Löfstedt, C. ve Newcomb, R.D. 2015. Insect olfaction and the evolution of receptor tuning. Front. Ecol. Evol., 3, 53. doi: 10.3389/fevo.2015.00053

Anfora, G., Rigosi, E., Frasnelli, E., Ruga, V., Trona, F. ve Vallortigara, G. 2011. Lateralization in the Invertebrate Brain: Left-Right Asymmetry of Olfaction in Bumble Bee, Bombus terrestris. Plos one, 6(4), e18903.doi:10.1371/journal.pone.0018903

Bai, L. ve Carlson, J.R. 2010. Distinct Functions of acj6 Splice Forms in Odor Receptor Gene Choice. The journal of Neuroscience, 30(14): 5028-5036.

Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, ve function. Cell, 116, 281-297.

Bartel, D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition ve regulatory functions. Cell, 136, 215-233.

Belenky, P., Bogan, K.L. ve Brenner, C. 2007. NAD+ metabolism in health and disease. Trends in Biochemical Sciences, 32(1): 12-19.

Benton, R., Sachse, S., Michnick, S. W. ve Vosshall, L. B. 2006. Atypical membrane topology ve heteromeric function of Drosophila odorant receptors in vivo. PLoS Biol., 4, e20.

Benton, R., Vannice, K.S., Gomez-Diaz, C. ve Vosshall L.B. 2009. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in Drosophila. Cell, 136(1), 149-162.

Berger, F., Lau, C., Dahlmann, M, ve Ziegler, M. 2005. Subcellular Compartmentation and Differential Catalytic Properties of the Three Human Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase Isoforms. The Journal of Biological Chemistry, 280(43): 3634-3641.

Bohbot J, Pitts RJ, Kwon HW, Rützler M, Robertson HM, Zwiebel LJ. 2007. Molecular characterization of the Aedes aegypti odorant receptor gene family. Insect Mol Biol., 16(5), 525-537.doi:10.1111/j.1365-2583.2007.00748.x

Bohbot, J.D., Fu, L., Le, T.C., Chauhan, K.R., Cantrell, C.L. ve Dickens, J.C. 2011. Multiple activities of insect repellents on odorant receptors in mosquitoes. Medical ve Veterinary Entomology, 25, 436-444.

Bolger, A. M., Lohse, M., ve Usadel, B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data Bioinformatics, 30(15): 2114-2120. 10.1093/bioinformatics/btu170.

Brand, P. ve Ramirez, S.R. 2017. The Evolutionary Dynamics of the Odorant Receptor Gene Family in Corbiculate Bees. Genome Biol. Evol., 9(8): 2023-2036.

Brand, P., Ramirez, S.R., Leese, F., vd. 2015. Rapid evolution of chemosensory receptor genes in a pair of sibling species of orchid bees (Apidae: Euglossini).. BMC Evol. Biol, 15, 176.

Brand, P., Robertson, H.M., Lin, W., Pothula, R., Klingeman, W.E., Jurat-Fuentes, J.L., vd. 2018. The origin of the odorant receptor gene family in insects. Elife, 7, 38340. doi: 10.7554/eLife.38340

Brenner, R. ve Atkinson, N.S. 1997. Calcium-Activated Potassium Channel Gene Expression in the Midgut of Drosophila. Comp. Biochem. Physiol., 118B(2): 411–420.

Briegel, H. 1985. Mosquito reproduction: Incomplete utilization of the blood meal protein for oögenesis. Journal of Insect Physiology, 31(1): 15-21. https://doi.org/10.1016/0022-1910(85)90036-8

Bromenshenk, J.J., Henderson, C.B., Seccomb, R.A., Welch, P.M., Debnam, S.E. ve Firth, D.R. 2015. Bees as Biosensors: Chemosensory Ability, Honey Bee Monitoring Systems, and Emergent Sensor Technologies Derived from the Pollinator Syndrome. Biosensors, 5: 678-711.

Brown, J.B., Boley, N., Eisman, R., May, G.E., Stoiber, M.H., Duff, M.O., Booth, B.W., Wen, J., Park, S., Suzuki, A.M., vd. 2014. Diversity ve dynamics of the Drosophila transcriptome. Nature, 512, 393-399. doi: 10.1038/nature12962

Buck, L. ve Axel, R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition.. Cell, 90, 775-784.

Campbell, E.M., Ball, A., Hoppler, S. ve Bowman, A.S. 2008. Invertebrate aquaporins: a review. J. Comp. Physiol. B., 178, 935–955.

Cao, X. ve Jiang, H. 2015. Integrated modeling of protein-coding genes in the Manduca sexta genome using RNA-Seq data from the biochemical model insect. Insect Biochemistry ve Molecular Biology, 62, 2-10. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.01.007

Carey, A. F. ve Carlson, J. R. 2011. Insect olfaction from model systems to disease control. PNAS, 108, 12987–12995.

Cartar, R.V. ve Dill, L.M. 1990. Colony energy requirements affect the foraging currency of bumble bees. Behav. Ecol. Sociobiol., 27, 377-383.

Castaneda, J.M., Hua, R., Miyata, H., vd. 2017. TCTE1 is a conserved component of the dynein regulatory complex and is required for motility and metabolism in mouse spermatozoa. PNAS, E5370–E5378.

Cellerino, A. ve Sanguanini, M. 2018. Transcriptome Analysis Introduction ve Examples from the Neurosciences. LNSNS, 17, 27-44.doi: 10.1007/978-88-7642-642-1

Chen, C., Buhl, E., Xu, M. vd. 2015. Drosophila Ionotropic Receptor 25a mediates circadian clock resetting by temperature. Nature, 527(7579):516-20. doi: 10.1038/nature16148.

Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y. ve Gu, J. 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor Bioinformatics, 34(17): i884-i890. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560.

Cheng, H., Wang, Y. ve Sun, M. 2018. Comparison of Gene Expression Profiles in Nonmodel Eukaryotic Organisms with RNA-Seq. Transcriptome Data Analysis Methods ve Protocols, 1(1): 1-14. doi: 10.1007/978-1-4939-7710-9_1

Chihara, T., Kitabayashi, A., Morimoto, M., vd. 2014. Caspase Inhibition in Select Olfactory Neurons Restores Innate Attraction Behavior in Aged Drosophila. Plos genetics, 10(6), e1004437. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004437.

Chu, H. ve Zhen, X. 2010. Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the regulation of midbrain dopamine systems. Acta Pharmacol Sin, 31, 1036-1043.

Clyne, P.J., Warr, C.G., Freeman, M.R., vd. 1999. A novel Family of Divergent Seven-Transmembrane Proteins: Candidate Odorant Receptors in Drosophila. Neuron, 22(2): 327-338. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81093-4

Cnaani, J., Borst, D.W., Huangy, Z.Y., Robinson G.E. ve Hefetz, A. 1996. Caste Determination in Bombus terrestris: Differences in Development and Rates of JH Biosynthesis between Larvae Queen and Worker. J. Insect Physiol.(43)4:373–381.

Cowmeadow, R.B., Krishnan, H.R. ve Atkinson, N.S. 2005. The slowpoke Gene Is Necessary for Rapid Ethanol Tolerance in Drosophila. Alcohol Clin Exp Res., 29(10): 1777–1786.

Croset, V., Rytz, R., Cummins, S.F., Budd, A., Brawand, D., Kaessmann, H., Gibson, T.J., Benton, R. 2010. Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction. PLoS Genetics 6:e1001064. doi: 10.1371/journal.pgen.1001064.

Dabak, T. ve Özenirler, Ç. 2018. Using Commercial Bumblebees in The Pollination of Field Grown Tomatoes A Case Study: “Caged Tomatoes in Open Fields”. Mellifera, 18:1, 15-21.

De Luca, P.A., Bussiere, L.F., Sauto-Vilaros, D., Goulson, D., Mason, A.C. ve Vallejo-Marin, M. 2012. Variability in bumblebee pollination buzzes affects the quantity of pollen released from flowers. Oecologia, 172, 805-816.DOI 10.1007/s00442-012-2535-1

Ditzen, M., et al., 2008. Insect Odorant Receptors are Molecular Targets of the Insect Repellent DEET. Science, 319, 1838. DOI: 10.1126/science.1153121

Dornhaus, A. ve Chittka, L. 1999. Information flow and regulation of foraging activity in bumble bees (Bombus spp.). Apidologie, 35(2): 183-192.

Dornhaus, A. ve Chittka, L. 2005. Bumble bees (Bombus terrestris) store both food ve information in honeypots. Behavioural Ecology, 16, 661-666.

Dornhaus, A., Brockman, A. ve Chittka, L. 2003. Bumble bees alert to food with pheromone from tergal gland. Journal of Comparative Physiology A, 189, 47-51.

Dugravot, S. Groleau, F., Macherel, D., vd. 2003. Dimethyl Disulfide Exerts Insecticidal Neurotoxicit Through Mitochondrial Dysfynction and Activation of Insect KATP Channels. J. Neurophysiol., 90: 259-270.

Dunning, L.T., Thomson, G., Dennis, A.B., Sinclir, B.J., Newcomb, R.D. ve Buckley, T.R. 2013. Positive selection in glycolysis among Australasian stick insects. BMC Evolutionary Biology, 13, 215.

Durand, N., Sans, G.C., Bozzolan, F., vd. 2011. Degradation of Pheromone ve Plant Volatile Components by a Same Odorant-Degrading Enzyme in the Cotton Leafworm, Spodoptera littoralis . Plos one, 6:12, e29147.

Dylewska, M. 1962. The Apoidea of the Pieniny National Park, Part I Megachilidae and Apidae (partim.). Acta. Zool. Cracov., 7: 423-481.

Elgar, M. A., Zhang, D., Wang, Q., Wittwer, B., Pham, H. T., Johnson, T. L., vd. 2018. Insect antennal morphology: the evolution of diverse solutions to odorant perception. Yale J. Biol. Med., 91, 457-469.

Engstontia, P., Sanderson, A.P., Cobb, M., vd. 2008. The red flour bettle's large nose: An expanded odorant receptor gene family in Tribolium castaneum. Insect Biochemistry ve Molecular Biology, 38:4, 387-397.https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.10.005

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. ve Käller, M. 2016. MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. Bioinformatics, 32(19): 3047-3048. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354.

Fan, J., Francis, F., Liu, Y., Chen, J.L. ve Cheng, D.F. 2011. An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception. Genet. Mol. Res., 10(4): 3056-3069. http://dx.doi.org/10.4238/2011.December.8.2

Fleischer, J., Pregitzer, P., Breer, H. ve Krieger, J. 2018. Access the odor world: olfactory receptors ve their role for signal transduction in insects. Cellular ve Molecular Life Sciences, 75, 485-508.DOI 10.1007/s00018-017-2627-5

Fonta, C. ve Masson, C. 1984. Comparative study by electrophysilogy of olfactory responses in bumblebees (Bombus hypnorum and Bombus terrestris). Journal of Chemical Ecology, 10(8): 1157-1168.

Fonta, C. ve Masson, C. Structural and functional studies of the peripheral olfactory nervous system of male and female bumble-bees (Bombus hypnorum and Bombus terrestris). Chemical Senses, 12(1): 53-69.

Free, J.B. ve Williams, I. 1972. The transport of pollen on the body hairs of honeybees (Apis mellifera L.) ve Bumblebees (Bombus spp. L.). J. Appl. Ecol., 9, 609-615.

Fu, J., Miao, Y. ve Shao, L., vd. 2016. De novo transcriptome sequencing ve gene expression profiling of Elymus Nutans under cold stress. BMC Genomics, 17, 870.

Gao, Q. ve Chess, A. 1999. Identification of Candidate Drosophila Olfactory Receptors From Genomic DNA Sequence. Gneomics, 60:1, 31-39.doi: 10.1006/geno.1999.5894.

Gegear, R.J. ve Laverty, T.M. 2005. Flower constancy in bumblebees: a test of the trait variability hypothesis. Elsevier, 69:4, 939-949.

Geib, S.M., Calla, B., Hall, B., Hou, S. ve Manoukis, N.C. 2014. Characterizing the developmental transcriptome of the oriental fruit fly, Bactrocera dorsalis (Diptera: Tephritidae) through comparative genomic analysis with Drosophila melanogaster utilizing modENCODE datasets. BMC Genomics, 15, 942.https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-942

Ghildiyal, M. ve Zamore, P.D. 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. Nature Reviews Genetics, 10:2, 94-108.DOI: 10.1038/nrg2504

Gillies, M.T. 1980. The role of carbon dioxide in host-finding by mosquitoes (Diptera: Culicidae): a review. Bull. Ent. Res., 70, 525-532.

Giurfa M. ve Malun D. 2004. Associative Mechanosensory Conditioning of the Proboscis Extension Reflex in Honeybees. Learn. Mem., 11, 294-302. doi: 10.1101/lm.63604.

Gongora-Castillo, E. ve Buell, C.R. 2013. Bioinformatics challenges in de novo transcriptome assembly using short read sequences in the absence of a reference genome sequence. Nat.Prod.Rep., 30, 490.DOI: 10.1039/c3np20099j

Goulson, D. 2010. Bumblebees: Behaviour, Ecology ve Conservation (2nd Edition). Oxford University Press.

Goyret, J. ve Farina, W.M., 2005. Non-random nectar unloading interactions between foragers and their receivers in the honeybee hive. Naturwissenschaften, 92, 440-443.

Gösterit, A.ve Gürel, F. 2014. Bombus Arısı (Bombus terrestris L.)' nın Ticari Yetiştiriciliği İçin Temel Gereklilikler. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 9(2): 102-111.

Grabe, V. ve Sachse, S. 2018. Fundamental Principles of the olfactory code. Biosystems, 164, 94-101.https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2017.10.010

Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., vd. 2011. Full-length Transcriptome Assembly From RNA-Seq Data Without a Reference Genome. Nat Biotechnol., 29:7, 644-652.doi:10.1038/nbt.1883

Green, J.A. ve Mykytyn, K. 2010. Neuronal Primary Cilia: An Underappreciated Signaling and Sensory Organelle in the Brain. Neuropsychopharmacology Reviews (2014) 39, 244–245; doi:10.1038/npp.2013.203.

Grewal, S.I. ve Jia, S. 2007. Heterochromatin revisited. Nat. Rev. Genet., 8, 35-46.

Groh-Lunow, K.C., Getahun, M.N., Grosse-Wilde, E. ve Hansson, B.S. 2015. Expression of ionotropic receptors in terrestrial hermit crab's olfactory sensory neurons. Frontiers in Cellular Neuroscience, 8, 448.

Grosse-Wilde, E., Kuebler, L. S., Bucks, S., Vogel, H., Wicher, D. ve Hansson, S. 2011. Antennal transcriptome of Manduca sexta. PNAS, 108:18, 7449–7454.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1017963108

Grünewald, B., Lange, M.D., Werner, C., vd. 2017. Defective synaptic transmission causes disease signs in a mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. eLife, 6: e28685.

Gullan, P.J. ve Cranston, P.S. 2010. The insects: an outline of entomology (Fourth Edition). Wiley-Blackwell, 1, 2-45.

Guo, X., Yu, Q., Chen, D., vd. 2020. 4-Vinylanisole is an aggregation pheromone in locusts. Nature, , .https://doi.org/10.1038/s41586-020-2610-4

Gupta, M. 1992. Scanning electron microscopic studies of antennal sensilla of adult worker Apis florea F (Hymenoptera:Apidae). Apidologie, 23, 47-56.

Haas, B.J., Papanicolau, A., Grabherr, M., vd. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. Nature Protocols, 8, 1494-1512. https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084

Haeseler, V. 1972. Anthropogene Biotope (Kahlschlag, Kiesgrube, Stadtgarten) als Refugien für Insekten, untersucht am Beispiel der Hymenoptera Aculeata. Zool. Jb. Sys. 99: 133-212.

Hallem, E.A. ve Carlson, J.R. 2006. Coding of Odorsby a Receptor Repertoire. Cell, 125, 143–160. DOI 10.1016/j.cell.2006.01.050.

Halstead, S.B. 2007. Dengue Virus–Mosquito Interactions. Annual Review of Entomology, 53, 273-291.

Han, Y., Song, X-X., Feng, H-L., vd. 2008. Mutations of t-complex testis expressed gene 5 transcripts in the testis of sterile t-haplotype mutant mouse. Asian J Androl, 10(2): 219–226.

Han, Y.B., Feng, H.L., Cheung, C.K., Lam, P.M., Wang, C.C. ve Haines, C.J. 2007. Expression of a Novel T-Complex Testis Expressed 5 (Tctex5) in Mouse Testis, Epididymis, and Spermatozoa. Molecular Reproduction and Development, 74:1132–1140.

Hansson, B. S. 2002. A bug's smell – research into insect olfaction. TRENDS in Neurosciences, 25:5, 271-274.

Hansson, B. S. ve Stensmyr, M. C. 2011. Evolution of Insect Olfaction. Neuron, 72, 698-711.

Hedglin, M. ve O'Brien, P.J. 2018. Human Alkyladenine DNA Glycosylase Employs a Processive Search for DNA Damage. Biochemistry, 47(44): 11434–11445.

Heinrich, B. 1972. Physiology of brood incubation in the bumblebee queen, Bombus vosnenenskii. Nature, 239, 223-225.

Heinrich, B. 1979. Bumblebee Economics. Harvard University Press, Cambridge.

Hill, C.A., Fox, A.N., Pitts, R.J., Kent, L.B., vd. 2002. G Protein-Coupled Receptors in Anopheles gambiae. Science, 298:5591, 176-178.DOI: 10.1126/science.1076196

Hoare D.J., Humble, J., Jin, D., Gilding, N., Petersen, R., vd. 2011. Modeling Peripheral Olfactory Coding in Drosophila Larvae. PLoS ONE 6(8): e22996. doi:10.1371/journal.pone.0022996.

Hollins, B., Hardin, D., Gimelbrant, A.A. ve McClintock, T.S. 2003. Olfactory-enriched transcripts are cell-specific markers in the lobster olfactory organ.. The Journal of Comparative Neurology, 455, 125-138.doi: 10.1002/cne.10489

Ishida, Y., Chen, A.M., Tsuruda, J.M., vd. 2004. Intriguing olfactory proteins from the yellow fever mosquito, Aedes aegypti. Naturwissenschaften, 91, 426-431.

Ishida, Y., ve Leal, W.S. 2005. Rapid inactivation of a moth pheromone. Proc. Natl. Acad. Sci., 102, 14075-79.

Jakobsen, H.B., Kristjansson, K., Rohde, B., Terkildsen, M. ve Olsen, C.E., 1995. Can social bees be influenced to choose a specific feeding station by adding the scent of the station to the hive air?. Journal of Chemical Ecology, 21, 11.

Jayakodi, M., Jung, J.W., Park, D., Ahn, Y.J., Lee, S.C., Shin, S.Y., Shin, C., Yang, T.J. ve Kwon, H.W. 2015. Genome-wide characterization of long intergenic non-coding RNAs (lincRNAs) provides new insight into viral diseases in honey bees, Apis cerana ve Apis mellifera. BMC Genomics, 16, 680.doi: 10.1186/s12864-015-1868-7

Jenkins, A.M., Waterhouse, R.M. ve Muskavitch, M.A. 2015. Long non-coding RNA discovery across the genus anopheles reveals conserved secondary structures within ve beyond the Gambia complex. BMC Genomics, 16, 337.doi: 10.1186/s12864-015-1507-3.

Kaissling, K.E. 2001. Olfactory Perireceptor ve Receptor Events in Moths: A Kinetic Model. Chemical Senses, 26, 125-150.

Karim, F. ve Fakhruddin, A.N.M. 2012. Recent advances in the development of biosensor for phenol: a review. Rev. Environ. Sci. Biotechnol., 11: 261-274.

Karpe, S.D., Dhingra, S., Brockmann, A. ve Sowdhamini, R. 2017. Computational genome-wide survey of odorant receptors from two solitary bees Dufourea novaeangliae (Hymenoptera: Halictidae) ve Habroboda laboriosa (Hymenoptera:Apidae). Scientific Reports, 7, 10823.

Kaupp, U.B. 2010. Olfactory signalling in vertebrates ve insects: differences ve commonalities. Nature Reviews, 11, 188-200.

Kawaguchi, L.G., Ohashi, K. ve Toquenaga, Y. 2007. Contrasting responses of bumble bees to feeding conspecifics on their familiar and unfamiliar flowers. Proc. R. Soc. B., 274: 2661-2667.

Keil, T.A. 1984. Surface coats of pore tubules ve olfactory sensory dendrites of a silkmoth revelaed by catonic markers.. Tissue Cell, 16, 705-717.

Kim, D., Paggi, J.M., Park, C., Bennett, C. ve Salzberg, S.L. 2019. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. Nat. Biotechnol. 37(8): 907-915. doi: 10.1038/s41587-019-0201-4.

Kindhauser, M.K., Allen, T., Frank, V., Santhana, R.S. ve Dye, C. 2016. Zika: the origin ve spread of a mosquito-borne virus. Bull. World Health Organ, 94:9, 675-686C.doi: 10.2471/BLT.16.171082

Kiya, T., Ugajin, A., Kunieda, T. ve Kubo, T. 2012. Identification of kakusei, a nuclear non-coding RNA, as an immediate early gene from the honeybee, ve its application for neuroethological study. Int. J. Mol. Sci., 13, 15496-15509.doi: 10.3390/ijms131215496

Klowden, M.J. 2008. Phsiological Systems in Insects (Third Edition). Elsevier, 1, 1-25.

Krieger, J., Klink, O., Mohl, C., Raming, K. ve Breer, H. 2003. A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders.. Journal of Comparative Physiology A, Neuroethology, Sensory, Neural ve Behavioural Physiology, 189, 519-526.doi: 10.1007/s00359-003-0427-x

Kryndushkin, D.S., Alexandrov, I.M., Ter-Avanesyan, M.D. ve Kushnirov, V.V. 2003. Yeast [PSI+] Prion Aggregates Are Formed by Small Sup35 Polymers Fragmented by Hsp104. The Journal of Biological Chemistry, 278, 49636-49643. doi:10.1074/jbc.M307996200

Laloi, D., Sandoz, J.C., Picard-Nizou, A.L., vd. 2003. Olfactory conditioning of the proboscis extention in bumble bees. Entomologia Experimentalis et Applicata, 90(2): 123-129.

Langmead, B. 2010. Aligning Short Sequencing Reads with Bowtie. Current Protocols in Bioinformatics, 32(1), 11-7. doi: 10.1002/0471250953.bi1107s32.

Langmead, B. ve Salzberg, S.L. 2012. Fast gapped read alignment with bowtie 2. Nat. Methods, 9, 357-359.

Leal, W.S. 2013. Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, ve Degrading Enzymes. Annu. Rev. Entomol., 58, 373-391.

Leal, W.S., Chen, A.M., Ishida, Y., Chiang, V.P, Erickson, M.L. vd. 2005. Kinetics ve molecular properties of pheromone binding ve release.. Proc. Natl. Acad. Sci., 102, 5386-5391.

Lee, R.C., Feinbaum, R.L. ve Ambros, V. 1993. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell, 75, 843-854.

Leonhardt, S.D., Menzel, F., Nehring, V. ve Schmitt, T. 2016. Ecology and Evolution of Communication in Social Insects. Cell, 164: 1277-87.

Li, B. ve Dewey, C.N. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics, 13, 323.

Liebholt, A.M.. 2012. Forest pest management in a changing world. International Journal of Pest Management, 58:3, 289-295.

Livak, K.J. ve Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 22DDCT Method. Methods, 25, 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.

Malone, C.D. ve Hannon, G.J. 2009. Small RNAs as Guardians of Genome. Cell, 136:4, 656-668.DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.045

Martin, C.D., Fountain, M.T. ve Brown, M.J.F. 2018. Bumblebee olfactory learning affected by task allocation but not by a trypanosome parasite. Scientific Reports, 8, 5809.

Martin, C.D., Toner, C., Fountain, M.T. ve Brown, M.J.F. 2019. Busier bees : Increasing nest traffic in commercial bumblebee colonies. Journal of Pollination Ecology, 25:2, 7-15.

Martin, J.A. ve Wang, Z. 2011. Next-generation transcriptome assembly. Nature Reviews Genetics, 12, 671-682.

Martins, J.R., Nunes, F.M., Cristino, A.S. vd. 2010. The four hexamerin genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones. BMC Molecular Biol 11, 23. https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-23

Masterman R., Smith B.H. ve Spivak M. 2000. Brood Odor Discrimination Abilities in Hygienic Honey Bees (Apis mellifera L.) Using Proboscis Extension Reflex Conditioning. Journal of Insect Behaviour, 13, 87-101.

Mathew, D., Martelli, C., Kelley-Swift, E., vd. 2013. Functional diversity among sensory receptors in a Drosophila olfactory circuit. PNAS, e2134–e2143.

McBride, C.S., Baier, F., Omondi, A.B., vd. 2014. Evolution of mosquito preference for humans linked to an odorant receptor. Nature, 13, 515(7526): 222-227. doi:10.1038/nature13964.

McGettigan, P.A. 2013. Transcriptomics in the RNA-seq Era. Curr Opin Chem Biol., 17:1, 4-11.doi:10.1016/j.cbpa.2012.12.008

Missbach, C., Dweck, H.K.M., Vogel, H., vd. 2014. Evolution of insect olfactory receptors. eLife, 3, e02115.DOI: 10.7554/eLife.02115

Missbach, C., Vogel, H., Hansson, B.S. ve Große-Wilde, E. 2015. Identification of Odorant Binding Proteins ve Chemosensory Proteins in Antennal Transcriptomes of the Jumping Bristletail Lepismachilis y-signata ve the Firebrat Thermobia domestica: Evidence for an Independent OBP–OR Origin. Chemical Senses, 40, 615-626.doi:10.1093/chemse/bjv050

Montague, S.A., Mathew, D. ve Carlson, J.R. 2011. Similar Odorants Elicit Different Behavioral and Physiological Responses, Some Supersustained. The Journal of Neuroscience, 31(21):7891–7899.

Münch, D. ve Galizia, C. G. 2016. DoOR 2.0-comprehensive mapping of Drosophila melanogaster odorant responses. Scientific Reports, 6, 21841.

Nakagawa, T. ve Vosshall, L.B. 2009. Controversy ve consensus: noncanonical signaling mechanisms in the insect olfactory system. Current opinion in neurobiology, 19(3), 284-292.

Nakagawa, T., Sakurai, T., Nishioka, T., ve Touhara, K. 2005. Insect sex-pheromone signals mediated by specifici combinations of olfactory receptors. Science, 307:5715, 1638-1642.DOI: 10.1126/science.1106267

National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 3314, Eugenol. Nisan 05, 2021 tarihinde erişildi https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eugenol.

Nellen, W. ve Hammann, C. 2005. Small RNAs: Analysis ve Regulatory Functions. Nucleic Acids ve Molecular Biology (Ed) Wolfgang Nellen, Christian Hammann , 17, VII.

Ni, L., Klein, M., Svec, K.V., vd. 2016. The Ionotropic Receptors IR21a and IR25a mediate cool sensing in Drosophila. eLife, 5:e13254. DOI: 10.7554/eLife.13254.

Núñez-Acuña, G., Gallardo-Escárate, C., Skiftesvik, A.B., vd. 2019. Silencing of ionotropic receptor 25a decreases chemosensory activity in the salmon louse Lepeophtheirus salmonis during the infective stage. Gene, https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.02.012.

Obiero, G.F., Pauli, T., Geuverink, E., Veenendaal, R., Niehuis, O. ve Große-Wilde, E. 2021. Chemoreceptor diversity in apoid wasps ve its reduction during the evolution of the pollen-collecting lifestyle of bees (Hymenoptera: Apoidea). Genome, Biology ve Evolution, evaa269, .https://doi.org/10.1093/gbe/evaa269

Palmer-Young, E.C., Calhoun, A.C., Mirzayeva, A. ve Sadd, B.M., 2018. Effects of the floral phytochemical eugenol on parasite evolution and bumble bee infection and preference. Scientific Reports, 8, 2074.

Palsson, K., Jaenson, T.G.T., Bæckström, P. ve Borg-Karlson, A.-K. 2008. Tick Repellent Substances in the Essential Oil of Tanacetum vulgare. Journal of Medical Entomology, 45:1, 88-93.

Pandey, R.R. ve Kanduri, C. 2011. Transcriptional ve Posttranscriptional Programming by Long Noncoding RNAs. Đ. Ugarkovic (ed.), Long Non-Coding RNAs, Progress in Molecular ve Subcellular Biology, 51, 1-27.DOI 10.1007/978-3-642-16502-3_1

Paululat, A., Goubeaud, A., Damm, C., Knirr, S., Burchard, S. ve Renkawitz-Pohl, R. 1997. The Mesodermal Expression of rolling stone (rost) Is Essential for Myoblast Fusion in Drosophila and Encodes a Potential Transmembrane Protein. The Journal of Cell Biology, 138(2): 337–348.

Penalva-Arana, D.C., Lynch, M. ve Robertson, H.M. 2009. The chemoreceptor genes of the water flea Daphnia pulex: many GRs but no Ors.. BMC Evol. Biol, 9:79, .doi: 10.1186/1471-2148-9-79.

Pertea, M., Pertea, G.M., Antonescu, C.M., Chang, T.C., Mendell, J.T. ve Salzberg, S.L. 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. Nat. Biotechnol., 33, 290-295.

Peyrovi, M., Goldansaz, S.H. ve Jahromi, K.T. 2013. Using Ferula assafoetida essential oil as adult carob moth repellent in Qom pomegranate orchards (Iran). African Journal of Biotechnology, 10:3, .

Pham-Delegue, M.H., Bailez, O., Blight, M.M., Masson, C., Picard-Nizou, A.L. ve Wadhams, L.J., 1993. Behavioural discrimination of oilseed rape volatilers by the honeybee Apis mellifera L. Chemical Senses, 18, 5, 483-494.

Philippides, A., de Ibarra, N.H., Ribinina, O. ve Collett, T.S. 2013. Bumblebee calligraphy: the design and control of flight motifs in the learning and return flights of Bombus terrestris. The Journal of Experimental Biology, 216, 1093-1104. doi:10.1242/jeb.081455

Raguso, R.A. 2004. Why do flowers smell? The chemical ecology of fragrance-driven pollination. Advances in Insect Chemical Ecology, Cambridge University Press, ed. R. T. Carde ve J. G. Millar, 151-153.

Rasmont, P., Aytekin, A.M., Kaftanoğlu, O. ve Flagothier, D. 2009. The bumblebees of Turkey. Atlas Hymenoptera, Université de Mons, Gembloux Agro-Biotech, Mons, Gembloux, , , .http://www.atlashymenoptera.net/page.aspx??ID=103

Richgels, P.K. ve Rollmann, S.M. 2012. Genetic Variation in Odorant Receptors Contributes to Variation in Olfactory Behavior in a Natural Population of Drosophila melanogaster. Chem. Senses, 37: 229-240.

Riveros, A.J. ve Gronenberg, W. 2009. Olfactory learning and memory in the bumblebee Bombus occidentalis Naturwissenschaften, 96, 851-856. 10.1007/s00114-009-0532-y.

Robert, T., Frasnelli, E., Collett, T.S. ve de Ibarra, N.H. 2017. Male bumblebees perform learning flights on leaving a flower but not when leaving their nest. Journal of Experimental Biology, 220, 930-937.doi:10.1242/jeb.151126

Robertson, H.M. ve Wanner, K.W. 2006. The chemoreceptor superfamily in the honey bee, Apis mellifera: expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family.. Genome Res., 16(11), 1395-1403.

Romaine, S.P.R., Tomaszewski, M., Condorelli, G. vd. 2015. MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. Heart, 0, 1-8.

Rota-Stabelli, O., Daley, A.C. ve Pisani, D. 2013. Molecular timetrees reveal a Cambrian colonization of land ve a new scenario for ecdysozoan evolution. Current Biology, 23, 392-398.doi: 10.1016/j.cub.2013.01.026.

Rytz, R., Croset, V., Benton, R. 2013. Ionotropic receptors (IRs): chemosensory ionotropic glutamate receptors in Drosophila and beyond. Insect Biochemistry and Molecular Biology 43:888–897. doi: 10.1016/j.ibmb.2013.02.007

Sadd., B.M., Barribeau, S.M., Bloch, G., vd. 2015. The genomes of two key bumblebee species with primitive eusocial organization. Genome Biology, 16, 76.DOI 10.1186/s13059-015-0623-3

Sanchez BMG. 2011. Taste perception in honey bees. Chemical senses, 36, 675-692.

Sanchez, G.M., Alkhori, L., Hatano, E. vd. 2016. Hedgehog Signaling Regulates the Ciliary Transport of Odorant Receptors in Drosophila. Cell Rep.14(3):464-470. doi: 10.1016/j.celrep.2015.12.059.

Sasaki, Y., Araki, T. ve Milbrandt, J. 2006. Stimulation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthetic Pathways Delays Axonal Degeneration after Axotomy. The Journal of Neuroscience, 26(33):8484 – 8491.

Sato, K. ve Touhara, K. 2008. Insect Olfaction: Receptors, Signal Transduction, ve Behavior. Korsching S., Meyerhof W. (eds) Chemosensory Systems in Mammals, Fishes, ve Insects. Results ve Problems in Cell Differentiation, 47, 121-138.DOI: 10.1007/400_2008_10

Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vosshall, L.B. ve Touhara, K. 2008. Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. Nature, 452(7190), 1002-1006.

Satyavathi, V., Ghosh, R. ve Subramanian, S. 2017. Long Non-Coding RNAs Regulating Immunity in Insects. Non-coding RNA, 3:1, 14. doi:10.3390/ncrna3010014

Schmittgen, T.D. ve Livak, K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method Nature Protocols, 3(6): 1101-1108.

Scialo, F., Hansson, B.S., Giordano, E., Polito, C.L. ve Digillo, F.A. 2012. Molecular and Functional Characterization of the Odorant Receptor2 (OR2) in the Tiger Mosquito Aedes albopictus. Plos One, 7(5), e36538.

Semmelhack, J.L. ve Wang, J.W. 2009. Select Drosophila glomeruli mediate innate olfactory attraction and aversion. Nature, 459, 218-223.

Shanbhag, S. R., Müller, B. ve Steinbrecht R. A. 1999. Atlas of olfactory organs of Drosophila melanogaster 1. Types, external organization, innervation ve distribution of olfactory sensilla. International Journal of Insect Morphology ve Embryology, 28, 377-397.

Shang, L., Wang, Y., Wang, P., vd. 2010. Application of Rough Set Analysis in Species ve Caste Discrimination of Bumblebees (Hymenoptera: Apidae: Bombus) Based on Antennal Sensilla. Ann. Entomol. Soc. Am., 103:4, 654-660.

Shen, M., Szyszka, P., Deussen, O., Galizia, C.G. ve Merhof, D. 2015. Automated tracking ve analysis of behavior in restrained insects. J Neurosci Methods, 239, 194-205.doi:10.1016/j.jneumeth.2014.10.021

Si, G., Kanwal, J.K., Hu, Yu., vd., 2019. Structured odorant response patterns across a complete olfactory receptor neuron population. Neuron. 101(5):950–962.e7. doi:10.1016/j.neuron.2018.12.030.

Simpson, J.T., Wong, K., Jackman, S.D., vd. 2009. ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. Genome Res, 19, 1117-1123.

Simpson, S.J. 2005. Advances In Insect Physiology, Elsevier, 32, 74-98.

Singh, N.K., Eliash, N., Kamer, Y., Zaidman, I., Plettner, E. ve Soroker, V. 2015. The effect of DEET on chemosensing of the honey bee ve its parasite Varroa destructor. Apidologie, 46, 380-391.DOI: 10.1007/s13592-014-0330-1

Skovgaard, O.S. 1936. Redkloverens bestovning humblebier og humbleboer. Kgl. Danske Vidensk. Selsk. Skr. Naturvid. Math., 6, 1-140.

Sladen, F.W.L. 1912. The humble - bee, its Life History ve how to Domesticate it. Including the Humble bee (1892). Logaston Press, London.

Smith, C.U.M. 2009. Biology of Sensory Systems, Second Edition. John Wiley ve Sons Ltd, 87-112.

Söderbom, F. 2005. Small Nucleolar RNAs: Identification, Structure, ve Function. Nucleic Acids ve Molecular Biology (Ed) Wolfgang Nellen, Christian Hammann , 17, 31-56.

Spring, J.H., Robichaux, S.R., Hamlin, J.A. 2009. The role of aquaporins in excretion in insects. The Journal of Experimental Biology, 212, 358-362.

Steinbrecht, R.A.. 1996. Structure ve function of insect olfactory sensilla. "Novartis Foundation Symposium Edited by GregoIy R. Bock, Gail Cardew". 158-171.

Stork, N.E. 2018. How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? Annual Review of Entomology, 63(1): 31-45. doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043348

Suh, E., Bohbot, J. ve Zwiebel, L.J. 2014. Peripheral olfactory signling in insects. Curr. Opin. Insect Sci., 6, 86-92.doi:10.1016/j.cois.2014.10.006.

Sun, M. ve Kraus, W.L. 2015. From Discovery to Function: The Expanding Roles of Long NonCoding RNAs in Physiology ve Disease. Endocr Rev, 36(1): 25-64. doi: 10.1210/er.2014-1034

Sutton, G.P., Clarkea, D., Morleya, E.L. ve Roberta, D. 2016. Mechanosensory hairs in bumblebees (Bombus terrestris) detect weak electric fields. PNAS, 113:26, 7261-7265.

Suwannapong, G. ve Benbow, M. E. 2011. Biology of Insect odors: Source and Olfaction. Chapter, 5, 153-184.

Swarup, S., Williams, T.I. ve Anholt, R.R.H. 2011. Functional dissection of Odorant Binding genes in Drosophila melanogaster. Genes, Brain ve Behaviour, 10, 648-657.

Syed, Z. 2015. Chemical ecology ve olfaction in arthropod vectors of diseases. Current Opinion in Insect Science, 10, 83-89.

Syed, Z. ve Leal, W.S. 2008. Mosquitoes smell ve avoid the insect repellent DEET. PNAS, 105:36, 13598-13603.

Tadesse, T., Schmidt, M., Walthall, W.W., Tai, P.C. ve Derby, C.D. 2011. Distrubition ve function of splash, an achaetescute homolog in the adult olfactory organ of the Caribbean spiny lobster Panulirus argus. Developmental Neurobiology, 71, 316-335.doi: 10.1002/dneu.20862

Task, D., Lin, C-C., Afify, A. vd. 2020. Widespread Polymodal Chemosensory Receptor Expression in Drosophila Olfactory Neurons. bioRxiv, https://doi.org/10.1101/2020.11.07.355651.

Taub, F.E., DeLeo, J.M. ve Thompson, E. B. 2009. Sequential Comparative Hybridizations Analyzed by Computerized Image Processing Can Identify ve Quantitate Regulated RNAs. DNA, 2:4, 309-327.http://doi.org/10.1089/dna.1983.2.309

Teppner, H. 2005. Pollinators of Tomato, Solanum lycopersicum (Solanaceae), in Central Europe. Phyton, 45(2): 217-235.

Tetreau, G., Dittmer, N.T., Cao, X., vd. 2015. Analysis of chitin-binding proteins from Manduca sexta provides new insights into evolution of peritrophin A-type chitin-binding domains in insects. Insect Biochemistry ve Molecular Biology, 62, 12-141.https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.12.002.

Tkalcu, B. 1960. Sur l'hibernation des bourdons. Bull. Soc. Ent. Mulhouse, 96-97.

Tkalcu, B. 1961. Deuxieme contribution sur l'hibernation des Bourdons. Bull. Soc. Ent. Mulhouse, 105-106.

Tsitoura, P., Koussis, K. ve Iatrou, K. 2015. Inhibition of Anopheles gambiae Odorant Receptor Function by Mosquito Repellents. The Jour. Of Biol. Chem., 290:12, 7961-7972.DOI 10.1074/jbc.M114.632299

Velculescu, V.E., Zhang, L., Zhou, W., vd. 1997. Characterization of the Yeast Transcriptome. Cell, 2:88, 243-251.

Venthur, H. ve Zhou, J. J. 2018. Odorant Receptors ve Odorant-Binding Proteins as Insect Pest Control Targets: A Comparative Analysis. Front. Physiol., 9, 1163.doi: 10.3389/fphys.2018.01163

Verkman, A.S. 2013. Aquaporins. Current Biology, 23(2): R52–R55. doi:10.1016/j.cub.2012.11.025.

Vogt, R.G. ve Riddiford, L.M. 1991. Pheromone binding ve inactivation by moth antennae. Nature, 293, 161-163.

Vogt, R.G.. 2005. Molecular basis of pheromone detection in insects. In Comprehensive Insect Phsiology, Biochemistry, Pharmacology ve Molecular Biology, ed. Gilbert, L.I., Iatro, K., Gill, S. , 753- 804.

Vosshall, L.B. ve Hansson, B.S. 2011. A unified nomenclature system for the insect olfactory coreceptor. Chemical Senses, 36, 497-498.doi: 10.1093/chemse/bjr022

Vosshall, L.B., Wong, A.M. ve Axel, R. 1999. An Olfactory Sensory Map in the Fly Brain. Cell, 102:2, 147-159.https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00021-0

Wang, Z., Gerstein, M. ve Snyder, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet, 10, 57-63.https://doi.org/10.1038/nrg2484

Wanjuan, F., Tao, L., JunWei, Yu., vd. 2012. RAB-27 and its effector RBF-1 regulate the tethering and docking steps of DCV exocytosis in C. elegans. Science china, 55(3):228-235. doi: 10.1007/s11427-012-4296-9.

Watson, J. D., Baker, T.A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M. ve Losick, R. 2004. Molecular Biology of the Gene (Fifth ed.). San Francisco: Benjamin Cummings.

Weaver, S.C. ve Lecuit, M. 2015. Chikungunya Virus ve the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. N Engl J Med , 372, 1231-1239.

Wicher, D. 2012. Functional and evolutionary aspects of chemoreceptors. Frontiers in cellular neuroscience 6, 1-4.

Wicher, D., Schäfer, R., Bauernfeind, R., vd. 2008. Drosophila odorant receptors are both ligand-gated ve cyclic-nucleotide-activated cation channels. Nature, 452(7190), 1007-1011.

Wightman, B., Ha, I. ve Ruvkun, G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. Elegans. Cell, 75, 855-862.

Williams, P.H., Cameron, S.A., Hines, H.M., Cederberg, B. ve Rasmont, P. 2008. A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus Bombus). Apidologie, 39, 46-74.

Wojtasek, H. ve Leal, W.S. 1999. Conformational change in the pheromone-binding protein from Bombyx mori induced by pH ve by interaction with membranes. J. Biol. Chem., 274, 30950-56.

Wu, Y., Cheng, T., Liu, C., Liu, D., Zhang, Q., Long, R., Zhao, P. ve Xia, Q. 2016. Systematic identification ve characterization of long non-coding RNAs in the silkworm, Bombyx mori. Plos one, 11, e0147147.doi: 10.1371/journal.pone.0147147

Xie, Y., Wu, G., Tang, J., vd. 2014. SOAPdenovo-trans: de novo transcriptome assembly with short RNA-Seq reads. Bioinformatics, 30, 1600-1666.

Xu, P., Atkinson, R., Jones, D.N. ve Smith, D.P. 2005. Drosophila OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons.. Neuron, 45, 193-200.

Yang, S., Cao, D., Wang, G. ve Liu, Y. 2017. Identification of Genes Involved in Chemoreception in Plutella xyllostella by Antennal Transcriptome Analysis. Scientific Reports, 7, 11941.DOI:10.1038/s41598-017-11646-7

Yanochko, G. M. ve Yool, A. J. 2002. Regulated cationic channel function in Xenopus oocytes expressing Drosophila big brain. J. Neurosci. 22, 2530-2540.

Yao, C.A., Ignell, R. ve Carlson, J.R. 2005. Chemosensory Coding by Neurons in the Coeloconic Sensilla of the Drosophila Antenna. The Journal of Neuroscience, 25(37): 8359-8367.

Zhang, H., Huang, J., Williams, P.H., Vaissiere B.E., Zhou, Z., Gai, Q., Dong, J. ve An, J. 2015. Managed Bumblebees Outperform Honeybees in Increasing Peach Fruit Set in China: Different Limiting Processes with Different Pollinators. Plos one, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121143.

Zhao, C.L., Hui, Y., Wang, L. J., vd. 2017 T-complex-associated-testis-expressed 3 (TCTE3) is a Novel Marker for Pancreatobiliary Carcinomas. Human Pathology, doi: 10.1016/j.humpath.2017.10.010.

Zhou, Y., Wang, J., Wen, H., Kucherovsky, O. ve Levitan, I.B. 2002. Modulation of Drosophila Slowpoke Calcium-Dependent Potassium Channel Activity by Bound Protein Kinase A Catalytic Subunit. The Journal of Neuroscience, 22(10):3855–3863.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Tunç Dabak
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokunun.
Uyruğu	☑ T.C. ❒ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Hacettepe Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokunun.

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Zooloji

Makale ve Bildiriler