

Tesis Doctoral

El uso de información olfativa durante la recolección colectiva de recursos en la abeja *Apis mellifera*

Balbuena, María Sol

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Balbuena, María Sol. (2012). El uso de información olfativa durante la recolección colectiva de recursos en la abeja *Apis mellifera*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Balbuena, María Sol. "El uso de información olfativa durante la recolección colectiva de recursos en la abeja *Apis mellifera*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

El uso de información olfativa durante la recolección colectiva de recursos en la abeja *Apis mellifera*

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciada María Sol Balbuena

Director de Tesis: Profesor Dr. Walter M. Farina
Consejero de Estudios: Profesor Dr. Walter M. Farina

Lugar de trabajo
Grupo de Estudio de Insectos Sociales. IFIBYNE-CONICET. Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires 2012.

El uso de información olfativa durante la recolección colectiva de recursos en la abeja

Apis mellifera

RESUMEN

En insectos sociales como la abeja *Apis mellifera*, una eficiente recolección colectiva de recursos requiere de una precisa transferencia de información. La ubicación, productividad y tipo floral a explotar son esenciales para poder encontrar rápidamente el alimento descubierto. Las abejas combinan la transmisión de señales acústico-vibratorias y olfativas con la transferencia de información quimio-sensorial para alcanzar ese objetivo. En esta Tesis se evaluó la correlación entre las interacciones sociales que ocurren durante el reclutamiento hacia un nuevo tipo floral (nueva información olfativa) con las preferencias recolectoras de las abejas reclutadas. Se observó que el tipo de interacción más frecuente es el contacto corporal y que, incluso, no es necesario un contacto trofaláctico directo (transferencia de alimento boca a boca) con la reclutadora para que las abejas reclutadas arriben a la fuente de alimento señalada, como se sugería hasta el presente. Además, las abejas reclutadas mostraron una alta preferencia por aterrizar en los alimentadores que presentaron el mismo olor que el llevado por la danzarina. Por otro lado, con el fin de vincular semioquímicos cuticulares y actividad recolectora, se analizaron los perfiles de los compuestos cuticulares presentes en abejas recolectoras de néctar expuestas a fuentes de alimento de productividad variable. Estos perfiles variaron con la productividad de la fuente explotada, lo cual podría tener implicancias en el reclutamiento de nuevos individuos al sitio recolector. Además, se propuso desarrollar un bioensayo que permita cuantificar la sensibilidad quimiosensorial de abejas de colmena que pueden ser potencialmente activadas por abejas recolectoras a salir al exterior en busca de recursos. Estas abejas fueron capturadas en la colmena y tanto sus umbrales de respuestas al azúcar como sus respuestas espontáneas a olores cuantificadas. Finalmente, se estudió el rol de las experiencias olfativas, adquiridas a edades pre recolectoras dentro de la colmena, sobre el subsiguiente proceso de reclutamiento. Estos resultados indican que las memorias de abejas que aprendieron la asociación olor-recompensa dentro de la colmena, durante el desempeño de tareas de colmena, no relacionadas con la recolección, pueden ser evocadas incluso 8 días después de haber ocurrido el aprendizaje olfativo. En resumen, la transferencia y propagación de información referida al recurso afectaron a distintos grupos operativos de obreras, incluso a los que no estaban involucrados en la recolección. Esto permite suponer que la información floral puede persistir por periodos prolongados dentro de la colonia. A partir de estos resultados se concluye que la abeja *Apis mellifera* resulta un buen modelo para evaluar el establecimiento de información social a corto y largo término.

Palabras clave: *Apis mellifera*, aprendizaje asociativo, comunicación, memoria olfativa, experiencias tempranas, sensibilidad quimiosensorial, lípidos cuticulares.

Olfactory information use during collective resource gathering in the honeybee

Apis mellifera

ABSTRACT

Social insects such as the honey bee *Apis mellifera* rely on accurate information transfer to collectively achieve an efficient gathering of resources. Location, productivity and floral type are essential for finding known food sources rapidly. Honey bees achieve this by combining the transmission of acoustic-vibratory and olfactory cues with the transfer of quimio-sensory information. In this thesis, the correlation between social interactions during recruitment involving new olfactory information and the gathering preferences of the recruited bees was studied. The most frequent type of interaction resulting of recruitment to a novel food source was found to be body contact with the recruiter. This is contrary to what had been previously suggested, direct trophallactic contact (mouth to mouth food transfer) is apparently not necessary. Recruited honey bees showed high preference for landing on feeders that presented the same odor as that borne by the dancer. I also analyzed the profiles of cuticular compounds present in bees from sources with different productivity, aiming to relate recruitment activity with cuticular semiochemicals. These cuticular profiles varied with the productivity of the exploited food source. This could have an effect on the recruitment of new individuals to the gathering site. Furthermore, I proposed the development of a bioassay to quantify the quimiosensory sensitivity of hive bees, taken as the likelihood to leave the hive in search of resources due to activation by foragers. Hive bees were captured and their sugar response thresholds and spontaneous response to odors quantified. Finally, I studied the role of olfactory experiences, acquired inside the hive at preforaging ages in the recruitment process. The results imply that odor-reward associative memories established inside the hive whilst carrying out hive tasks unrelated to gathering can be evoked even 8 days after the olfactory learning occurs. In summary, transfer and propagation of information related to the resource affected different operative groups of worker bees, even those that were not involved in food gathering. Thus, it can be assumed that floral information can persist for prolonged periods inside the colony. In conclusion, the honeybee *Apis mellifera* is an excellent model for the study of short and long term establishment of social information.

Keywords: *Apis mellifera*, associative learning, communication, olfactory memory, early experiences, chemosensory responsiveness, cuticular lipids.

Agradecimientos

En primer lugar, gracias a mis viejos. Sin ellos no hubiera llegado hasta acá. Sin mi papá que fomentara mi curiosidad, el ir a ver bichitos de cerca y explicarme de qué se trataba. A mi mamá, por enseñarme la perseverancia y la paciencia que hay que tener para intentar hacer las cosas prolijas y darle para adelante. ¡Gracias a los dos por el esfuerzo conjunto!

A Noe, ni en sueños me pudo haber tocado una hermana mejor. Una mejor amiga, compañera, una parte de mí que sin ella estaría perdida. Gracias por hacerme mejor persona e iluminar mi vida.

A mi familia: abuelos, tíos, primos. Si se trataba de pedir algún deseo, era que mis abuelos pudieran verme en los pasos importantes de mi vida, como es hoy esta Tesis. No me alcanzan las palabras para agradecer poder compartir tantas cosas con ellos. En esta parte, no puedo dejar de agradecer especialmente a otras dos personitas que son de estar al pie del cañón: Ale y Pía, ¡gracias niñas!

A Mario, por el día a día. Una persona escribiendo una tesis puede convertirse en una bomba de tiempo.

A mis amigos. Por orden alfabético, porque son todos mejores amigos: Ari, Chucho, la Dra, Lore, Martu, Pepa (y la Belusita en camino) y Viñas. Sin amigos, todo se torna más aburrido y solitario. Otra vez no hay palabras que alcancen para agradecer cruzarse con personas como ustedes. Gracias y más gracias, chicos.

A Axel y Karen por la admiración mutua y el cariño. Yo también quisiera que Mercedes estuviera acá viéndonos crecer.

Y ahora sí, los correspondientes agradecimientos académicos, no menos importantes ni sentidos que los anteriores:

En primer lugar y sin dudarlo, GRACIAS a Walter. Gracias por darme un lugar en el laboratorio, en tu grupo de trabajo. Gracias por mostrar que se puede hacer ciencia con poco y que se puede llegar lejos. Gracias por apostar a este combo que soy y seguir haciéndolo. Gracias por el espacio, por la confianza y por estar, sobre todo ¡gracias por estar!

En segundo lugar, a Tito porque además de enseñarme sobre abejas, me enseñó que se puede ser generoso en ciencia, gracias por la amistad. A Andresuti, por estar siempre dispuesto a dar una mano, por ser un cable a tierra, por motorizar a hacer cosas nuevas. Por ser compañerito de mesada y, sobre todo, una gran persona.

Gracias a Andrés González por recibirme en tu laboratorio, por la paciencia porque menos química no puedo tener. Por apostar con nosotros en un tema que nos era sumamente novedoso. Por largas horas de discusión y charla por chat.

¡Gracias a los INSSOC de ayer y de hoy! Gracias: Roxy, Agus, Andre, Tito, Sofi, Vane, Paula, Gonzalo, Gabi, Ay Gigita Gigita, Fran, Caro, Anita, Alina, JuanPe y Cinthia. Gracias porque encontré buenos compañeros de trabajo y crecí en eso de “trabajar en grupo”. Y sobre todo, gracias a los buenos amigos en que nos hemos convertido con muchos de ustedes. Porque es fundamental tener ganas de levantarse y andar y, en los días en que faltan un poco esas ganas, es esencial llegar al laboratorio y encontrarte con amigos que te den vientos de aliento. Y gracias a “No estoy para estos trotes”, el mejor quita-estrés de todos los tiempos.

A mis abuelos, que son el principio de todo.

A mis viejos, sin ustedes hubiera sido imposible.

A Noe, por hacer más felices mis días. ¡Te amo, sista!

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1.1 LA ABEJA <i>APIS MELLIFERA</i>	1
1.1.1 ORGANIZACIÓN DE LA COLONIA	2
1.1.2 RECOLECCIÓN DE RECURSOS	5
1.1.3 IMPORTANCIA DE LA PERCEPCIÓN OLFATIVA EN LA VIDA SOCIAL DE LA COLMENA	9
1.2 LA DANZA DE LAS ABEJAS	11
1.3 COMPUESTOS CUTICULARES EN <i>APIS MELLIFERA</i>	16
1.4 APRENDIZAJE Y MEMORIA	18
1.4.1 APRENDIZAJE ASOCIATIVO	19
1.4.2 LA FORMACIÓN DE LA MEMORIA EN <i>APIS MELLIFERA</i>	23
1.5 OBJETIVOS E HIPÓTESIS	25
RECLUTAMIENTO DE LA ABEJA MELÍFERA A FUENTES DE ALIMENTO AROMATIZADAS: CORRELACIONES ENTRE LAS INTERACCIONES SOCIALES DENTRO DEL NIDO Y LAS DECISIONES RECOLECTORAS	28
2.1 INTRODUCCIÓN	28
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.2.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	31
2.2.2 SITUACIÓN SIN OLOR (DÍAS 1 Y 2)	32
2.2.3 SITUACIÓN CON OLOR (DÍA 3)	34
2.2.4 OBSERVACIONES COMPORTAMENTALES	35
2.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
2.3 RESULTADOS	37
2.4 DISCUSIÓN	44
VOLÁTILES CUTICULARES EN LAS ABEJAS RECOLECTORAS DE NÉCTAR Y SUS VARIACIONES CON LA PRODUCTIVIDAD DE LA FUENTE DE ALIMENTO	49
3.1 INTRODUCCIÓN	49
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.2.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	52
3.2.2 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN	54
3.2.3 ANÁLISIS QUÍMICO	54
3.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	55
3.3 RESULTADOS	58
3.4 DISCUSIÓN	64

LOS UMBRALES DE RESPUESTA A ESTÍMULOS QUIMIOSENSORIALES EN EL CONTEXTO DE LA DANZA DE RECLUTAMIENTO	66
4.1 INTRODUCCIÓN	66
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	69
4.2.1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	70
4.2.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74
4.3 RESULTADOS	74
4.4 DISCUSIÓN	77
LOS AROMAS FLORALES APRENDIDOS DENTRO DE LA COLMENA TIENEN UN EFECTO A LARGO TÉRMINO EN EL RECLUTAMIENTO	80
5.1 INTRODUCCIÓN	80
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	83
5.2.1 SITIO DE ESTUDIO Y ANIMALES	84
5.2.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	85
5.3.3 OBSERVACIONES COMPORTAMENTALES	88
5.3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	89
5.4 RESULTADOS	90
5.4.1 SEGUIMIENTO DE DANZA Y EXPERIENCIAS PREVIAS	90
5.4.2 ARRIBOS	93
5.5 DISCUSIÓN	95
CONCLUSIONES GENERALES	102
7. BIBLIOGRAFÍA	107

1

Introducción

1.1 La abeja *Apis mellifera*

Apis mellifera es una de las especies de abejas con mayor distribución en el mundo (Michener 1974), perteneciente al grupo de los insectos que exhiben un alto grado de sociabilidad (eusocialidad). Es decir, presentan división reproductiva del trabajo, cooperación en el cuidado de cría y solapamiento de generaciones capaces de contribuir en la labor social. Dentro de los nidos de estos insectos, se realizan actividades con un alto grado de coordinación que involucran a un gran número de individuos. Así, el éxito en las tareas realizadas en estas sociedades animales, dependerá no sólo de la eficacia individual sino también de la tarea coordinada de todos los individuos involucrados (Wilson 1971, Núñez 1982).

Para lograr esta coordinación, es imprescindible que haya una precisa transferencia de información entre individuos. En este sentido, las abejas melíferas cuentan con sofisticados sistemas de comunicación en donde se evidencia la transmisión

simultánea de señales acústico-vibratorias y olfativas, como es el caso de la bien conocida y estudiada Danza de la Abejas (von Frisch 1967, Seeley 1995, Thom *et al.* 2007, Grüter y Farina 2009; para su descripción ver más adelante). Además, dentro del nido, estos insectos establecen una enorme cantidad de interacciones interindividuales como ser contactos corporales, antenales y boca a boca (trofalaxia), los cuales les permiten intercambiar información fundamentalmente relacionada con los recursos obtenidos en el exterior (von Frisch 1967, Farina y Grüter 2009).

1.1.1 Organización de la colonia

Como se mencionó previamente, las abejas *Apis mellifera* son insectos eusociales, es decir, presentan una división reproductiva del trabajo: dentro de la colonia existen castas reproductivas (individuos con el aparato reproductor desarrollado y capaces de dejar descendencia fértil, la reina y los zánganos) e individuos adultos de la casta no reproductiva (las obreras) que cooperan en el cuidado de cría. Por otro lado, las distintas generaciones se solapan contribuyendo en la labor social (Wilson 1971).

Una típica colonia de abejas melíferas está constituida por 10-40 mil abejas obreras, todas ellas hembras; y desde ninguno a varios cientos de machos (zánganos), dependiendo la época del año; y una única reina, o hembra fértil (Winston 1987) (Figura 1.1).

La reina es el único individuo de la colonia capaz de poner huevos fecundados y es la principal responsable de mantener la cohesión de la estructura colectiva a través de sus feromonas. Los zánganos representan el otro grupo reproductivo, cuyo rol consiste en aparearse con reinas vírgenes de otras colonias, después de lo cual mueren. El tercer grupo, la casta de hembras estériles, está representado por las obreras. Esta casta muestra un alto grado de coordinación y, a su vez, de descentralización en la realización de tareas dentro y fuera del nido (Lindauer 1952, Winston 1987, Seeley 1995).

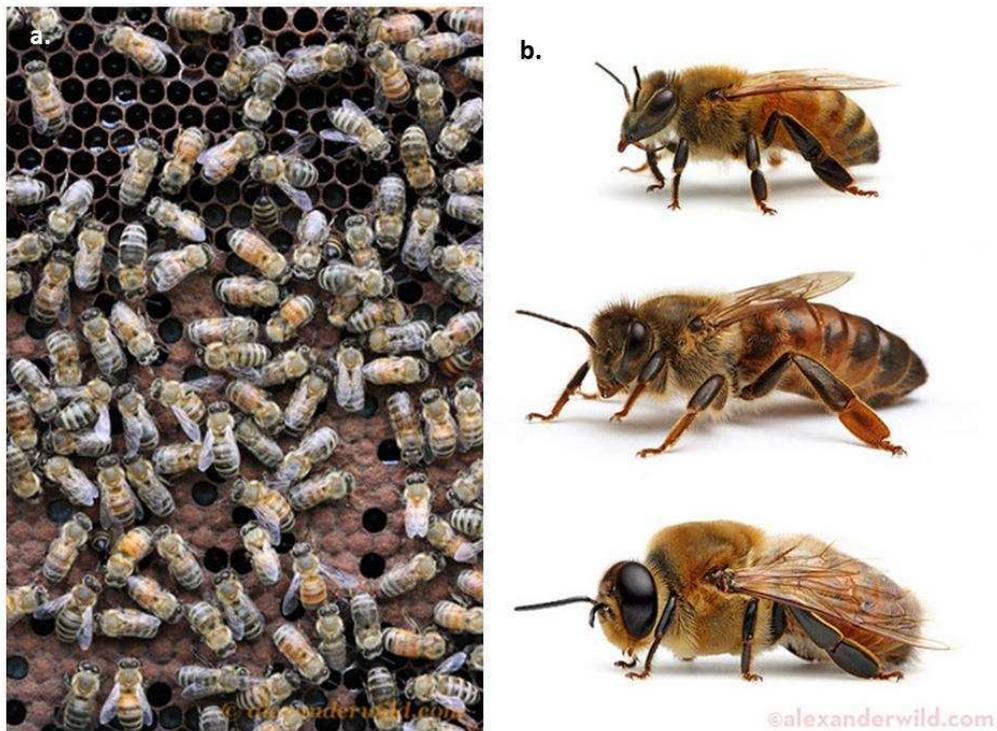


Figura 1.1. a) Abejas obreras, la casta más numerosa. b) Castas. De arriba hacia abajo: abeja obrera, reina y zángano.

Durante los primeros días de vida adulta, la abeja obrera desempeña actividades en el interior del nido tales como *limpiar de celda*, tarea que consiste en limpiar y pulir celdas de cría recientemente liberadas. Cuando alcanza los 3 días de edad, puede comenzar a realizar actividades como *nodriza*, alimentando a la cría, además de realizar otras tareas como atender a la reina, sellar celdas y acicalar y alimentar a compañeras de nido. Este patrón de comportamiento continúa por los siguientes 10 días. En este punto, la obrera deja el centro del nido (donde está la cría) para trabajar en la periferia, en la región de almacenamiento de alimento de la colmena. Aquí, ella comienza a *procesar el alimento*, moviéndose desde la entrada de la colmena hasta las celdas superiores: recibe néctar de las abejas recolectoras que regresan, lo convierte en miel y la deposita en las celdas de reserva de alimento. Además, coloca el polen en celdas, ventila la colmena agitando las alas, colabora con las guardianas en la entrada de la colmena y continúa acicalando y alimentando a sus compañeras de nido. Finalmente, a partir de los 20 días de edad y hasta el final de su vida, la obrera se dedica a la recolección, colectando néctar, polen, agua o alguna combinación de esas sustancias (Park 1925, Lindauer 1952, Seeley 1982) (Figura 1.2).

Es importante subrayar que las actividades de las obreras se ajustan de acuerdo a las necesidades de la colonia y estas necesidades pueden variar enormemente dependiendo de las condiciones tanto dentro como fuera de la colmena (Seeley 1995, Robinson 1992).

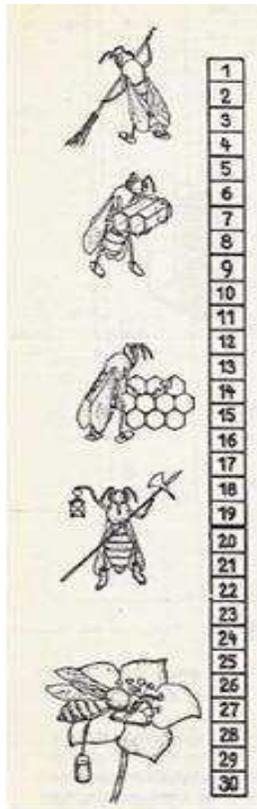


Figura 1.2. División de tareas en la abeja obrera según Lindauer (1952). Alrededor de los 17 días de vida las obreras comienzan con las tareas fuera del nido.

1.1.2 Recolección de recursos

El alto grado de adaptación de las abejas melíferas a los tan variados ambientes del planeta en que habitan, se vincula, en gran medida, a sus estrategias individuales y colectivas para la obtención de recursos (Núñez 1982). El néctar y el polen son sus principales fuentes de energía. Mientras que el néctar provee hidratos de carbono, el

polen es un recurso rico en proteínas, lípidos, vitaminas, minerales e, incluso, puede ofrecer azúcares (Baker 1975, Kears y Inouye 1993). Estos recursos se recolectan, en su gran mayoría, desde las flores y son almacenados en el interior del nido para luego ser utilizados durante el otoño e invierno, cuando las flores ya no están disponibles o lo están en una proporción muy baja.

Como ya hemos mencionado, la búsqueda y recolección de alimento de una colonia de abejas es un proceso bien coordinado que requiere de la transferencia de información entre sus miembros para que resulte eficiente. En este sentido, las claves olfativas juegan un rol muy importante durante la recolección de recursos como el néctar.

Durante los vuelos de recolección, las abejas aprenden claves olfativas de las flores que visitan, lo que les permite orientarse y encontrar el recurso en los sucesivos ciclos recolectores (von Frisch 1923, Lindauer 1961, Seeley 1995). Sin embargo, esta información no es utilizada exclusivamente por las abejas recolectoras que conocen la floración, sino también por sus compañeras de nido, que pueden percibir esas claves ambientales, incluso, dentro de la colmena. Es decir, cuando las recolectoras regresan a la colmena y descargan el alimento recolectado, sus compañeras de nido pueden adquirir la información olfativa del recurso recientemente descubierto. Este parece ser el caso del néctar que se transfiere de manera directa a otros individuos de la colonia por contactos boca a boca (trofalaxia) (Farina *et al.* 2005, 2007) (Figura 1.3).

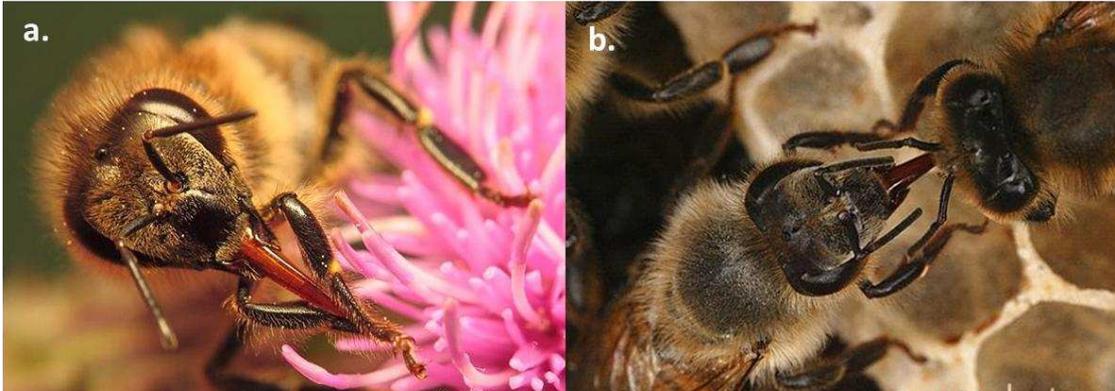


Figura 1.3. a) Abeja recolectora. b) Abejas transfiriéndose alimento boca a boca (trofalaxia) dentro de la colmena.

Por otro lado, si las recolectoras regresan de una fuente de alimento rica en néctar o polen, suelen desplegar entre sus compañeras un comportamiento estereotipado: la danza de contoneo (von Frisch 1967). La misma consiste en un recorrido recto, durante el cual se emiten señales acústico-vibratorias, e intervalos de caminatas circulares para retomar el patrón inicial. Este patrón locomotor conspicuo varía según la distancia y dirección a la que se encuentre la fuente de alimento explotada. Así, la danza ha sido considerada como una señal multicomponente que (i) atrae a las abejas del entorno a que puedan recibir otros tipos de información, (ii) informa sobre la presencia de fuentes de alimento abundantes; (iii) activa memorias espaciales en seguidoras de danza, (iv) facilita la adquisición de información sobre olores florales y (v) indica la localización de la fuente

de alimento en términos de dirección relativa al sol y distancia desde la colmena (von Frisch 1965, Riley *et al.* 2005, Thom *et al.* 2007, Grüter y Farina 2009).

Por todo lo visto, la colmena podría ser comparable a un centro de información en donde los individuos comparten y comparan las características de las distintas fuentes de alimento que están siendo explotadas en un determinado momento. A partir de esto, las recolectoras desempleadas pueden ser reclutadas hacia nuevas fuentes de alimento o las recolectoras activas pueden ser estimuladas a cambiar hacia otras fuentes más productivas. A pesar de que una obrera podría recolectar alimento en un mismo lugar y desde una única fuente durante toda su vida, en la mayoría de los casos cada abeja visita diferentes lugares y aprende variadas claves florales según se actualiza la información dentro del nido (Biesmajer y Seeley 2005).

Al descubrirse un nuevo recurso en el exterior, por ejemplo una nueva fuente de néctar, este alimento líquido se distribuye dentro del nido rápidamente (Nixon y Ribbands 1952). Los olores diluidos en el néctar pueden ser aprendidos no sólo por abejas maduras para desarrollar tareas en el exterior, sino también por abejas jóvenes que, aún envueltas en tareas dentro del nido, reciben el néctar aromatizado (Grüter *et al.* 2006). Estas memorias que se establecen de forma asociativa, podrían modificar las preferencias recolectoras de abejas jóvenes cuando comiencen a realizar tareas en el exterior del nido.

1.1.3 Importancia de la percepción olfativa en la vida social de la colmena

Considerando la numerosa cantidad de olores que circulan en su interior, las colmenas de *Apis mellifera* son el ámbito en donde se conforma el primer universo perceptual olfativo de cada individuo. En este contexto, las abejas obreras pueden aprender olores vinculados a recompensa (Farina *et al.* 2005, Gil y De Marco 2005, Grüter *et al.* 2006, Farina *et al.* 2007) que afectan comportamientos que son importantes para el éxito de recolección (von Frisch 1967; Goyret y Farina 2005). En este sentido, Arenas y colaboradores (2007, 2008) han encontrado que cuando se ofrece alimento aromatizado dentro de la colmena, las preferencias recolectoras de las abejas se sesgan al buscar recursos, situación que persiste durante varios días. Por su parte, Grüter y colaboradores (2009) han reportado que la información floral olfativa aprendida dentro de la colmena puede ser potencialmente recordada por más de 10 días luego de haber ocurrido la adquisición de ese olor recompensado.

Sin embargo, dentro de las colmenas de abejas melíferas, no todo el alimento recolectado se encuentra accesible para todos los individuos. Por lo cual, la presencia de volátiles asociados a recursos recolectados bien podría afectar procesos cognitivos ulteriores en los individuos. Por ejemplo, este efecto podría observarse mediante una mejora en las capacidades cognitivas de naturaleza asociativa al presentarse ese olor floral (Giurfa 2003).

Dada la importancia de las claves olfativas para localizar una fuente de alimento, las estrategias de reclutamiento dentro del nido involucran no sólo la transferencia del

vector de información de la danza de contoneo, sino también a la transferencia de claves olfativas que pueden tener un efecto positivo en la performance de colonias de abejas (Kirchner y Grasser 1998; Reinhard y Srinivasan 2009; Grüter y Farina 2009a). Cuando una recolectora exitosa retorna con néctar a la colmena, lleva consigo el olor del recurso explotado (von Frisch 1967). Esta clave de olor actúa como attractante o guía de orientación para sus compañeras de nido mientras la recolectora camina o danza sobre el panal (von Frisch 1967; Díaz *et al.* 2007, Grüter y Farina 2009b). Las partículas de olores florales impregnados en el cuerpo de las recolectoras así como en las cargas de polen que llevan en las patas posteriores, pueden ser percibidas por otras recolectoras. Mientras los olores llevados en el cuerpo de la recolectora pueden disiparse durante el vuelo, el olor del néctar preservado en el buche se mantiene intacto a pesar de la distancia del vuelo (von Frisch 1967). Durante las maniobras de danza, la información de distancia y dirección transferida es percibida sólo por las seguidoras de danza, mientras que la información gustativa y olfativa acerca de la fuente de néctar descubierta puede ser adquirida por una audiencia mucho mayor. Ha sido demostrado que una vez que el néctar fresco entra a la colmena, su distribución puede ser rápida y extensiva entre los miembros de la colonia (Nixon y Ribbands 1952; DeGrandi-Hoffman y Hagler 2000; Grüter y Farina 2007). En este sentido, señales quimiosensoriales del néctar como ser los olores florales y la calidad del alimento, proveen a la colonia con información global acerca de las fuentes disponibles, teniendo un potencial efecto sobre la mayoría de los miembros de la colonia y proveyéndolos de información acerca de las oportunidades de recolección actuales

(Pankiw *et al.* 2004; Grüter *et al.* 2006, 2009), la cual puede ser utilizada durante la búsqueda y recolección de alimento fuera de la colmena.

Dentro de la colmena, el olor del alimento almacenado puede causar una respuesta condicionada en recolectoras inactivas que conocen ese olor de viajes de recolección previos. Luego de percibir el olor familiar, esas recolectoras a menudo dejan el nido y vuelan a los sitios de alimentación donde el olor fue aprendido por primera vez (von Frisch 1923; Ribbands 1954, Reinhard *et al.* 2004). De esta manera, recolectoras inactivas usan la percepción del olor floral dentro de la colmena como una predicción de la reaparición de su fuente de alimento (von Frisch 1923, 1967; Ribbands 1954; Wenner *et al.* 1969; Reinhard *et al.* 2004).

1.2 La danza de las abejas

Cuando una abeja descubre un parche floral rentable en el campo, regresa al nido y comparte el alimento recolectado con sus compañeras. Durante o después de la descarga del alimento, la abeja puede realizar una serie de movimientos de contoneo repetitivos sobre la cera. La primera persona en analizar en detalle este conspicuo despliegue y decodificar que las abejas realizan este comportamiento a fin de comunicar información acerca de la ubicación de la fuente de alimento descubierta a sus compañeras de nido, fue Karl von Frisch durante las primeras décadas del siglo XX (Figura 1.4).

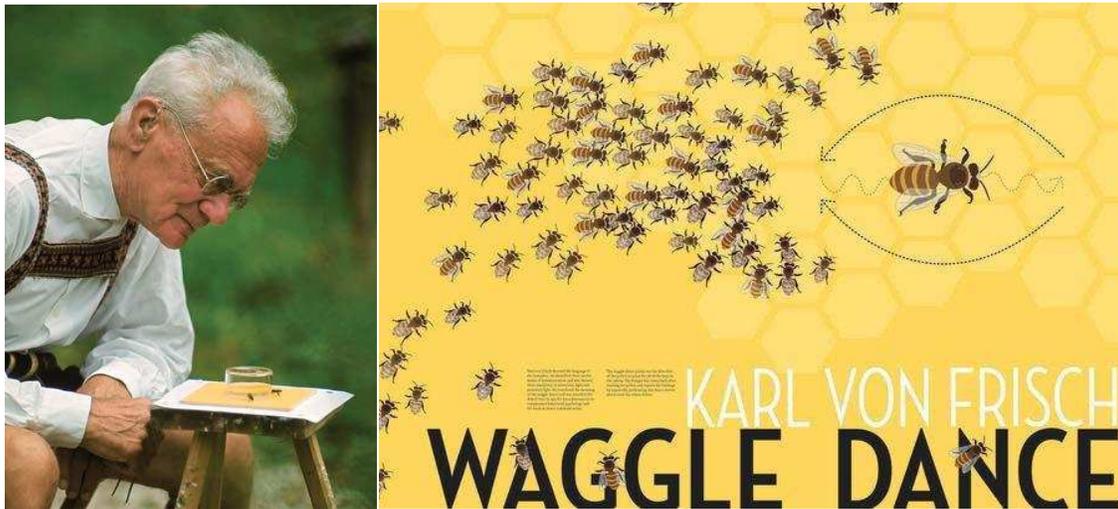


Figura 1.4. Karl von Frisch (1886-1982). Premio Nobel de Fisiología y Medicina 1973. En la fotografía de la izquierda, se lo puede observar en uno de sus experimentos, adiestrando abejas a un alimentador artificial. A la derecha, imagen representativa de su estudio de la danza de contoneo (waggle dance) de las abejas.

Se han descrito varios patrones motores que se pueden categorizar como la danza de las abejas, pero se definen a continuación a los dos recorridos más conspicuos y conocidos: la danza circular y la danza de contoneo (Figura 1.5). La danza circular es la más simple y no comunica información precisa de distancia, aunque se sugiere que podría indicar dirección (Kirchner *et al.* 1988, Gardner *et al.* 2008), informando a las obreras que hay una fuente de alimento próxima al nido, a menos de 15m de distancia. La danzarina realiza repetidamente pequeños círculos, cambiando de dirección luego de completar cada círculo, de manera que las reclutadas salen en busca de la fuente de alimento en las

inmediaciones del nido. Estas maniobras están acompañadas por vibraciones torácicas que no muestran un patrón muy regular (von Frisch 1967).

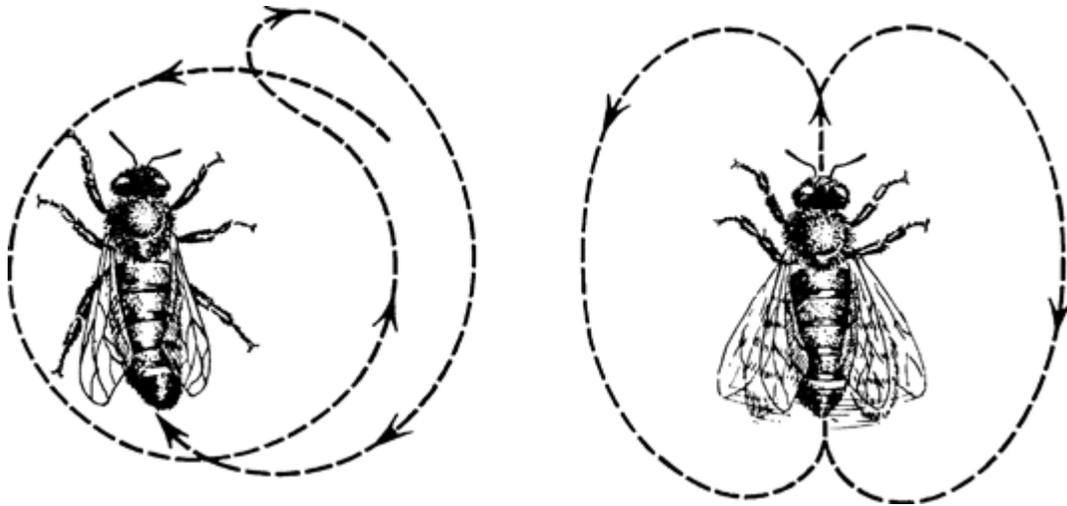


Figura 1.5. Tipos de danza. A la izquierda, la danza circular. A la derecha, la danza de contoneo.

Durante la danza de contoneo, las abejas realizan un despliegue estereotipado que consiste en una caminata hacia adelante en línea recta por una distancia corta, mientras el abdomen es sacudido intensamente de un lado a otro (fase de contoneo) a aproximadamente 15 ciclos por segundo generando vibraciones que oscilan entre 220-260 Hz (Esch 1962, Hrnir *et al.* 2011). Al final de cada tramo recto, la abeja dobla en una dirección y realiza un semicírculo para regresar al punto de partida, seguido por otro tramo recto y un semicírculo en dirección opuesta (Figura 1.5). La duración de la fase de

contoneo brinda información acerca de la distancia a la que se encuentra la fuente de alimento descubierta; mientras que la orientación del cuerpo de la danzarina respecto a la gravedad, provee información sobre la dirección en la que está la fuente de alimento (von Frisch 1967) (Figura 1.6). Este complejo patrón motor tiene lugar no sólo cuando las abejas descubren una fuente rentable de néctar sino también cuando son encontradas fuentes de polen o agua (von Frisch 1967) o potenciales sitios de anidamiento (Lindauer 1955, Seeley 1995).

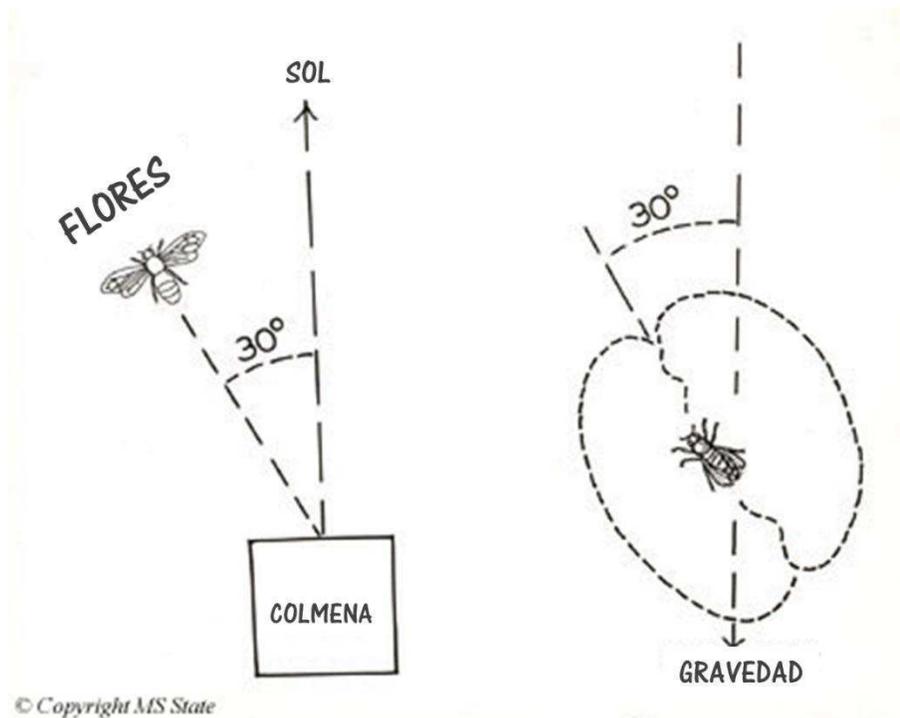


Figura 1.6. Danza de contoneo. Se muestra la orientación de una danza de contoneo en un panel vertical, relativa a la dirección de la fuente de alimento (flores). Las flores se encuentran a 30° a la izquierda del sol, la danza es a 30° respecto al eje vertical (gravedad).

Como en la danza circular, durante la danza de contoneo, la danzarina se detiene y distribuye alimento que regurgita desde su buche a las obreras cercanas; y la danza por sí misma es seguida de cerca por un séquito de obreras con sus antenas extendidas (von Frisch 1967, Rohrseitz y Tautz 1999). La intensidad con que una abeja recolectora dance, depende de la productividad de la fuente explotada. Por ejemplo, una abeja que recolecte néctar con una alta concentración de azúcar danzará con mayor intensidad (vibraciones abdominales mucho más pronunciadas) que aquella que regrese de una fuente menos rica. La eficacia de este incremento en la intensidad de danza se evidencia por el número mayor de visitas de abejas reclutadas a la fuente de alimento (von Frisch 1967, Farina 1996, Seeley *et al.* 2000, Hrnir 2011) indicada.

En las abejas melíferas, un alto contenido de azúcar indica una alta productividad de la fuente de alimento y, esta productividad, influye en la motivación de las abejas para salir en vuelos de recolección (von Frisch 1967), entendiéndose “motivación” como cambios reversibles en el estado interno del animal que están relacionados con cambios en el nivel de respuesta frente a estímulos externos, por ejemplo, en las abejas, cambios en la capacidad de respuesta frente a situaciones de recompensa diferente (Núñez y Giurfa 1996).

A su vez, se ha visto que la rentabilidad de la fuente de alimento no sólo tiene efecto sobre la intensidad de danza sino también sobre la temperatura torácica (T_{tx}) de la abeja recolectora. Es decir, la calidad del alimento influye sobre la T_{tx} de las danzarinas (Stabentheiner y Hangmüller 1991, Stabentheiner 1991): individuos que explotan una fuente de alimento que ofrece alta concentración de azúcar presentan una temperatura

torácica más elevada que aquellos que se enfrentan a una fuente de alimento pobre (Stabentheiner 2001). Este incremento en la T_{tx} se da tanto en la fuente (Stabentheiner y Schmaranzer 1986; Schmaranzer y Stabentheiner 1988; Waddington 1990) como dentro de la colmena (Stabentheiner 1991; Stabentheiner y Hangmüller 1991, Farina y Wainelboim 2001). Respecto a esto último, se han planteado al menos dos explicaciones con significancia biológica: por un lado, una alta temperatura corporal y de los músculos de vuelo pueden acortar el ciclo de recolección por un aumento general en la actividad (von Frisch 1967) y un incremento en la velocidad de vuelo hacia la fuente de alimento (von Frisch y Lindauer 1955) con el propósito de explotarla más rápidamente. Por otro lado, la temperatura del cuerpo podría proveer algún tipo de información acerca de la fuente de alimento, por ejemplo, su productividad (Stabentheiner y Hagnmüller 1991).

1.3 Compuestos cuticulares en *Apis mellifera*

Como hemos visto en la sección anterior, la calidad de la fuente de alimento tiene efecto sobre la intensidad de danza y la temperatura corporal de las abejas recolectoras. Thom y colaboradores (2007) han encontrado que abejas que realizan la danza de contoneo, producen y liberan compuestos volátiles característicos (hidrocarburos), subcutáneos y que no se almacenan en glándulas, que incrementan la actividad recolectora. Los mismos se encuentran en cantidades significativamente altas en los abdómenes de las danzarinas

y en el aire de su entorno próximo. Mientras que las recolectoras que retornan de la misma fuente de alimento pero no danzan, producen esas sustancias en mínimas cantidades. Al inyectar en la colmena la mezcla sintética de los compuestos antes mencionados, se registró un incremento en el número de abejas recolectoras que abandonaron la colmena. Los resultados sugieren que estos hidrocarburos actúan como semioquímicos (compuestos químicos que median interacciones entre dos organismos) en sinergismo con la danza, en el reclutamiento de abejas recolectoras hacia una fuente de alimento conocida (Gilley *et al.* 2011).

Por otro lado, se sabe que en insectos sociales como *Apis mellifera*, los hidrocarburos cuticulares juegan un papel importante como semioquímicos involucrados en el reconocimiento de especie, compañeros de nido (Smith y Breed 1995), de casta (Kather *et al.* 2011) y de parentesco (Howard y Blomquist 1982; Howard 1993; Breed *et al.* 1994; Breed 1998; Singer 1998; Vander Meer *et al.* 1998). El reconocimiento de compañeros de nido y defensa de colonia es llevado a cabo, mayormente, por las abejas guardianas (Butler y Free 1952), las cuales tocan con las antenas a las abejas que se aproximan a la entrada del nido para identificarlas. En este sentido, se ha sugerido que los compuestos relevantes tienen una volatilidad relativamente baja y que sólo puede ser percibida por contacto (Free 1987). Sin embargo, Kalmus y Ribbans (1952) mostraron que abejas recolectoras pueden distinguir entre compañeras de nido y aquellas que no lo son, en la fuente de alimento y sin mediar contacto, sugiriendo que los compuestos involucrados se transmiten por aire.

En lo referido a las castas, también se han encontrado diferencias en los niveles de determinados hidrocarburos cuticulares (n-alcanos, por ejemplo) que presentan las abejas recolectoras, comparado con lo encontrado en abejas nodrizas y recién emergidas (Kather *et al.* 2010). Por su parte, Schmitt y colaboradores (2007) realizaron una descripción de los volátiles cuticulares producidos y liberados por abejas recolectoras durante la visita a una fuente de alimento, reportando la presencia de alcanos y alquenos en su mayoría. Es posible que, al igual que lo encontrado por Thom y colaboradores (2007), la liberación de estos volátiles cuticulares en la fuente de alimento, esté relacionada con cambios en la temperatura corporal que adquiere la abeja según la productividad de la fuente que está siendo explotada.

1.4 Aprendizaje y memoria

El entorno perceptual de los animales presenta una matriz compleja de estímulos de la que deben aprender cuáles pueden ser útiles para sobrevivir. En ese marco, las experiencias previas permiten diferenciar los estímulos relevantes de aquellos que no lo son. De esta manera, la habilidad de aprender se encuentra en casi todos los animales y es a través del aprendizaje asociativo que pueden extraer reglas y estructuras para anticiparse a los eventos relevantes del mundo en que viven (Pavlov, 1927; Kandel *et al.* 1992; Carew, 2000).

1.4.1 Aprendizaje asociativo

El aprendizaje asociativo surge al establecerse una asociación entre dos o más estímulos contingentes (Pavlov 1927; Kandel *et al.* 1992; Carew 2000). Este tipo de asociación permite establecer relaciones predictivas entre los eventos que coexisten en el medio ambiente, de modo de reducir la incertidumbre del animal (Mackintosh 1994), a la vez que el animal modifica su comportamiento por las experiencias previas (Giurfa 2007).

Si bien los animales deben integrar diferentes modalidades sensoriales para formar memorias que les permitan predecir eventos relevantes en ambientes de alta complejidad como los naturales (Mackintosh 1994), bajo condiciones experimentales, los animales pueden ser condicionados a responder ante una estimulación mucho más reducida y controlada. En un condicionamiento simple, por ejemplo, el individuo aprende la contingencia entre un estímulo neutro o condicionado (EC), que en un principio carece de significado, y un estímulo incondicionado (EI) que genera una respuesta refleja en el individuo experimental. El vínculo que se genera al asociar ambos estímulos durante el condicionamiento, permite al animal anticipar su respuesta refleja con la sola presentación del EC. En este sentido, suelen distinguirse dos clases de condicionamiento simple: el condicionamiento clásico (Pavlov 1927) y el condicionamiento operante (Skinner 1938). En el condicionamiento clásico los animales aprenden a asociar un estímulo inicialmente neutro o condicionado (EC), que en un principio carece de significado, con un estímulo incondicionado (EI), biológicamente relevante, que es capaz de generar por sí mismo una respuesta conspicua y, en muchos casos, refleja en el

individuo. Al generarse un vínculo entre ambos estímulos durante el condicionamiento, el animal es capaz de anticipar su respuesta ante la sola presencia del EC (Figura 1.7).

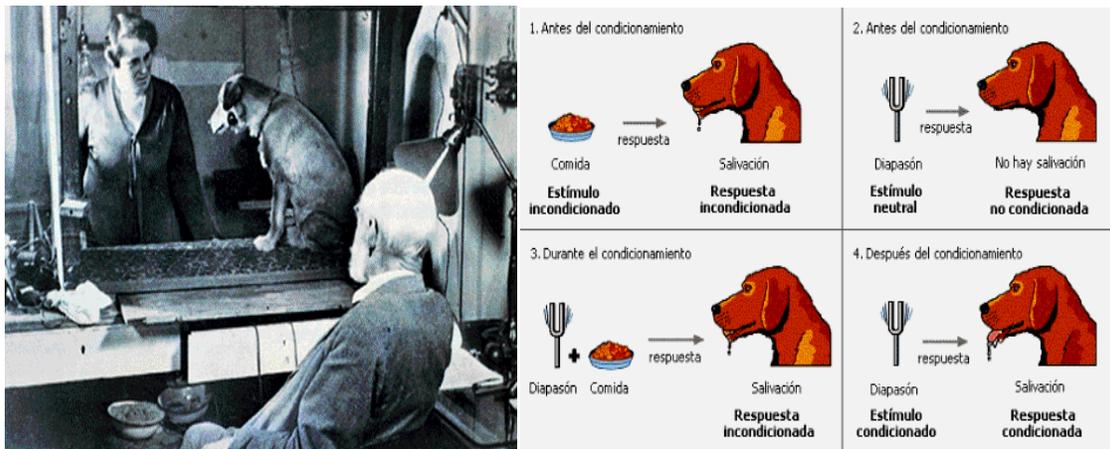


Figura 1.7. Condicionamiento clásico. A la izquierda, Ivan Pavlov con uno de sus colaboradores junto al dispositivo utilizado para estudiar los efectos del condicionamiento sobre el individuo experimental. A la derecha, detalle del protocolo experimental utilizado para lograr condicionamiento.

El condicionamiento operante (Skinner 1938) es aquel mediante el cual los sujetos experimentales aprenden a asociar un comportamiento propio con una recompensa: ante un estímulo se produce una respuesta que puede ser reforzada de manera positiva o negativa, provocando que la conducta (“respuesta operante”, RO) se fortalezca o debilite. El clásico experimento de “la caja de Skinner” ilustra este tipo de condicionamiento. Esta

experiencia mostró que una rata era capaz de aprender a accionar una palanca (RO) para obtener alimento (refuerzo positivo) y que, a través de los sucesivos eventos de entrenamiento, el individuo era capaz de aprender esta contingencia visualizándose una más rápida respuesta motora luego de la presentación del estímulo (visual, sonoro, etc.) para la obtención del refuerzo (Figura 1.8).

Ambos tipos de aprendizaje asociativo permiten generar una predicción, es decir, le otorgan al estímulo condicionado (en el condicionamiento clásico) o a la respuesta operante (en el condicionamiento operante) cierto valor predictivo conforme se establece el vínculo entre ellos. Este vínculo puede variar fuertemente dependiendo, entre otras cosas, de la intensidad, el intervalo entre presentaciones o de la relevancia o relación que existe entre la naturaleza de los estímulos que pretenden ser asociados (Balsam 1985; Rescorla *et al.* 1985; Bhagavan y Smith 1997).

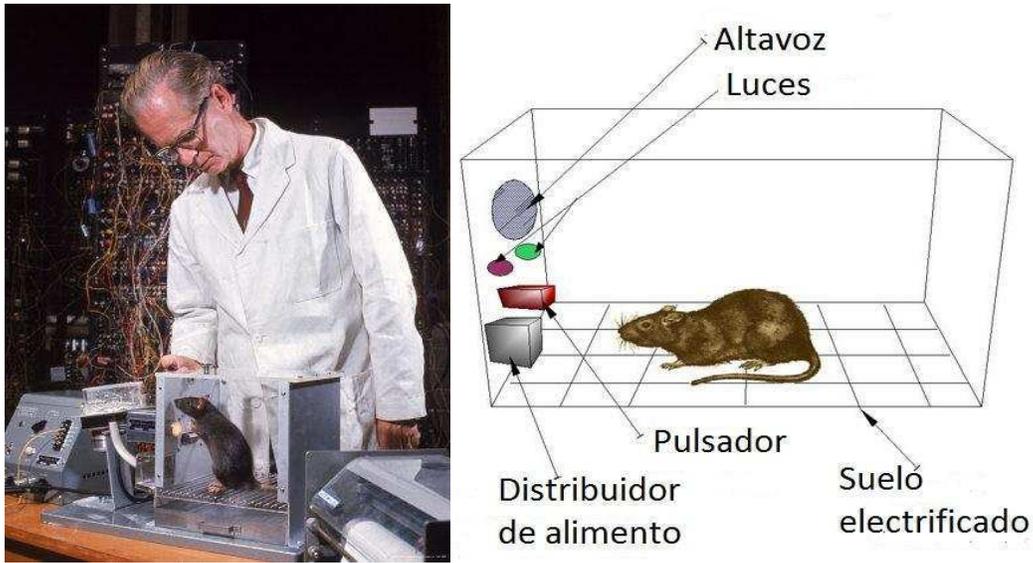


Figura 1.8. Condicionamiento operante. A la izquierda, Burrhus Frederic Skinner (1904-1990) junto a su dispositivo experimental. A la derecha, la “caja de Skinner” en detalle.

En el caso particular de las abejas, la búsqueda de fuentes de alimento fuera de la colmena se basa en estos dos tipos de aprendizaje asociativo descriptos: (1) en el condicionamiento clásico (Pavloviano), se construye una contingencia entre las claves florales (EC) y la recompensa de néctar (EI); y (2) el condicionamiento instrumental (operante), en el que se construye una contingencia entre el volar o caminar hacia un estímulo discriminativo (respuesta del insecto) y el resultado de esa respuesta (volar hacia una flor y obtener una recompensa por ello), y entre el estímulo discriminativo (olor floral, color o patrones florales) y la respuesta del insecto (Sandoz *et al.* 2000)

1.4.2 La formación de la memoria en *Apis mellifera*

La recolección de recursos en las abejas melíferas es un comportamiento que presenta una estructura secuencial de eventos de aprendizaje separados por intervalos de tiempo, los cuales van desde unos pocos segundos hasta meses. Se cree que las distintas fases de la memoria están definidas según esa secuencia (Menzel 1999, 2012). Cuando una abeja llega a un parche floral, puede visitar muchas flores similares, mientras establece asociaciones entre sus características y la recompensa obtenida. En esta situación, en donde varios eventos de aprendizaje pueden ocurrir dentro de un mismo parche floral y donde los intervalos entre eventos son breves, se cree que la abeja establece memorias de corto término que le permitirían mantener una memoria activa durante el tiempo que permanece en el parche. Al agotarse los recursos del parche, la abeja puede viajar a otros en donde, según las condiciones, las memorias establecidas anteriormente pueden afectarse, o reforzarse o extinguirse. En este caso, los intervalos entre eventos serán mayores (entre parches), lo que se cree que da lugar a la formación de memorias de mediano término o de corto término tardías. Estas memorias permitirían a la abeja tomar decisiones entre lo similar y lo diferente (Menzel 1999) por ejemplo, al decidir si es conveniente permanecer en un parche distinto al previamente visitado o buscar otro similar. Por último, los eventos asociativos entre los sucesivos ciclos de recolección, que pueden extenderse por horas o incluso días, darían lugar a memorias de largo término, una fase que en la abeja perdura por más de 72 horas luego del aprendizaje y que podrían ser utilizadas a la hora de explotar un parche floral.

Por otro lado, las abejas melíferas tienen la habilidad de establecer asociaciones en un contexto y evocarlos en otros muy diferentes (Gerber *et al.* 1996; Sandoz *et al.* 2000; Farina *et al.* 2005, 2007; Giurfa y Sandoz 2012). Esta capacidad tiene importancia adaptativa, ya que provee a las abejas de un uso optimizado de memorias almacenadas. Por ejemplo, tienen la habilidad de salir en viajes de recolección utilizando información que fue adquirida dentro de la colmena a través de una recolectora que regresa de una fuente de alimento (por ejemplo, claves espaciales: von Frisch 1967; claves olfativas: Wenner *et al.* 1969). Gerber y colaboradores (1996) estudiaron la respuesta de extensión de probóscide (REP) en abejas que tuvieron la oportunidad de explotar árboles de *Tilia* sp. y encontraron que más del 60% de las abejas respondían cuando se les presentaba ese olor, comparado con el grupo de abejas control, que mostraron bajos niveles de respuesta espontánea frente al mismo estímulo. Es decir, esto indica la posibilidad de una transferencia de la información adquirida en una situación de recolección (contexto instrumental) al reflejo de extensión de probóscide (contexto Pavloviano). En la situación inversa, Bakchine y colaboradores (1992), utilizando el ensayo REP, condicionaron abejas a geraniol (olor feromonal/floral) y éstas mostraron una respuesta de orientación hacia ese olor cuando fueron evaluadas en un olfactómetro. Así, esto provee evidencia acerca de que la información puede ser transferida desde un contexto pavloviano a uno instrumental. Sandoz y colaboradores (2000) mostraron que la información adquirida en un condicionamiento olfativo clásico puede incrementar significativamente la respuesta de orientación de las abejas hacia olores aprendidos cuando son evaluadas en un olfactómetro, utilizando olores florales y no feromonales.

Por todo esto, *Apis mellifera* se convierte en un modelo experimental ideal para el estudio de cómo las experiencias adquiridas en un contexto natural, como ser dentro de la colmena o en las flores, afectan respuestas comportamentales cuando se las evalúa en un contexto completamente distinto, como ser condiciones controladas de laboratorio.

1.5 Objetivos e hipótesis

El objetivo general de esta Tesis es estudiar el uso de la información olfativa en un contexto de recolección colectiva de recursos.

Objetivos e hipótesis particulares:

- 1) Cuando una abeja recolectora regresa con néctar de una fuente de alimento, interactúa con sus compañeras de nido, de manera de transmitir información (olor, ubicación, productividad, disponibilidad) referida al recurso encontrado. Hasta ahora, no se ha estudiado qué tipo de interacciones sociales (contacto corporal, trofalaxia, seguimiento de danza) están involucradas en ello y de qué manera éstas podrían sesgar la preferencia recolectora. Así, nos proponemos determinar los efectos del olor del alimento recolectado sobre las abejas involucradas en distintos tipos de interacciones sociales dentro de la colmena y su posterior elección en el contexto recolector. La hipótesis que aquí se plantea es que determinadas interacciones sociales como la danza y la trofalaxia

tendrán un mayor efecto en el sesgo de elección hacia una fuente de alimento que presenta el mismo olor que el ofrecido en el alimento recolectado.

- 2) Como hemos visto, se han reportado compuestos cuticulares (CCs) presentes en la abeja melífera involucrados en el reconocimiento de castas, de compañeros de nido e, incluso, en el contexto de recolección y reclutamiento hacia una fuente de alimento, junto con la danza (sección 1.3). Con esto en mente, nos planteamos la existencia de una posible correlación entre el perfil de CCs y la productividad de una fuente de alimento. Nos propusimos así, determinar si existen variaciones en los perfiles de compuestos cuticulares presentes en la abeja melífera durante la obtención misma de recursos en función de la productividad de la fuente de alimento explotada. De existir esa diferencia, la liberación de estos compuestos podría tener valor comunicacional y, como consecuencia, un reclutamiento diferencial hacia las fuentes de alimento.
- 3) Asumiendo que las abejas seguidoras de danza están motivadas a adquirir información, sus niveles de “arousal” (estado conductual de corta duración que puede acelerar la obtención de información requerida para la formación de memorias asociativas específicas; Hammer y Menzel 1995) deberían ser distintos que aquellos presentes en otros contextos comportamentales. En ese marco, se espera que las abejas seguidoras estén más sensibilizadas a aquellas claves vinculadas al recurso informado, como las gustativas y olfativas. A partir

de lo expuesto, se intenta establecer si el contexto de reclutamiento, evaluado mediante el seguimiento o no de danzas, afecta procesos de sensibilización quimiosensorial (gustativo) de las abejas seguidoras, como umbrales de respuesta al azúcar.

- 4) Se ha visto que la información olfativa, asociada a recompensa, aprendida bajo condiciones de laboratorio e, incluso, dentro de la colmena puede ser recordada varios días (más de 10) después de haber ocurrido la adquisición de ese olor (Farina *et al.* 2005; Arenas *et al.* 2007, 2008; Grüter *et al.* 2009). En este marco, nos proponemos evaluar si los olores florales adquiridos durante la circulación de néctar dentro de la colmena, pueden influir, a largo plazo, en el subsecuente reclutamiento hacia una determinada fuente de alimento. Para ello, estudiamos si experiencias olfativas adquiridas dentro de la colmena pueden modificar los patrones de interacción entre las danzarinas y las seguidoras expuestas a alimento aromatizado 8 días antes. La hipótesis que se plantea es que, luego de haberse establecido las memorias olor-recompensa a partir de la entrada de néctar aromatizado, las recolectoras tenderán a seguir más a aquellas danzarinas que presenten el olor previamente experimentado dentro del nido.

2

Reclutamiento de la abeja melífera a fuentes de alimento aromatizadas: correlaciones entre las interacciones sociales dentro del nido y las decisiones recolectoras

2.1 Introducción

La eficiencia de recolección de la abeja *Apis mellifera* a nivel individual puede ser entendida como un compromiso entre la optimización de la carga de buche en la fuente de alimento y el intercambio de información relacionada con el alimento dentro de la colmena (Núñez 1982). Sin embargo, la coordinación para la recolección a una escala social se basa en el uso de diferentes y complejos mecanismos desplegados dentro y fuera del nido, incluyendo la transmisión de información respecto a la ubicación, la productividad y la memorización de características específicas de la fuente de alimento descubierta, así como el olor floral (ver von Frisch 1967; Seeley 1995; Grüter y Farina 2009). Mientras que la danza de las abejas indica el área de fuentes de alimento

productivas (von Frisch 1967; Riley *et al.* 2005), la presencia de otras abejas volando alrededor del sitio de alimentación (Tautz y Sandeman 2003) y la liberación de feromonas de reclutamiento (Pflumm 1969) son también importantes para guiar a las abejas en el corto rango de búsqueda (von Frisch 1923; Johnson y Wenner 1966). Además, la información del olor floral de la fuente de alimento descubierta es altamente relevante en este contexto, ya que puede ser transferido dentro de la colmena (von Frisch 1923, 1967; Johnson y Wenner 1966; Ribbands 1954; Free 1969; Arenas *et al.* 2007, 2008).

El uso del olor floral como clave para encontrar sitios de alimentación implica el establecimiento de memorias olor-recompensa formadas dentro de la colmena (Farina *et al.* 2005), en las cuales los contactos boca a boca (trofalaxia) entre compañeras de nido sería el mecanismo subyacente más plausible (Gil y De Marco 2005; Farina *et al.* 2007). Sin embargo, las partículas de olor impregnadas en la superficie corporal de la recolectora parecen ser, en algunos casos, estímulo suficiente para la activación de la recolección (von Frisch 1923). Ha sido reportado que durante la recolección, el seguimiento de danza y la trofalaxia son las interacciones más comunes entre las recolectoras activas y las abejas que permanecen dentro de la colmena. Sin embargo, también se ha observado que muchas abejas son capaces de arribar a la fuente de alimento incluso sin haber tenido ningún contacto directo con la recolectora activa dentro del nido (Gil y Farina 2002). En ese sentido, parece ser que no todas las abejas requieren la misma estimulación antes de la activación recolectora, un hecho que está relacionado con la experiencia de campo que esos individuos poseen (Gil y Farina 2002; Fernández *et al.* 2003).

Hasta ahora, no ha habido evidencia acerca de qué controla la aproximación final y el aterrizaje de las abejas recolectoras a las fuentes de alimento aromatizadas. Para abordar esto, es relevante determinar qué información acerca de las fuentes naturalmente aromatizadas es transmitida para activar la recolección. Con respecto a esto, el impacto que tienen los diferentes tipos de interacción que ocurren dentro de la colmena sobre las decisiones recolectoras entre sitios de alimentación aromatizados, aún se desconoce. Aunque se ha sugerido que la trofalaxia con la recolectora activa puede ser relevante para la activación recolectora (Farina *et al.* 2005, 2007, Grüter *et al.* 2006), no hay evidencia directa acerca de qué clase de interacciones sociales que ocurren dentro de la colmena causan el sesgo de preferencia hacia una determinada fuente de alimento.

En este estudio, la elección de aterrizaje en una determinada fuente de alimento por parte de abejas previamente marcadas, fue evaluada luego de haber observado su interacción con la recolectora activa dentro del nido. La recolectora activa podía haber recolectado solución de sacarosa tanto aromatizada como no aromatizada del alimentador de adiestramiento.

Las preferencias de las abejas marcadas fueron evaluadas en el sitio de recolección después que el alimentador de adiestramiento fuera cubierto, de manera tal que estas abejas no tuvieran acceso a él y se les ofrecieran otros dos alimentadores con solución de sacarosa aromatizada (“alimentadores de evaluación”). Así, analizamos la elección por el olor en el sitio de recolección junto con la ocurrencia de las interacciones con la recolectora activa dentro de la colmena, instantes antes que las abejas marcadas aterrizaran en alguno de los alimentadores de evaluación.

2.2 Materiales y métodos

Cinco colonias de 3000-3500 abejas *Apis mellifera* cada una fueron confinadas a colmenas de observación de dos cuadros. Las colonias contaban con reina, cría y reservas. Los experimentos fueron realizados con 3 colmenas de observación de febrero a abril del 2008 (C1-C3) y con 2 colmenas de observación en el 2009 (C4 y C5) en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Las colmenas fueron utilizadas de a una por vez para realizar los experimentos.

2.2.1 Procedimiento experimental

Un grupo de 70-100 abejas, aproximadamente, fueron adiestradas a recolectar solución de sacarosa 50 / p/p sin aromatizar *ad libitum* de un alimentador artificial (“alimentador de adiestramiento”, A0) colocado a 110 m de la colmena de observación. El adiestramiento consistió en la presentación de un alimentador artificial conteniendo solución de sacarosa no aromatizada en la entrada de la colmena (piquera). Una vez establecido un grupo de abejas recolectando de él, el alimentador fue movido una corta distancia respecto a la ubicación original. Una vez que esas abejas retornaban al alimentador, el procedimiento era repetido hasta alcanzar la ubicación final del sitio de alimentación (von Frisch 1967). Durante el periodo de adiestramiento, las abejas

recolectoras fueron numeradas con etiquetas plásticas (Opalithplättchen) pegadas en el tórax, para su identificación individual. El experimento se llevó a cabo durante 3 días consecutivos (situación sin olor, Días 1 y 2; situación con olor, Día 3). Antes de comenzar la toma de datos (periodo de evaluación), se ofreció solución de sacarosa 50% p/p en el A0 desde las 10 hs hasta las 11 hs. Durante este periodo, las abejas marcadas confirmaban que la fuente de alimento continuaba disponible. Luego, desde las 11hs hasta las 14 hs, el alimentador utilizado durante el periodo de adiestramiento (A0) fue vaciado, limpiado y mantenido en la misma ubicación hasta el comienzo del periodo de evaluación.

2.2.2 Situación sin olor (días 1 y 2)

Desde las 14 hs hasta las 15 hs, A0 fue recargado con solución 50% p/p sin aromatizar y otros dos alimentadores artificiales (alimentadores de evaluación, A1 y A2) adicionales fueron colocados equidistantes a A0 (Figura 2.1). El periodo de evaluación comenzó cuando una sola abeja recolectora experimentada (“abeja focal” desde ahora) retornó a A0, mientras que el resto de las abejas (numeradas) sólo tuvieron acceso a A1 o A2, los cuales ofrecían solución azucarada 18% p/p aromatizada. El uso de una solución azucarada diluida permitió que las abejas aterrizaran en alguno de los alimentadores y comenzaran a ingerirla, situación que facilitó su captura. Los alimentadores de evaluación, A1 y A2, fueron aromatizados con placas de Petri (1cm de alto, 15 cm de diámetro)

conteniendo un disco de papel de filtro (55 mm de diámetro) embebido con olor puro (50 μ l aceite esencial), colocadas debajo de cada alimentador (Arenas et al. 2007). Los olores utilizados en A1 y A2 durante el primer día de evaluación fueron invertidos en el día 2 (Figura 2.1, paneles de la izquierda y centro). Durante los días 1 y 2, la solución ofrecida en A0 fue sin aromatizar (situación sin olor).

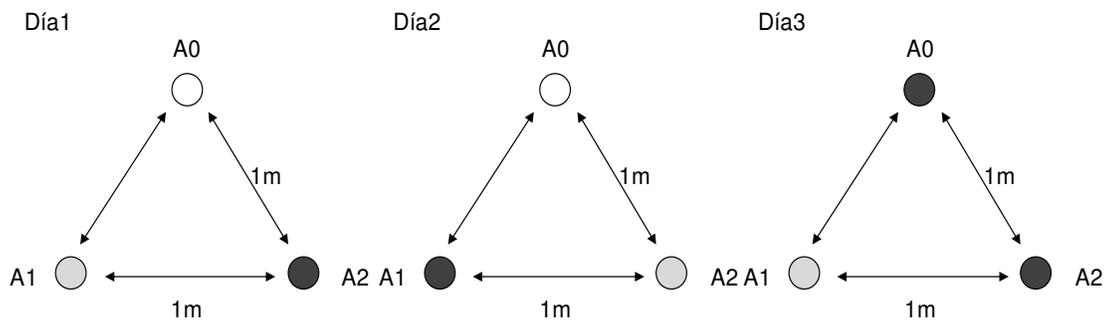


Figura 2.1. Dispositivo experimental para los 3 días durante la fase de evaluación. Se muestra la disposición de los 3 alimentadores colocados en simultáneo (A1-A3) a 110m de la colmena de observación. A0 fue cubierto con un domo de acrílico para evitar el ingreso de abejas que no fueran la abeja focal. Círculos vacíos: presencia de solución sin olor; círculos llenos: solución con olor.

Durante el periodo de evaluación, sólo la abeja focal tuvo acceso al A0. Esto fue posible ya que el A0 fue cubierto con un domo cilíndrico (15 cm de diámetro, 15 cm de alto) permitiendo que sólo la abeja focal recolectara la solución de sacarosa. De esta

manera, las abejas numeradas que tuvieron experiencia en ese entorno, no podían aterrizar en A0, de modo que tuvieron que optar entre los dos alimentadores alternativos, A1 y A2, donde fueron inmediatamente capturadas para evitar un doble conteo y que retornaran a la colmena llevando solución aromatizada.

Por otro lado, registramos las interacciones sociales que tuvieron lugar dentro de la colmena, entre la abeja focal y las abejas numeradas utilizando cámaras de vídeo (DCR-TRV 310 and Sony Handycam HDR-SR11). Los observadores en los alimentadores y los observadores del laboratorio (colmena de observación) mantuvieron contacto directo mediante el uso de *walkie-talkies*.

2.2.3 Situación con olor (día 3)

El procedimiento utilizado en este día fue el mismo que se usó durante la situación sin olor (día 1 y 2), con la diferencia que durante este día, el A0 fue aromatizado con el olor (50 µl de aceite esencial por litro de solución azucarada) menos elegido por las abejas en los días de evaluación previos (situación sin olor) (Figura 2.1, panel derecho). Para aromatizar A1 y A2 durante los 3 días experimentales y A0 durante el tercer día, se usaron cinco pares de mezclas sintéticas de olores, un par por cada colmena: C1: rosa-vainilla, C2: mandarina-sándalo, C3: bergamota-frutilla, C4: ciprés-árbol de té y C5: durazno-hierbalimón. La solución aromatizada entró a la colmena por primera vez cuando la abeja

focal colectó la solución de sacarosa en el A0 durante el día 3 (situación con olor). Sólo a través de la abeja focal fue que el resto de las compañeras de nido tuvo acceso a la solución aromatizada.

2.2.4 Observaciones comportamentales

Se cuantificaron distintas categorías de interacción entre la abeja focal y sus compañeras de nido, quienes habían sido individualizadas con un número en el tórax en visitas previas al A0 (abejas numeradas). Definimos las siguientes categorías de interacción entre la abeja focal y las abejas numeradas ocurridas dentro del nido (Gil y Farina 2002): (1) no contacto (NC), no se registró contacto corporal entre las abejas numeradas y la abeja focal; (2) contacto corporal con la abeja focal (CC), las abejas numeradas tocaron el cuerpo de la abeja focal sin seguir danza; (3) trofalaxia (TRF), las abejas numeradas tocaron las piezas bucales de la abeja focal con su probóscide protruida, sin seguimiento de danza; (4) seguimiento de danza (SD), las abejas numeradas siguieron la danza realizada por la abeja focal; (5) trofalaxia y seguimiento de danza (TRF+SD), las abejas numeradas siguieron danza y, además, realizaron trofalaxia con la abeja focal. Todas las categorías recién definidas fueron mutuamente excluyentes. Dado que durante el periodo experimental las abejas numeradas podían interactuar con la abeja focal en más de una estadía de colmena (permanencia dentro de la colmena entre viajes de recolección), el tipo de interacción fue

relativizado al periodo experimental. Al mismo tiempo, en los alimentadores se registró la hora y el número de la abeja que aterrizaba en cada alimentador.

2.2.5 Análisis estadístico

Se utilizó el test de Fisher para comparar las proporciones de abejas que aterrizaron en cada uno de los alimentadores (A1 o A2) por colonia, mientras que un análisis de heterogeneidad Chi-cuadrado fue usado para evaluar la misma variable luego de haber agrupado los datos de las cinco colmenas, luego de hacer una corrección por continuidad (Zar 1999). Para un análisis global entre tratamientos, el tipo de interacción ocurrido dentro de la colmena y el alimentador elegido, usamos el modelo lineal de efectos mixtos (GLMM) en R v 2.9 (R Development Core Team 2009). R ajusta los modelos con la función lmer (Bates 2007) Usamos el tipo de interacción social y el tratamiento (situación con o sin olor) como efectos fijos, incluimos a la colonia como efecto al azar para controlar la no independencia de los datos de la misma colonia. Estudiamos la significancia de los efectos fijos usando la prueba de Wald (Bolker *et al.* 2009; Zuur *et al.* 2009).

Para comparar la proporción de abejas que aterrizaron en los alimentadores según el número de estadías en la colmena de la abeja focal que involucraron algún tipo de interacción, en ambas situaciones experimentales (con y sin olor), un nuevo análisis GLMM fue realizado (R v 2.9, R Development Core Team 2009). R ajustó los modelos con

la función lmer (Bates 2007). Usamos la estadía en colmena (EC) y el tratamiento como efectos fijos.

2.3 Resultados

Durante los días 1 y 2, el comportamiento de elección de la fuente de las abejas numeradas fue analizado comparando los aterrizajes en ambos alimentadores experimentales, A1 y A2, mientras la abeja focal ingería solución de sacarosa sin olor de A0. En el día 3, el alimentador de evaluación menos elegido durante los días 1 y 2 (A2), fue seleccionado para ofrecer solución aromatizada con el mismo olor que la recolectora activa recolectó de A0 durante la situación con olor (Figura 2.1). De este modo, comparando la proporción de arribos a A2 en ambas situaciones experimentales, el análisis estadístico realizado para cada colmena mostró que más abejas prefirieron aterrizar en A2 cuando A0 fue aromatizado, respecto a cuando A0 no presentó olor (tabla de contingencia 2x2, prueba de Fisher, C1, $\chi^2=7.59$, $df=1$, $P=0.0059$; C2, $\chi^2=16.39$, $df=1$, $P=0.0001$; C3, $\chi^2=2.4$, $df=1$, $P=0.1211$; C4, $\chi^2=2.2$, $df=1$, $P=0.1382$; and C5, $\chi^2=3.92$, $df=1$, $P=0.04$; Figura 2.2).

Cuando la proporción de abejas que aterrizaron en el alimentador experimental A2 fue analizado bajo ambas situaciones experimentales, las cinco colmenas mostraron un patrón de respuesta similar (prueba de heterogeneidad: $\chi^2=0.47$, $df=4$, $P=0.976$). Luego,

agrupamos los datos relativos de todas las colonias y seguimos encontrando diferencias significativas para ambas situaciones, con solución con o sin olor en A0 (corrección de Yates: $\chi^2=30.65$, $P<0.005$, ver figura inserta en Figura 2.2).

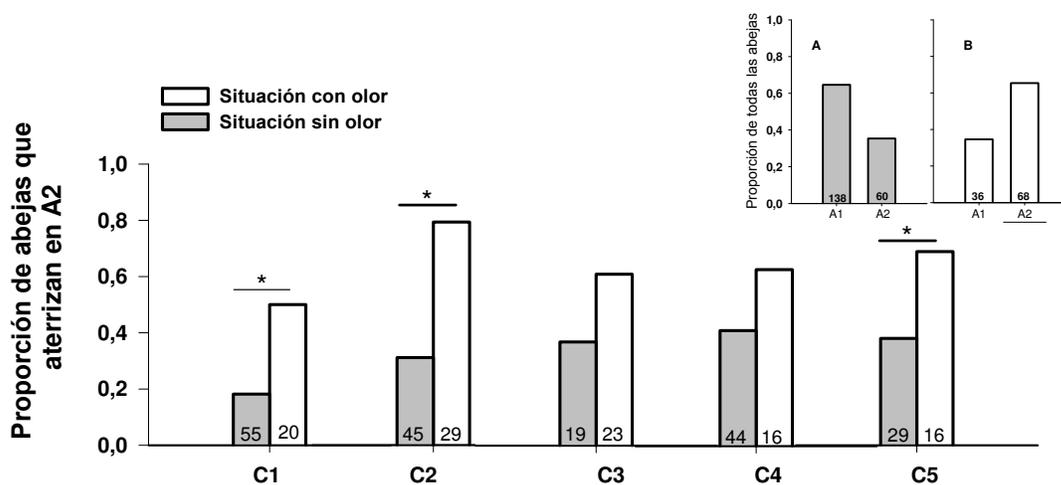


Figura 2.2. Arribos de las abejas numeradas bajo las situaciones con y sin olor. Se muestra la proporción de abejas que aterrizaron en A2 (el alimentador que ofreció el mismo olor que el de la solución recolectada por la abeja focal en A0 durante la situación con olor). Barras blancas: situación con olor; barras grises: situación sin olor. C1-C5 representan las colmenas experimentales utilizadas. El número de abejas que aterrizó en A2, se muestra en la base de cada barra. Los asteriscos indican diferencias significativas en el test de Fisher (* $P<0.05$; ver Resultados para detalles).

Inserto: proporción total de abejas numeradas que aterrizaron en cada alimentador (abejas de las 5 colmenas agrupadas). En la base de cada barra, se muestra el número de abejas que aterrizó en cada alimentador. Los asteriscos indican diferencias significativas en el prueba de Fisher (* $P<0.05$; ver Resultados para detalles. A2 está subrayado en la situación con olor (B), indicando que ofreció el mismo olor que A0.

Por lo tanto, las abejas prefirieron aterrizar en el alimentador que ofreció el mismo olor que fue explotado por la abeja focal. Usando GLMM, analizamos la situación experimental y el tipo de interacción social en relación con la elección de las abejas por uno de los alimentadores experimentales (Figura 2.3). El efecto de la situación experimental fue significativo (GLMM, $z=3.39$, $P=0.0007$), indicando que más abejas aterrizaron en A1 cuando se ofreció solución de sacarosa sin aromatizar en A0. Bajo la situación sin olor, el efecto del tipo de interacción social no fue significativo (ver detalles en el GLMM presentado en la Figura 2.3). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre “no contacto” y “contacto corporal” para la situación con olor, aunque no para el resto de las comparaciones (ver GLMM en Figura 2.3). Estos resultados sugieren que al menos algún tipo de interacción, entre la recolectora activa y las abejas marcadas en la colmena, es necesaria para aterrizar en el alimentador “correcto” (A2).

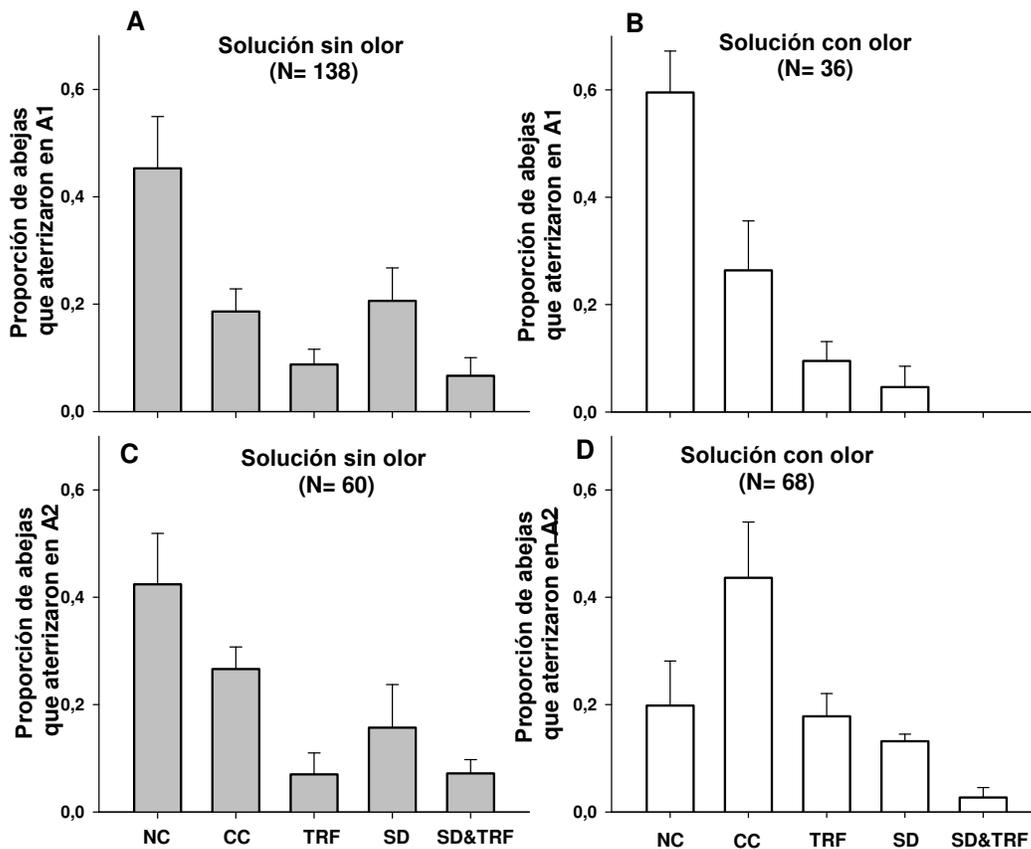


Figura 2.3. Distribución de interacciones sociales dentro de la colmena bajo las situaciones con y sin olor. Proporción del total de abejas numeradas capturadas una vez que aterrizaron en A1 (alimentador 1) (a y b) y A2 (alimentador 2) (c y d). Los resultados fueron agrupados según el tipo de interacción que realizaron con la abeja focal dentro del nido y bajo ambas condiciones experimentales, ej. las abejas focales recolectaron en A0 solución sin olor (barras grises, a y c; GLMM para situación sin olor: NC vs. CC: $z=0.4$, $P=0.68$; NC vs. TRF: $z=0.11$, $P=0.91$; NC vs. SD: $z=0.53$, $P=0.59$; NC vs. SD+TRF: $z=-0.32$, $P=0.75$; CC vs. TRF: $z=-0.32$, $P=0.75$; BC vs. SD: $z=0.14$, $P=0.89$; CC vs. SD+TRF: $z=-0.53$, $P=0.59$; TRF vs. FD: $z=0.39$, $P=0.69$; TRF vs. SD+TRF: $z=-0.16$, $P=0.88$; SD vs. SD+TRF: $z=-0.6$, $P=0.55$) o solución con olor (barras blancas, b y d; GLMM para situación con olor: NC vs. CC: $z=2.27$, $P=0.023$; NC vs. TRF: $z=1.64$, $P=0.10$; NC vs. SD: $z=1.57$, $P=0.12$; CC vs. TRF: $z=0.22$, $P=0.83$; CC vs. SD: $z=0.44$, $P=0.66$; TRF vs. SD: $z=0.23$, $P=0.82$). A2 está subrayado en la situación con olor (d), indicando que se ofreció el mismo olor que en A0. NC: no contacto; CC: contacto con el cuerpo de la abeja focal; TRF: trofalaxia; SD: seguimiento de danza y SD&TRF: seguimiento de danza y trofalaxia ocurridas durante una misma estadía en colmena. Todas las categorías definidas son mutuamente excluyentes. El número de abejas que aterrizó en cada alimentador se muestra entre paréntesis.

También fue registrado el número de permanencias de la abeja focal dentro del nido, entre cada viaje recolector (“estadías en colmena” desde ahora) que involucró interacciones sociales con las abejas numeradas que arribaron luego a uno de los alimentadores experimentales (Figura 2.4). Encontramos diferencias significativas entre los tratamientos (GLMM, $z=4.605$, $P<0.005$) y entre el número de estadías en colmena con interacciones sociales (por ej., una estadía en colmena con interacciones, EC1, vs estadía en colmena sin interacciones, EC0: $z=2.198$, $P=0.023$; GLMM). Para la situación sin olor, no encontramos diferencias significativas entre la proporción de arribos a A1 y A2 y el número de estadías en colmena de la recolectora activa con interacciones [Figura 2.4a; GLMM: EC0 vs. EC1: $z=0.775$, $P=0.438$; EC0 vs. EC2 (dos estadías en colmena con interacciones): $z=-0.414$, $P=0.679$; EC0 vs. EC3 (tres estadías en colmena con interacciones): $z=1.008$, $P=0.313$; EC0 vs. EC4 (cuatro estadías en colmena con interacciones): $z=-0.009$, $P=0.993$]. En contraste, para la situación con olor, la distribución de arribos difiere significativamente dependiendo del alimentador elegido por la abeja numerada, mostrando un gran número de estadías en colmena antes de partir hacia el alimentador que contenía el mismo olor que el explotado por la abeja focal (A2) (Figura 2.4b; GLMM: HS0 vs. HS1: $z=2.870$, $P=0.0041$; HS0 vs. HS2: $z=1.92$, $P=0.055$; HS0 vs. HS3: $z=0.668$, $P=0.504$; HS0 vs. HS4: $z=0.01$, $P=0.992$). En otras palabras, las abejas que arribaron al alimentador “correcto” parecen necesitar más encuentros con la abeja focal. En coincidencia con este resultado, aquellas abejas que aterrizaron en el alimentador con el olor novedoso (A1, situación con olor) también tuvieron demoras más cortas comparadas con aquellas que aterrizaron en el A2, que ofrecía el olor explotado (la

demora media para A1 fue de 18.7 minutos y 23.5 minutos para A2). Bajo ambas situaciones experimentales, alrededor del 40% de las abejas que arribaron al área de alimentación no mostraron interacciones conspicuas con la abeja focal (Figura 2.4a y b) ni tampoco mostraron diferencias significativas entre las situaciones con y sin olor para la categoría “no contacto”, NC (prueba de Fisher: $\chi^2=1.76$, $df=1$, $P=0.1845$). Por lo tanto, si consideramos a las abejas que aterrizaron en uno de los alimentadores experimentales después de interactuar con la abeja focal durante una única estadía en colmena, encontramos que la elección por la fuente de alimento depende de la situación experimental.

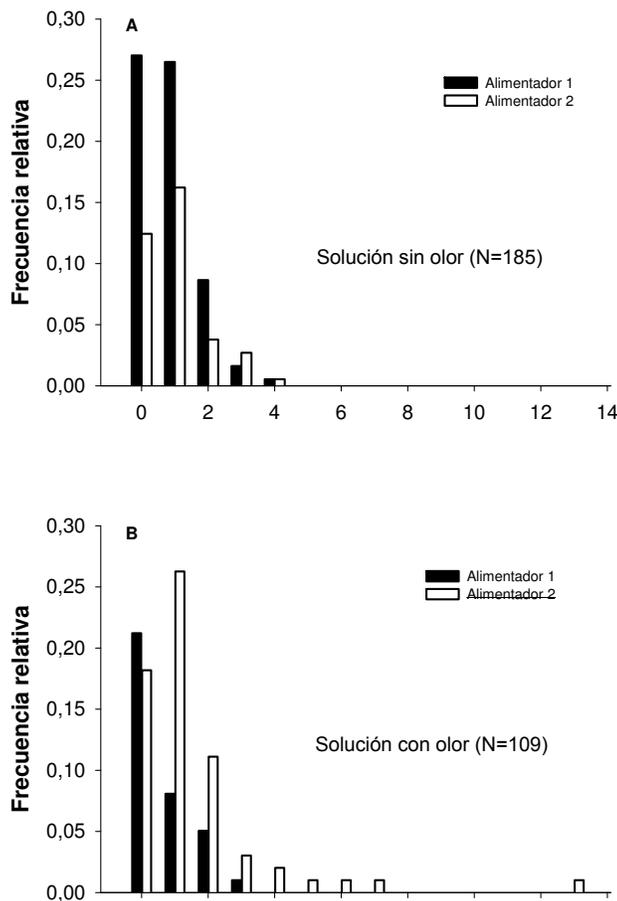


Figura 2.4. Número de estadías en colmena (permanencia entre viajes de recolección) con interacciones sociales antes de arribar a los alimentadores (Alimentador 1 y 2). Número de abejas numeradas, expresado en frecuencias relativas, que aterrizaron en el alimentador 1 (A1, barras negras) o en el alimentador 2 (A2, barras blancas) luego de un número de estadías en colmena en las cuales las abejas numeradas interactuaron con la abeja focal. A0 ofreció solución azucarada sin olor durante los días 1 y 2 (a) y solución azucarada con olor durante el día 3 (b). El número de abejas que aterrizaron en cada alimentador se muestra entre paréntesis. A2 está subrayado en la situación con olor, indicando que se ofreció el mismo olor que en A0.

Para la situación sin olor, el tipo de interacción dentro de la colmena que ocurre inmediatamente antes de arribar a alguno de los alimentadores fue similar e independiente de la elección del alimentador (Figura 2.5a; prueba de independencia: $\chi^2=1.166$, $df=3$, $P=0.761$). Este no fue el caso de la situación con olor, en la cual observamos una alta proporción de interacciones sociales antes de partir hacia A2, alimentador “correcto” (Figura 2.5b; aquí no se realizó análisis estadístico debido a la ausencia de datos en algunas de las categorías, Zar 1999).

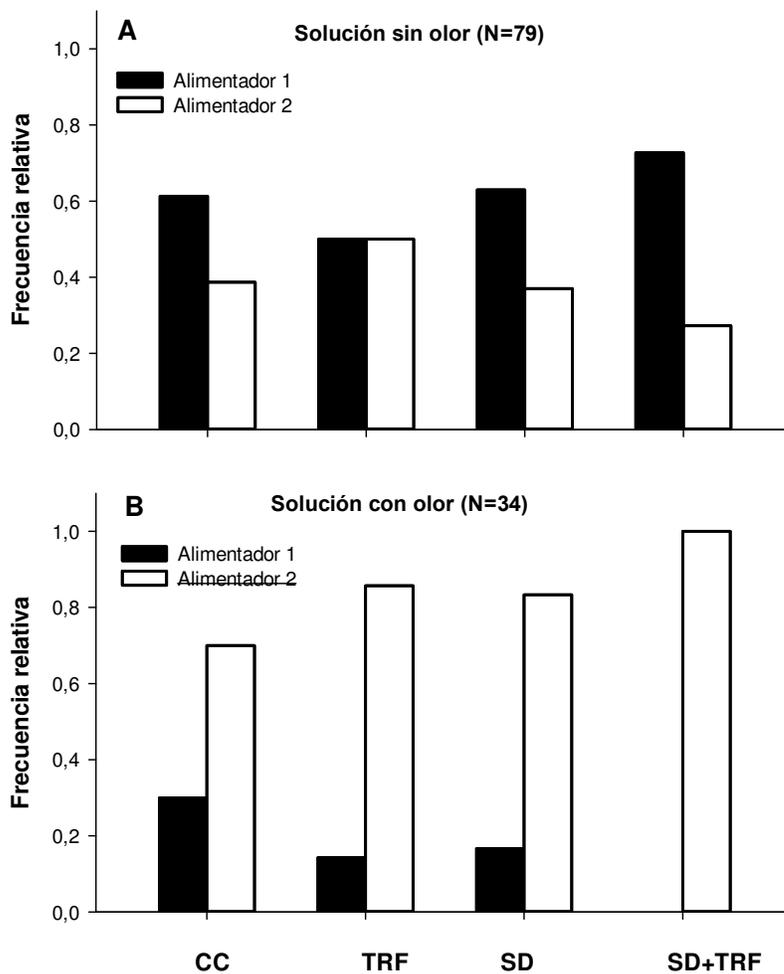


Figura 2.5. Categorías de las interacciones sociales entre las abejas que arribaron a los alimentadores y la abeja focal, antes de aterrizar en uno de los alimentadores experimentales bajo la situación sin olor (a) y la situación con olor (b). Las interacciones en la colmena aquí consideradas, ocurrieron luego de una sola estadía en la colmena de la abeja focal. Barras negras: alimentador 1, barras blancas: alimentador 2. El número de abejas que aterrizaron en cada alimentador se muestra entre paréntesis. A2 se subraya en la situación con olor (b), indicando que ofrecía el mismo olor que A0.

2.4 Discusión

En este estudio, se estudiaron los factores de interacción social que impactan sobre las decisiones recolectoras entre fuentes de alimento aromatizadas. El principal hallazgo es que individuos que tienen cualquier tipo de interacción social dentro de la colmena son más propensos a recolectar en el sitio de alimentación que posee el mismo olor que la fuente explotada por la abeja focal. Estas interacciones no tienen que ser necesariamente seguimiento de danza o trofalaxia, sino que pueden ser contactos corporales simplemente. En coincidencia con estudios previos (von Frisch 1923, 1967; Johnson y Wenner 1966; Ribbands 1954; Free 1969; Arenas *et al.* 2007, 2008) encontramos que, bajo condiciones experimentales, las abejas eligen preferencialmente el sitio de alimentación que posee el mismo olor que la solución recolectada por su compañera de nido (abeja focal). Habiendo corroborado esto, quisimos ir un poco más lejos y cuantificar los diferentes tipos de interacción social en las cuales las abejas estuvieron involucradas antes de aterrizar en el alimentador correcto (ej. un nuevo alimentador que ofrece el mismo olor que el recolectado por la abeja focal, colocado cerca de los alimentadores de entrenamiento). Encontramos que estas abejas realizan más interacciones dentro de la colonia con la abeja focal que aquellas que aterrizaron en el alimentador alternativo. La interacción más frecuente es el contacto con el cuerpo de la abeja focal, una categoría comportamental que no involucra seguimiento de danza ni trofalaxia. Así, el olor floral percibido por interacciones sociales simples parece proveer suficiente información para sesgar el comportamiento de elección de la fuente de alimento de las abejas numeradas

en el área inmediata al sitio de alimentación. Este hallazgo viene como consecuencia de cuantificar las interacciones sociales dentro de la colmena de las abejas reclutadas (abejas numeradas) en este contexto por primera vez. Este experimento nos permitió analizar la primera elección alimenticia de las abejas numeradas visitando el sitio de alimentación aromatizado así como la reducción de interferencia de claves sensoriales en los alrededores del sitio de recolección como la presencia de recolectoras activas, lo cual puede afectar las decisiones de aterrizaje (Tautz y Sandeman 2003). Las abejas que arribaron, previamente recolectaron solución sin olor en el alimentador de entrenamiento, pero la presencia de olor en el contexto de reclutamiento fue una situación nueva que forzó a los sujetos a elegir entre uno de los alimentadores de evaluación aromatizados. Los resultados muestran que en las cinco colmenas testeadas, la mayoría de las abejas numeradas aterrizaron en el alimentador correcto (A2) durante la situación con olor (Figura 2.2). Luego de observar esta respuesta sesgada, la pregunta acerca de qué controla la aproximación final y el aterrizaje en las fuentes aromatizadas fue considerada. Para esto, correlacionamos los arribos de las abejas numeradas a la fuente de alimento con la experiencia reciente dentro de la colmena. En este sentido, se ha sugerido que la trofalaxia con una recolectora activa es necesaria para activar la búsqueda de fuentes de alimento aromatizadas (Farina *et al.* 2005, 2007; Grüter *et al.* 2006; Arenas *et al.* 2007, 2008). Sin embargo, sólo un estudio en un insecto eusocial mostró el rol de la transferencia de información del olor del alimento vía trofalaxia y su uso luego, en el contexto recolector. En este estudio, hormigas carpinteras, *Camponotus mus*, involucradas en el intercambio de néctar a través de eventos trofalácticos mostraron un

comportamiento sesgado hacia el alimentador aromatizado con el olor transferido vía contacto oral por la hormiga recolectora, mostrando un claro rol de esta información mientras las hormigas se orientan hacia un objetivo apetitivo (Provecho y Josens 2009).

Se ha intentado abordar este tema haciendo foco en las interacciones sociales que se produjeron dentro de la colmena cuando un solo miembro de la colonia recolectó una recompensa controlada. Del análisis del comportamiento dentro de la colmena de acuerdo con la elección por el sitio de alimentación, mostramos que ocurre una proporción similar de interacciones en ambos grupos arribando a A1 o A2 bajo la situación sin olor (Figura 2.3). Más de un 40% de las abejas que aterrizaron en el dispositivo de elección de alimento no mostraron interacciones con la abeja focal (NC) bajo esta situación experimental, un hecho reportado como común en las abejas recolectoras con experiencia en el campo (de Vries y Biesmeijer 1998; Gil y Farina 2002; Fernández *et al.* 2003). Además, interacciones sociales como contacto corporal sin seguimiento de danza (CC) fueron más frecuentes que el seguimiento de danza (SD), mientras que los eventos trofalácticos con la abeja focal (TRF) fueron menos frecuentes bajo la situación sin olor. Cuando el alimentador de entrenamiento A0 fue aromatizado, la proporción de interacciones dentro de la colmena difirió significativamente según el alimentador elegido (Figura 2.3). Mientras que el 60% de las abejas numeradas que arribaron al alimentador que contenía el olor novedoso, no realizaron interacciones conspicuas con la abeja focal (NC), esta misma categoría comportamental se redujo marcadamente (20%) en aquellas abejas que arribaron al alimentador correcto. La categoría comportamental más frecuente para este grupo fue el contacto con el cuerpo de la abeja focal, sin seguimiento de danza

(CC), una proporción que casi duplica la alcanzada por las abejas que llegaron al alimentador equivocado. Además, la ocurrencia de eventos trofalácticos (TRF) se incrementó comparado con otras interacciones conspicuas durante la situación con olor, en contraste con las proporciones observadas bajo la situación sin olor. Al menos una estadía de colmena parece ser suficiente para incrementar la proporción de arribos exitosos en el sitio de alimentación. Además, los aterrizajes en el alimentador alternativo (ej. ofreciendo olor novedoso) podrían reducirse con mayores encuentros con la recolectora focal (Fig. 2.4). Un análisis más detallado luego de una sola estadía de colmena muestra que la eficiencia de tocar el cuerpo de una recolectora recién llegada es de un 70%, mientras que el seguimiento de danza y las trofalaxias mejoran la eficiencia, alcanzando más de un 80% de los CCs (Figura 2.5). Es claro entonces, que algún tipo de interacción directa olor-mediada entre recolectoras empleadas y desempleadas fue relevante para alcanzar una elección exitosa de la fuente de alimento. Sin embargo, la mayoría de las abejas que arribaron al alimentador correcto no siguieron danza ni intercambiaron alimento vía trofalaxia con la abeja focal. Un porcentaje considerable de arribos tampoco mostró interacciones conspicuas con la abeja focal (20%; Figuras 2.3, 2.4 y 2.5). A pesar de esta situación e incluso en casos en los cuales no registramos ninguna interacción (NC), es posible que muchos de los arribos correctos sean consecuencia de recibir alimento aromatizado de otras compañeras de nido y no de la abeja focal. Si ese fuera el caso, la circulación de néctar aromatizado entre las abejas ubicadas en el área de danza/descarga podría permitir que, de cualquier manera, se establezca la memoria olfativa. Es bien conocido que la información olfativa puede ser rápidamente propagada

dentro de la colmena (Grüter *et al.* 2006, Ramírez *et al.* 2010). Así, junto con la presencia de señales vibratorias de la danza transmitidas a través de la cera (Tautz 1996) y la liberación activa de químicos producidos por las danzarinas (Thom *et al.* 2007), podría ser suficiente para recordar vectores de vuelo (Johnson 1967, Reinhard *et al.* 2004, Grüter *et al.* 2006). Una vez en el área de recolección conocida, el aroma aprendido dentro de la colmena, podría facilitar la ubicación del objetivo. Para nuevas fuentes de alimento, los vectores comunicados vía danza de contoneo, junto con el olor del alimento llevado a la colmena por la abeja scout, permitiría no sólo la decodificación de la localización de la nueva fuente de alimento (von Frisch 1967; Riley *et al.* 2005; Menzel *et al.* 2011) sino también afectaría los niveles de “arousal” para reactivar a las abejas al modo de recolección (von Frisch 1923). Así, dentro de un contexto comportamental motivacional como ser las maniobras de danza, las abejas seguidoras podrían aprender el olor transportado por la recolectora (von Frisch 1967; Díaz *et al.* 2007), incluso sin recibir una gota de néctar aromatizado de la recolectora exitosa. Por lo tanto, las interacciones sociales que involucran contacto directo o no con la recolectora activa podrían mejorar la orientación de nuevas recolectoras hacia la fuente de alimento productiva, un hecho que implica la obtención de información dentro de la colmena de diferentes fuentes como vector de danza, olor del alimento, vibración, olor de las danzarinas, entre otros. Así, bajo la ausencia de claves conspicuas o señales en los alrededores del sitio de alimentación, la presencia de claves incidentales previamente experimentadas dentro del contexto social, contribuiría a la elección de una fuente de alimento predecible y rentable.

3

Volátiles cuticulares en las abejas recolectoras de néctar y sus variaciones con la productividad de la fuente de alimento

3.1 Introducción

La capa de lípidos de la cutícula de los insectos está compuesta de ésteres, alcoholes, ácidos grasos libres e hidrocarburos (Kather *et al.* 2011). Estos últimos son a menudo el grupo predominante y su función principal es la prevención de la desecación (Hadley 1994, Buckner 1993). Sin embargo, en insectos sociales, los hidrocarburos también juegan un rol importante como semioquímicos, en particular para el reconocimiento de especie, de compañeros de nido, de casta y de parentesco (Howard y Blomquist 1982, Howard 1993, Breed 1998, Singer 1998, Vander Meer *et al.* 1998). El olor de la colonia que llevan las abejas consigo, es una combinación de hidrocarburos cuticulares y compuestos lipídicos que componen la cera de los panales de sus nidos (Breed *et al.* 1988, 1998), los cuales incluyen feromonas producidas por otras obreras así como aromas florales llevados

al nido vía polen y néctar (Breed 1998; Fröhlich *et al.* 2001). Un estudio de Kalmus y Ribbands (1952) mostró que abejas recolectoras podían distinguir, en la fuente de alimento, entre compañeras de nido y aquellas que no lo eran sin mediar contacto, sugiriendo que los compuestos que están involucrados son volátiles. A su vez, Schmitt y colaboradores (2007) utilizaron fibras SPME (del inglés: Solid Phase Micro Extraction) y encontraron hidrocarburos presentes en el espacio cercano a la abeja recolectora. En un trabajo reciente, Kather y colaboradores (2011) hallaron diferencias en los lípidos cuticulares de *Apis mellifera* entre abejas recién emergidas, nodrizas y recolectoras. Además, proponen que existe un cambio en la composición de alcanos cuticulares cuando una abeja que desempeña tareas dentro del nido, comienza con tareas de recolección de alimento, este cambio podría deberse a las diferencias en la de humedad relativa y la temperatura entre el exterior y el interior del nido, como ya fue encontrado en la hormiga *Pogonomyrmex barbatus* (Wagner *et al.* 2001a, 2001b).

En capítulos previos de esta Tesis, se ha mencionado que cuando una abeja recolecta néctar de alta concentración de azúcar, retorna a la colmena y danza intensamente. Durante ese despliegue, las abejas melíferas presentan, en general, una elevada temperatura corporal (Stabenheiner y Haggmüller 1991, Stabentheiner 1996, Farina y Wainseboim 2001). Esta intensa actividad locomotora y la concomitante pérdida de calor promueven que ciertos hidrocarburos cuticulares sean liberados dentro de la colmena, estimulando así la activación de recolectoras inactivas (Thom *et al.* 2007). Es por ello que a partir de estos estudios se ha propuesto a estos compuestos como semioquímicos con función informacional o feromonas no glandulares. Además, cuando

una abeja recolecta alimento de una fuente de alta productividad, también eleva su temperatura corporal (Schmaranzer y Stabentheiner 1988, Farina y Wainelboim 2001).

A partir de estos elementos se plantea estudiar los perfiles de compuestos cuticulares (CCs) de *Apis mellifera* durante la recolección de recursos en fuentes de alimento artificiales, cuya productividad es variable. Sugerimos que estos compuestos volátiles ya estarían siendo liberados durante la recolección en la fuente de alimento, por lo que esperamos encontrar diferencias en los perfiles de CCs para abejas que estén explotando fuentes de alimento de alta o baja productividad. La presencia de variaciones entre las distintas condiciones de productividad en la fuente de alimento, permitiría el planteo de hipótesis referentes a comunicación química intraespecífica en el contexto recolector.

3.2 Materiales y métodos

Se utilizaron abejas pertenecientes a colmenas ubicadas en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Los análisis químicos fueron realizados en el Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Los experimentos se llevaron a cabo en marzo-abril 2011 y 2012.

3.2.1 Procedimiento experimental

Un grupo de abejas recolectoras fue adiestrado a un alimentador artificial colocado a unos 10m de una colmena comercial, que contaba con reina, cría y reservas. Una vez establecido un grupo de abejas recolectoras realizando sucesivos viajes, se comenzó con los experimentos.

En una primera instancia, el alimentador artificial utilizado durante el adiestramiento (alimentador *ad libitum*) fue reemplazado por alimentadores de flujo regulado que ofrecieron solución de sacarosa de concentración 1.8M sin olor a 2.5, 5, 11 μ l por minuto (ver Figura 3.1 a y b). Se permitió que las abejas ingirieran solución individualmente, de manera de asegurarnos que el flujo ofrecido fuera el que recibía la abeja. En una segunda instancia, en el alimentador artificial de adiestramiento, se ofreció solución de sacarosa (sin olor), *ad libitum*, de concentración 0.5M y 2M alternativamente. Para ambos tratamientos, variación de flujo o de concentración, una vez que las abejas ingirieron la solución, fueron capturadas individualmente antes de emprender el vuelo de regreso a la colmena, siendo inmediatamente sacrificadas con CO₂ y luego sometidas a un protocolo de extracción de compuestos cuticulares (CCs) (ver sección a continuación). Para el caso de la serie experimental en la cual se varió la concentración de solución de sacarosa se capturaron además abejas de colmena que no estuvieron presentes en el alimentador artificial. Es decir, trabajamos con 3 tratamientos: abejas que ingirieron solución de sacarosa de concentración 0.5M del alimentador artificial, abejas que

ingirieron solución de sacarosa de concentración 2M del alimentador artificial y abejas capturadas directamente en la colmena.

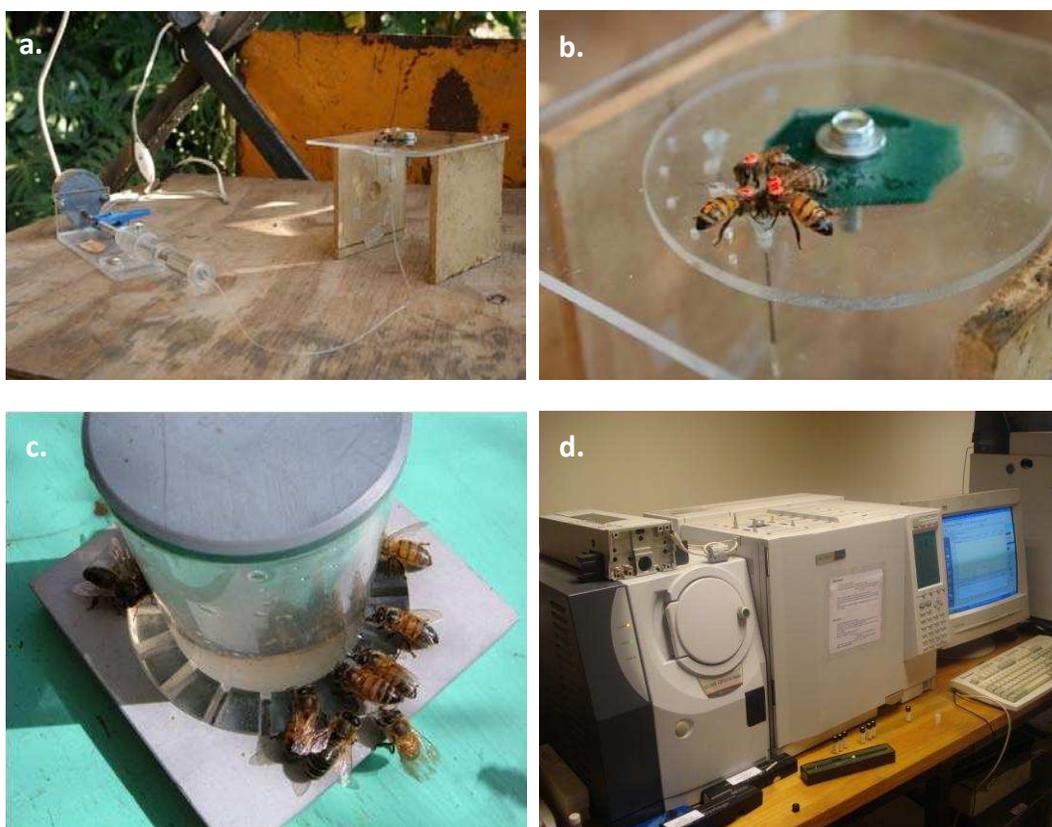


Figura 3.1. En *a* y *b*: abejas recolectando solución de sacarosa en el alimentador de flujo regulado; en *c*: abejas recolectoras en el alimentador artificial y en *d*: equipo de CG-MS perteneciente al Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química (UdelaR, Montevideo-Uruguay).

3.2.2 Procedimiento de Extracción

Como se mencionó en la sección anterior, las abejas fueron sacrificadas con CO₂, pesadas y luego sometidas al procedimiento de extracción de lípidos cuticulares. El mismo consistió en sumergir 5 abejas en viales de vidrio de 4 ml, conteniendo 3 ml de diclorometano (DCM) durante 1 min. Se añadieron 100 µl de tridecano (0.503 mg/ml solución de DCM) como estándar interno a cada muestra. Los extractos fueron concentrados utilizando una corriente de Nitrógeno para su posterior análisis bajo CG-MS (cromatógrafo gaseoso acoplado a espectrofotómetro de masa).

3.2.3 Análisis químico

El análisis CG-MS se realizó utilizando un GC-MS QP-2010 Shimadzu, equipado con una columna AT-5 MS (Alltech) (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm) y operado con un flujo portador constante de 1 ml/min (Helio). La temperatura del horno del CG fue programado de la siguiente forma: 70°C (1 min) hasta alcanzar los 150°C (1 min) a 10°C/min, alcanzando los 300°C a 5°C/min, y luego mantenido 5 min a 300°C. La temperatura del inyector fue de 250°C y la temperatura de interfase fue 310 °C. La inyección (1 µl) fue en modo “splitless” (tiempo de muestra: 1 min) y el espectro de masa fue adquirido de m/z 30 a 350, excepto para el extracto de derivatización DMDS, para el cual el espectro de masa fue adquirido de

m/z 30 a 550 (70 eV, modo scan). Para los cálculos de índice de retención, se inyectó una mezcla de n-alcenos (100 ppm de cada uno, en hexano) en modo “splitless”, usando el mismo programa de temperatura.

3.2.4 Análisis estadístico

En el caso de los resultados obtenidos para los alimentadores de flujo regulado y la primera aproximación al estudio de las variaciones en la concentración de solución azucarada ofrecida, no se realizó un análisis estadístico de los picos observados en los cromatogramas, sino que se llevó a cabo un estudio cualitativo de los mismos (Figura 3.2).

Para la segunda serie experimental, en donde se añadió el estándar interno a cada muestra, el área bajo cada pico (compuesto) fue determinada por integración manual. Aquellos compuestos que, en promedio, contribuyeron menos de un 1% del total del perfil químico fueron excluidos del análisis. A partir de esto, obtuvimos una lista de 58 compuestos presentes en las muestras (Tabla 3.1).

Para este último caso y con el objeto de analizar la relación entre los distintos tratamientos (0.5M, 2M y “Colmena”) con los hidrocarburos cuticulares presentes en las abejas tratadas, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP). El ACP es un análisis de estadística multivariada que permite reducir las numerosas variables del sistema en estudio en un reducido número de ellas que se presentan de manera ortogonal

(Factores) y que resumen adecuadamente la información original. Permiten revelar patrones no explícitos de los datos que no serían encontrados por análisis de cada variable por separado (Quinn y Keough 2002).

El ACP mostró una clara distancia entre las abejas de colmena y aquellas que ingirieron alguna de ambas concentraciones de solución de sacarosa (0.5M y 2M) y, también entre concentraciones. A partir del ACP dos factores (2 y 4) explicaron el 33,38% del total de la varianza de los datos. El Factor 1 explica el 14,96% de la variación, el Factor 2 (21,38% del total de la variación) explicaría la varianza generada entre los individuos de colmena y aquellos que ingirieron solución azucarada 0.5M o 2M. Por otro lado, el Factor 4 (11,50% del total de la varianza) parece dar cuenta de la varianza existente entre ambas concentraciones de solución de sacarosa (Figura 3.4).

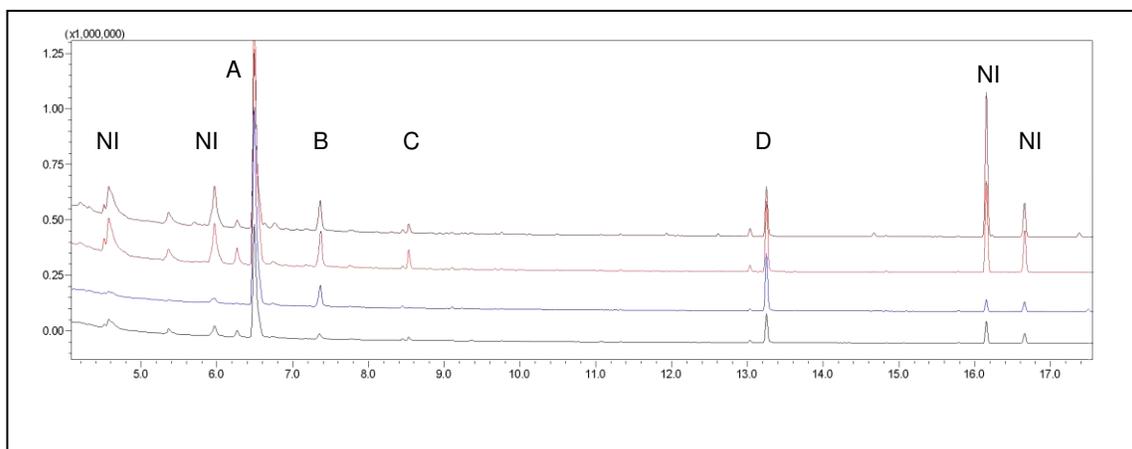
Compuestos presentes en las muestras (ordenados según tiempo de retención)	
1. 2-Nonanol	2. Benzil acetato
3. 2-Octenol acetato	4. 2-Nonan-2-il acetato
5. Trans-Geraniol	6. Tridecano (estándar interno)
7. Acido Geránico	8. Tetradecano
9. E-2-Decenil acetato	10. 1-Dodecanol
11. 1-Tetradecanol	12. Farnesol
13. Por identificar (1)	14. Por identificar (2)
15. 9-Nonadeceno	16. Nonadecano
17. Eicosano	18. Heneicosano
19. Docosano	20. 9-Eicosen-1-ol
21. Tricosadieno	22. 9-Tricoseno
23. 7-Tricoseno	24. Por identificar (3)
25. Tricosano	26. Tetracoseno
27. Tetracosano	28. Pentacosadieno
29. 9-Pentacoseno	30. 7-Pentacoseno
31. Por identificar (4)	32. Pentacosano
33. 11-Metil-pentacosano + 13-Metil-pentacosano	34. Hexacosano
35. Heptacosadieno	36. 9-Heptacoseno
37. 7- Heptacoseno	38. Heptacosano
39. 11-Metil-heptacosano + 13-Metil-heptacosano	40. Octacosano
41. Nonacosadieno	42. Por identificar (5)
43. 9-Nonacoseno	44. 7-Nonacoseno
45. Nonacosano	46. 11-Metil-nonacosano + 13-Metil-nonacosano + 15-Metil-nonacosano
47. Triacontano	48. Hentriacontadieno
49. 9-Hentriaconteno	50. 7-Hentriaconteno
51. Hentriacontano	52. 13-Metil-hentriacontano+ 15-Metil-hentriacontano
53. Dotriaconteno	54. X,Y-Tritriacontadieno
55. X-Tritriaconteno	56. Tritriacontano
57. Pentatriacontanadieno	58. Pentatriaconteno

Tabla 3.1. Compuestos cuticulares encontrados en abejas expuestas a fuentes de alimento de productividad variable.

3.3 Resultados

En la Figura 3.2a y 3.2b se muestran los resultados de la extracción de CCs de abejas que ingirieron solución azucarada 1.8M a distintos flujos de recompensa (2.5µl/min, 5µl/min, 11µl/min y *ad libitum*), y abejas que ingirieron solución de sacarosa 0.5M o 2M, además de abejas capturadas de colmena, respectivamente.

Los compuestos A, B, C y D están presentes en mayor cantidad relativa para los extractos de abejas alimentadas con altos flujos de recompensa (*ad libitum* y 11 µl/min), siendo éstos más reducidos para los flujos bajos (5 µl/min y 2.5 µl/min). En cambio, en el caso de abejas que ingirieron solución azucarada de distinta concentración, se evidencia la presencia de los compuestos A, B, C y D en abejas que ingirieron solución 2M.



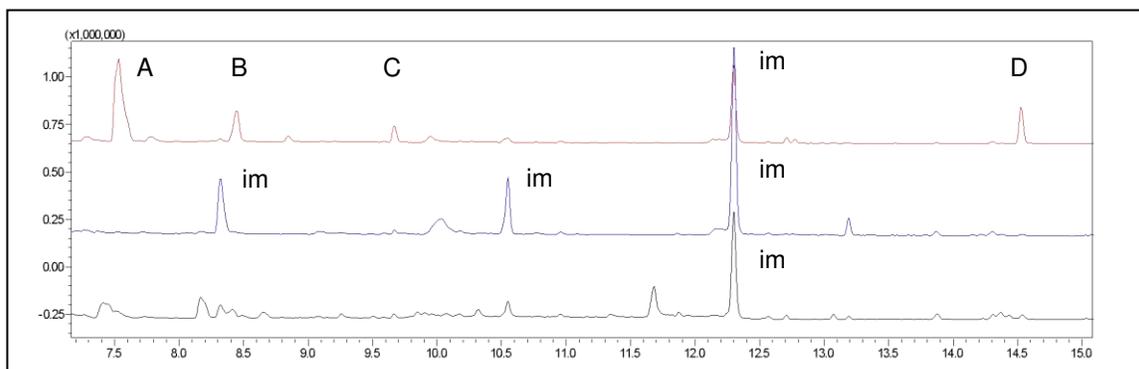
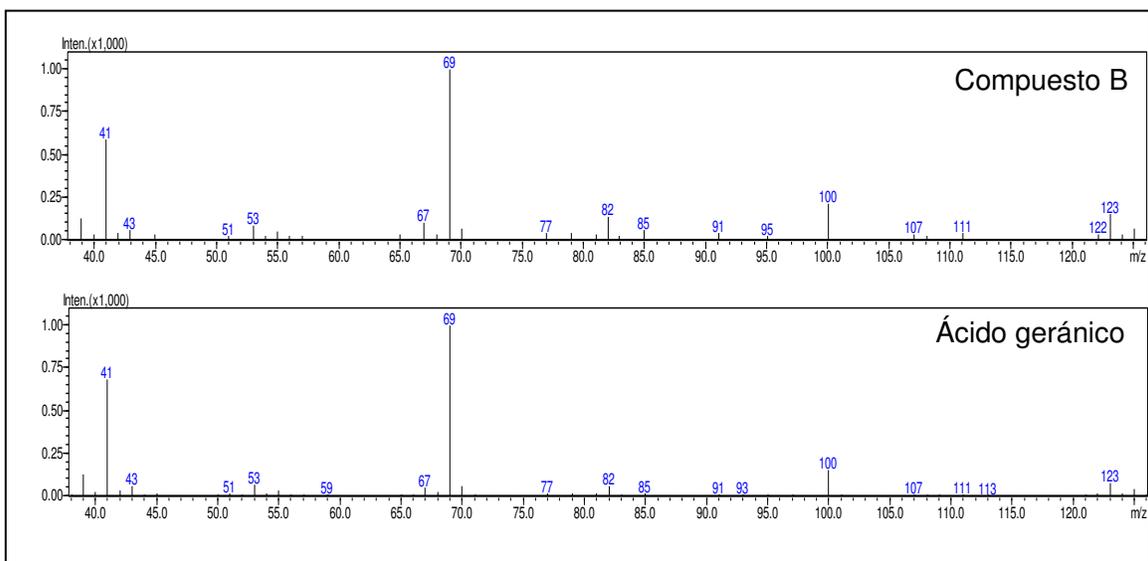
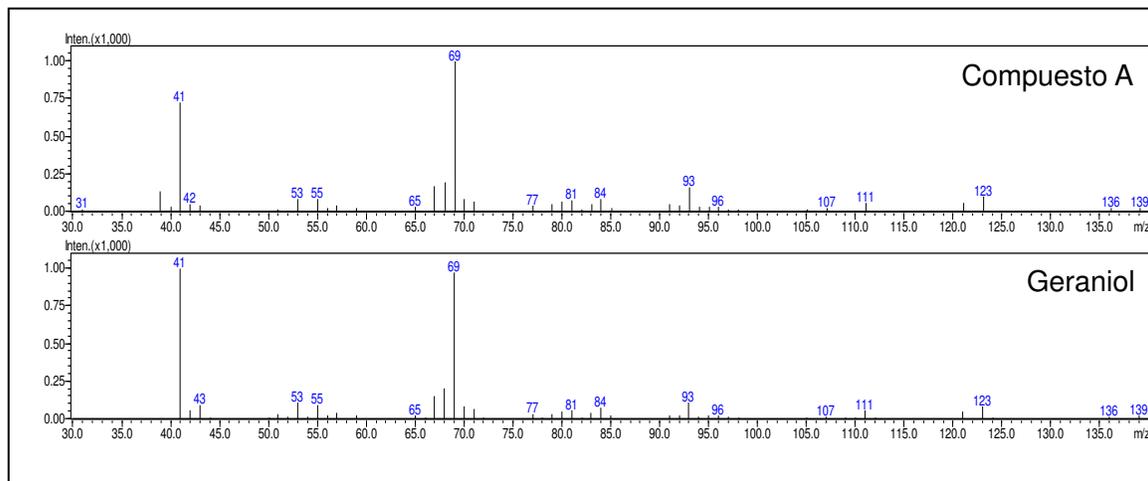


Figura 3.2. *a.* Cromatograma correspondiente a abejas que ingirieron solución de sacarosa 1.8M a distintos flujos de recompensa. De arriba abajo: ad libitum (violeta), 11 μ l/min (rojo), 5 μ l/min (azul) y 2.5 μ l/min (negro). *b.* Cromatograma correspondiente a abejas que ingirieron solución de sacarosa 0.5M (azul), 2M (rojo) y abejas capturadas directamente de la colmena (negro) A, B, C y D corresponde a compuestos identificados (ver Figura 3.3). NI: compuestos No Identificados. Im: impurezas.

Los compuestos presentes en ambos cromatogramas fueron identificados como: geraniol (A) (índice de similitud con la base de datos: 93/), ácido geránico (B) (índice de similitud con la base de datos: 93/), acetato de (E)-2-decenilo (C) (índice de similitud con la base de datos: 89/) y α -farnesol (D) (índice de similitud con la base de datos: 94/), además de otros compuestos cuya identificación está en desarrollo (NI) y la presencia de impurezas (im) (Figuras 3.2 y 3.3).

Los compuestos A, B, C y D corresponden a sustancias secretadas por glándulas exócrinas asociadas al reclutamiento de nuevos individuos (A, B y D, sustancias presentes en la glándula de Nasonov), o a alarma (C, sustancia presente en la glándula del aguijón). Las diferencias cualitativas encontradas entre A, B y D con la productividad de la fuente de alimento sugieren una modulación en la liberación de señales químicas asociadas al

reclutamiento diferencial; mientras que la presencia de C estaría relacionada con una situación de defensa, probablemente al momento de la captura.



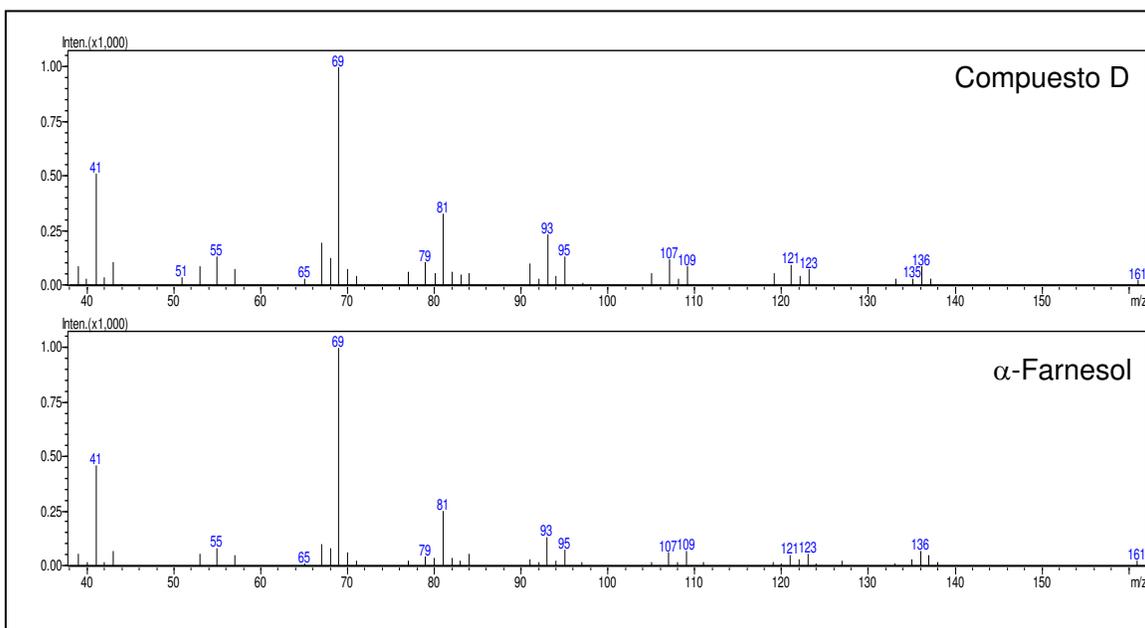
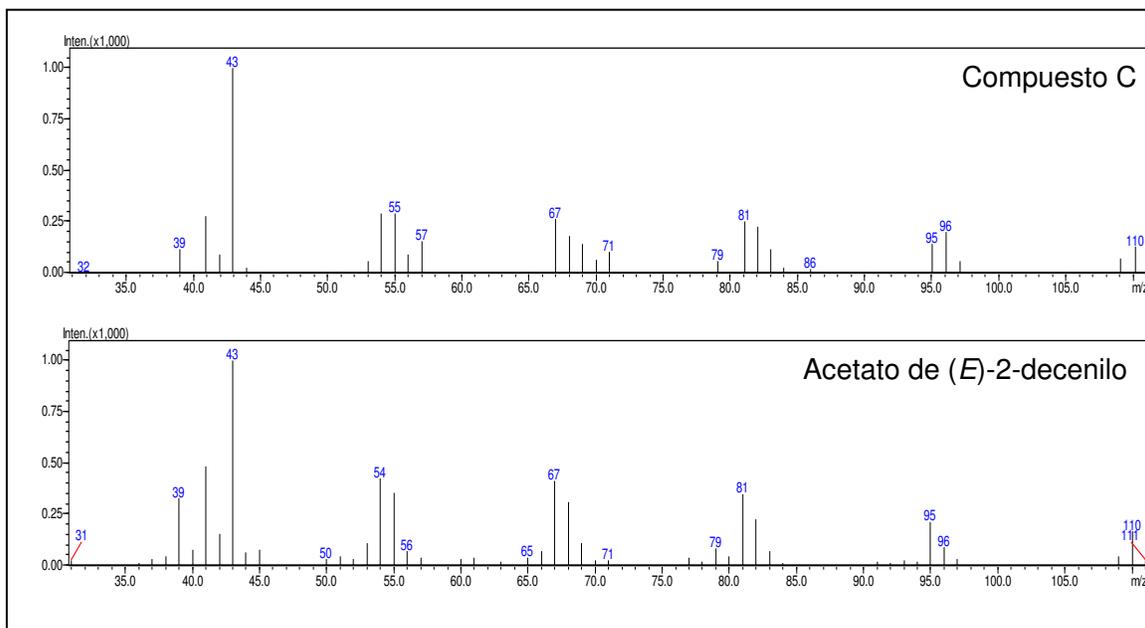


Figura 3.3. Espectros de masa correspondientes a los compuestos A, B, C y D respectivamente y su identificación.

A partir de los resultados cualitativos obtenidos en esta primera serie experimental, donde se evidenció la presencia de compuestos provenientes de glándulas exócrinas (Nasonov y glándula del aguijón) y, teniendo en cuenta el listado de compuestos cuticulares publicado por Schmitt y colaboradores (2007) en lo referido a volátiles liberados durante la recolección en una fuente de alimento, nos propusimos realizar un análisis más exhaustivo. Para ello, se llevó a cabo una segunda serie experimental en la cual, a cada muestra obtenida, se le añadió un estándar interno (tridecano) para su posterior estudio en CG-MS, permitiendo así un estudio cuantitativo de los compuestos hallados.

La figura 3.4 muestra el resultado obtenido a partir del APC. Se observa una diferencia de distribución entre los individuos que fueron capturados directamente de la colmena ("ColM") y aquellos que ingirieron solución de sacarosa ("05M" y "2M") (Factor 2) y, además, una diferencia entre aquellos individuos que ingirieron solución 0.5M o 2M (Factor 4). A partir de este resultado, encontramos que abejas de colmena presentan hidrocarburos más pesados (cadenas de entre 29 y 33 Carbonos), a diferencia de aquellas que ingirieron solución de sacarosa 0.5M o 2M, en las cuales se encuentran hidrocarburos más livianos (cadenas de entre 23 y 27 Carbonos). A su vez, en abejas que ingirieron solución de concentración 2M, encontramos nuevamente compuestos asociados a la glándula de Nasonov.

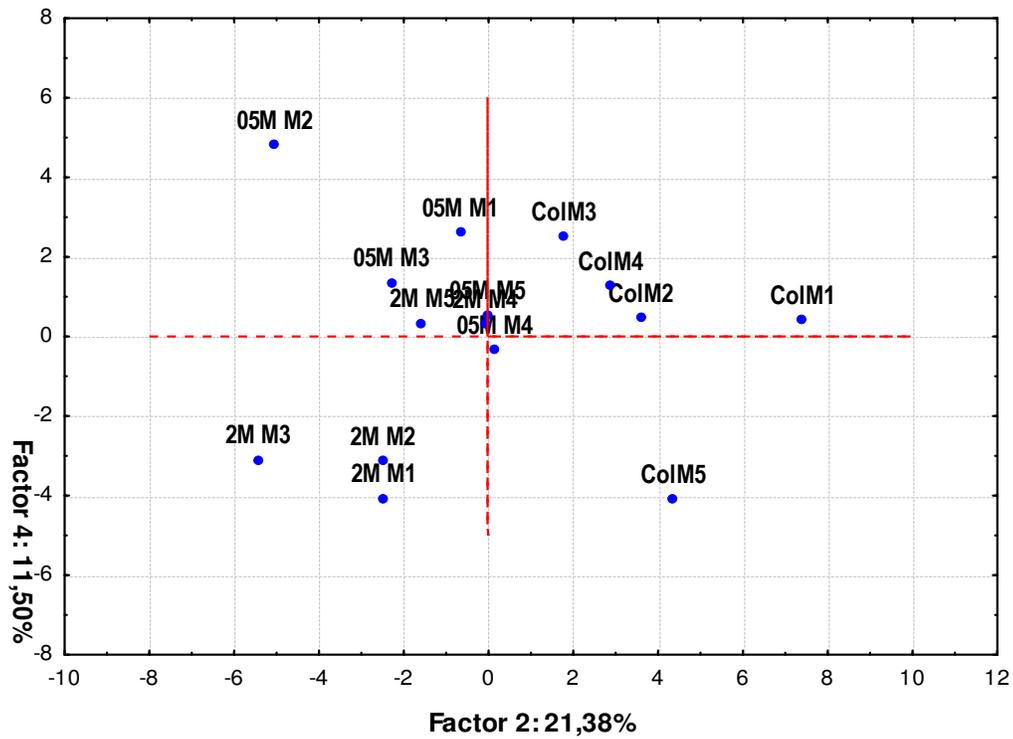


Figura 3.4. Resultado del Análisis de Componentes Principales (ACP). El Factor 2 separa entre aquellas abejas que pertenecen a la colmena (ColM) y las que ingirieron solución en el alimentador (05M y 2M). Mientras que el Factor 4 separa entre las abejas que ingirieron solución 0.5M y aquellas que ingirieron solución 2M.

Con lo expuesto en este capítulo, se sugiere que podría existir una correlación entre el perfil de compuestos cuticulares de las abejas explotando una fuente de alimento y la productividad de esta última, teniendo un valor comunicacional que podría tener un rol importante al momento del reclutamiento.

3.4 Discusión

Como se ha mencionado en la introducción de este capítulo, Kather y colaboradores (2011) encontraron diferencias en los lípidos cuticulares de *Apis mellifera* según la tarea que las abejas obreras desempeñen (abejas recién emergidas, niñeras o recolectoras). Además de proponer un cambio en los alcanos cuticulares entre aquellas abejas que permanecen en el nido y aquellas que comienzan a realizar tareas de recolección, el cual sería debido a los cambios de humedad y temperatura a la que estos individuos están expuestos. Por su parte, Thom y colaboradores (2007), proponen cuatro hidrocarburos cuticulares (Z-(9)-tricoseno, tricosano, Z-(9)-pentacoseno y pentacosano) que son emitidos por las abejas que danzan dentro de la colmena, los cuales no se encuentran en abejas no danzarinas, e incrementan el número de recolectoras que abandonan la colmena en busca de la fuente de alimento. Esto se debe a que una abeja que haya encontrado una fuente de alimento muy productiva, danzará con mayor intensidad que aquella que haya encontrado una fuente menos productiva. De este modo, se eleva la temperatura corporal (Farina y Wainelboim 2001), promoviendo la liberación de los cuatro hidrocarburos antes mencionados.

Los resultados aquí mostrados son consistentes con lo antedicho, siendo novedosos en cuanto a que el patrón de hidrocarburos cuticulares encontrado pareciera ser distinto de acuerdo a la productividad de la fuente de alimento que está siendo explotada (0.5M, 2M) y no sólo debido a cambios en la cutícula relacionados con el cambio de tareas, como proponen Kather y colaboradores (2011). Es decir, encontramos

que a mayores niveles de actividad y/o productividad de la fuente de alimento, menor sería el largo de la cadena de los hidrocarburos presentes en los perfiles obtenidos. Además, por la intensa actividad locomotora, se incrementa la volatilidad de estos compuestos y se promueve su mayor dispersión.

Lo expuesto en el presente capítulo es una primera aproximación al estudio de los hidrocarburos cuticulares que pueden estar involucrados en el contexto de reclutamiento de *Apis mellifera*, de manera que es necesario seguir avanzando en su estudio. Para ello, nos proponemos nuevos experimentos para las siguientes temporadas, que involucren la utilización de fibras absorbentes de volátiles (SUPELCO SPME Portable, Field Sampler) y dispositivos especiales (Schmitt *et al.* 2007) que nos permitan la toma de muestras de volátiles que emite la abeja recolectora en el momento de la ingesta en un ambiente controlado, además de ser posible tomar muestras de los compuestos cuticulares poniendo en contacto directo las fibras con el tórax y abdomen de las abejas recolectoras.

4

Los umbrales de respuesta a estímulos quimiosensoriales en el contexto de la danza de reclutamiento

4.1 Introducción

Se ha propuesto que una de las causas por la que ocurre la división de tareas en insectos eusociales, es que los individuos presentan diferentes umbrales de respuesta frente a estímulos que liberan una respuesta comportamental (Robinson 1987; Robinson y Page 1989; Bonabeau *et al.* 1996). Por ejemplo, en abejas, el pasaje desde tareas dentro de la colmena hacia recolectar fuera de ella es propuesto como el reflejo de cambios en las respuestas a estímulos que provocan la realización de la nueva tarea (Lindauer 1948; Seeley 1989).

El estudio de umbrales de respuesta en abejas melíferas se basa en la respuesta refleja de la extensión de la probóscide (REP) frente a la estimulación con solución azucarada en las antenas (Kuwabara 1957). De esta manera, es posible cuantificar el grado

de sensibilización al azúcar de los individuos. Es decir, el umbral de respuesta a azúcar (URA) puede ser estimado por la concentración más baja que causa la extensión de la probóscide, en una serie creciente de concentración de solución azucarada (Page *et al.* 1998).

Los URA de abejas jóvenes (pre-recolectoras) se asocian con sus elecciones recolectoras posteriores, sugiriendo que existen factores genéticos que afectan esta respuesta (Pankiw y Page 2000; Pankiw *et al.* 2004). Obreras jóvenes que se convierten en recolectoras de polen tienen bajos umbrales de respuesta, mientras que aquellas que recolectan néctar poseen altos umbrales (Page *et al.* 1998; Pankiw y Page 1999). Sin embargo, los URA también son modulados por la ingesta de solución azucarada. Aquellas abejas que se alimentan de solución azucarada de alta concentración presentan umbrales más altos que aquellas que se alimentan con baja concentración de azúcar (Pankiw *et al.* 2001, 2004). Además, se determinó que la sensibilidad gustativa de las abejas de colmena ubicadas en el área de descarga, específicamente aquellas encargadas de recibir el néctar cosechado por las abejas recolectoras y procesarlo (abejas “procesadoras de alimento”), depende de la concentración de azúcar recibida. Es decir, a mayor concentración de azúcar recolectado y luego transferido, mayor es el umbral de respuesta al azúcar de las abejas procesadoras (Martínez y Farina 2008). Estas evidencias sugieren que la sensibilidad gustativa se ve afectada por factores genéticos pero es modulada por factores ambientales, como la calidad del recurso incorporado a las colmenas. La sensibilidad gustativa correlaciona con el aprendizaje de tipo asociativo, es decir, los umbrales de respuesta al estímulo excitatorio afectan la fuerza de contingencia entre el estímulo

incondicionado (EI) y el estímulo condicionado (EC) (Schneider *et al.* 2001). Durante el establecimiento de esta asociación entre los dos estímulos, ocurre un proceso de sensibilización al estímulo excitatorio, en este caso, al azúcar (Ramírez *et al.* 2010). Las abejas con mayor sensibilidad gustativa (menores URA) presentan mejores tasas de aprendizaje olfativo como táctil (Schneider *et al.* 1999). Los niveles motivacionales del individuo aumentan producto de la recompensa, alcanzando un estado de “arousal” (Hammer y Menzel 1995) que incrementa la respuesta ante determinados estímulos. Además, altos niveles de recompensa aumentarán los valores de atención (proceso cognitivo multidimensional que incluye la habilidad de seleccionar y enfocarse en un aspecto del ambiente mientras otros son ignorados, James 1890; Gaddes y Edgell 1994) permitiendo acelerar la adquisición de información en el corto plazo (Hammer 1997). Por su parte, cuando una recolectora exitosa regresa a la colmena y danza con intensidad, aumenta la atención de sus compañeras de nido. De este modo, la danza también podría estar influyendo sobre el “arousal” de las abejas seguidoras.

Por otro lado, como se ha mencionado en la Introducción de esta Tesis, las abejas melíferas poseen la capacidad de evocar memorias que fueron establecidas en un contexto, por ejemplo, al recolectar néctar de las flores, en otro contexto completamente diferente, como ser estando amarradas bajo condiciones laboratorio (Gerber *et al.* 1996; Sandoz *et al.* 2000, Farina *et al.* 2005, 2007; Grüter *et al.* 2006, 2009).

Con todo lo expuesto, y teniendo en mente que un cambio en los umbrales de respuesta indicaría o bien niveles motivacionales de las abejas seguidoras de danza o bien variaciones en sus niveles de “arousal” (en ambos casos, se facilita la adquisición de

información), nos propusimos desarrollar un ensayo que permita evaluar respuestas quimiosensoriales en el contexto de danza y estudiar de qué manera esta última afecta los umbrales de conducta de las abejas seguidoras, explotando la habilidad que poseen las abejas de no restringir lo aprendido a un contexto determinado sino de poder evocarlo fuera del mismo.

4.2 Materiales y métodos

Una colonia de 3000-3500 abejas *Apis mellifera* fue confinada a una colmena de observación de dos cuadros. La colonia contaba con reina, cría y reservas. A diferencia de las colmenas de observación descritas en otros capítulos de esta Tesis, esta colmena no poseía paredes de acrílico, es decir, se trataba de una colmena de observación abierta, de manera que permitía la captura directa de los individuos. La colmena fue instalada dentro de una casilla de madera de 1.50m x 1.50m x 2m en total oscuridad (Fig. 4.1a), excepto al momento de realizar los ensayos, donde se encendía una luz roja. La casilla permitía la salida de las abejas hacia el exterior a través de un orificio en conexión directa con la piquera.

El experimento fue realizado entre diciembre del 2010 y febrero del 2011 en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.



Figura 4.1. *a.* Casilla de madera donde se encontraba la colmena de observación utilizada. *b.* Colmena de observación.

4.2.1 Procedimiento experimental

Con el objeto de cuantificar diferentes niveles de seguimiento de danza, se evaluó la presencia de danzarinas provenientes de fuentes naturales y se comenzó con el ensayo. . Se capturaron, directamente de la colmena de observación (Fig. 4.1b y Fig. 4.2), abejas que siguieron danzas de abejas recolectoras de néctar durante 3 o menos contoneos (“SN<3”) o durante más de 3 contoneos (“SN>3”). Además, se capturaron abejas que no siguieron ninguna danza que se encontraban en un área alejada de la entrada de la colmena (“AA”).



Figura 4.2. Captura de abejas desde la colmena de observación.

Las abejas fueron capturadas utilizando un aspirador (Fig. 4.2) e inmediatamente colocadas en tubos plásticos, donde fueron anestesiadas con CO_2 . Luego se las encepó en tubos de metal (Fig. 4.3), que sólo permitían el libre movimiento de las antenas y las piezas bucales, y se las dejó en reposo, durante una hora, en una incubadora en oscuridad bajo condiciones de temperatura y humedad reguladas (32°C y 55%).

Una vez concluido este período de reposo, se procedió a realizar el protocolo de umbrales de respuesta a azúcar (URA). El mismo consiste en evaluar la respuesta de extensión de probóscide (REP) de las abejas frente a la presentación de agua y concentraciones crecientes de solución de sacarosa (Fig. 4.3). El reflejo de extensión de la probóscide puede ser utilizado para estudiar la sensibilidad de la abeja variando la

concentración de la solución de sacarosa presentada (Page *et al.* 1998; Pankiw y Page 1999). La concentración más baja a la cual la abeja responde extendiendo la probóscide es interpretada como su “sensibilidad al azúcar”.

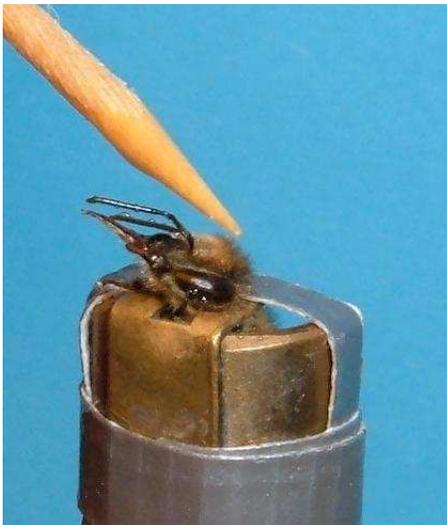


Figura 4.3. Abeja encepada. Se observa la respuesta de extensión de la probóscide al contactar las antenas con un palillo embebido con azúcar.

La serie a seguir fue: agua, 0.1/ p/p, agua, 0.3/ p/p, agua, 1/ p/p, agua, 3/ p/p, agua, 10/ p/p, agua, 30/ p/p, agua, 50/ p/p. Las abejas fueron testeadas de a una por vez, en orden secuencial: primero, todas las abejas fueron testeadas para el agua, luego todas fueron testeadas para 0.1/ p/p y así sucesivamente (Page *et al.* 1998). Siempre se las testeó en orden creciente de concentración de sacarosa de manera de reducir la

posible sensibilización que podría ocurrir al usar altas concentraciones de sacarosa. La presentación del agua sirve como control del potencial efecto de la estimulación repetida de sacarosa que podría llevar a un incremento en la sensibilización o habituación, afectando las subsecuentes respuestas, además que evita posibles confusiones por efecto de la sed. A aquellas abejas que responden al agua, se les permite beber hasta saciarse. En cambio, si responden ante la presentación de la solución de sacarosa, no se las alimenta. El intervalo de tiempo entre una presentación y otra fue de aproximadamente 3 minutos. Se registró la proporción de abejas que respondieron a las distintas concentraciones de sacarosa y se obtuvo un puntaje de REP para cada abeja. El puntaje es el número de concentraciones para las cuales la abeja extendió la probóscide y correlaciona con el umbral de respuesta porque los animales normalmente responden a todas las concentraciones por encima de su umbral (Pankiw *et al.* 2004). Esta respuesta se cuantifica de 1 a 7: un puntaje de 1 indica que una abeja sólo respondió al contacto con solución de sacarosa 50% p/p, mientras que un puntaje de 7 indica que la abeja respondió a las siete concentraciones presentadas. Cabe destacar que la mayoría de las abejas que respondieron a bajas concentraciones de sacarosa también extendieron su probóscide frente a las de mayor concentración. Si una abeja no respondió frente a una concentración de sacarosa determinada, pero sí lo hizo frente a las concentraciones inmediatamente anterior y posterior, el score registrado se corresponde con la mínima concentración de sacarosa a la cual el individuo respondió.

4.2.2 Análisis estadístico

La sensibilidad gustativa fue cuantificada utilizando el puntaje URA. Dichos puntajes se compararon para cada una de las categorías de abejas seguidoras de danza (AA, SN<3 y SN>3) por medio de una prueba de Kruskal-Wallis, ya que los datos no cumplieron con los supuestos de homogeneidad de varianza (Sokal y Rohlf 2000).

4.3 Resultados

En la Figura 4.4 se muestran las curvas (Figuras *a* y *b*) y el puntaje (Figuras *c* y *d*) de respuesta al azúcar obtenidos para cada categoría de abejas seguidoras de danza. No se encontraron diferencias significativas al comparar los URA de los distintos grupos (AA, SN<3, SN>3) (Kruskal-Wallis: $H=1,574438$, $N= 67$, $p =,4551$). Sin embargo, las curvas de respuesta con el incremento de la concentración ofrecida presentan variaciones según las categorías comportamentales elegidas. Se observa, además, una tendencia a encontrar un puntaje menor en aquellas abejas no seguidoras de danza (puntaje=2) respecto a aquellas que sí lo hicieron (puntaje=3) (Fig. 4.4c y d). Es decir, las abejas que siguieron danzas tendieron a presentar mayores puntajes URA que aquellas que no lo hicieron. Dado que las abejas seguidoras están más motivadas a adquirir información, la tendencia aquí

encontrada podría interpretarse como una mayor sensibilización frente a una clave vinculada con el recurso, como ser la gustativa. De ser así, podría interpretarse como una estrategia favorable en un contexto de reclutamiento, donde las expectativas de una abeja seguidora son menores que las de abejas que se encuentran alejadas de la zona de descarga, de modo que bastaría con seguir algunos contoneos para involucrarse en el ciclo recolector fuera de la colmena.

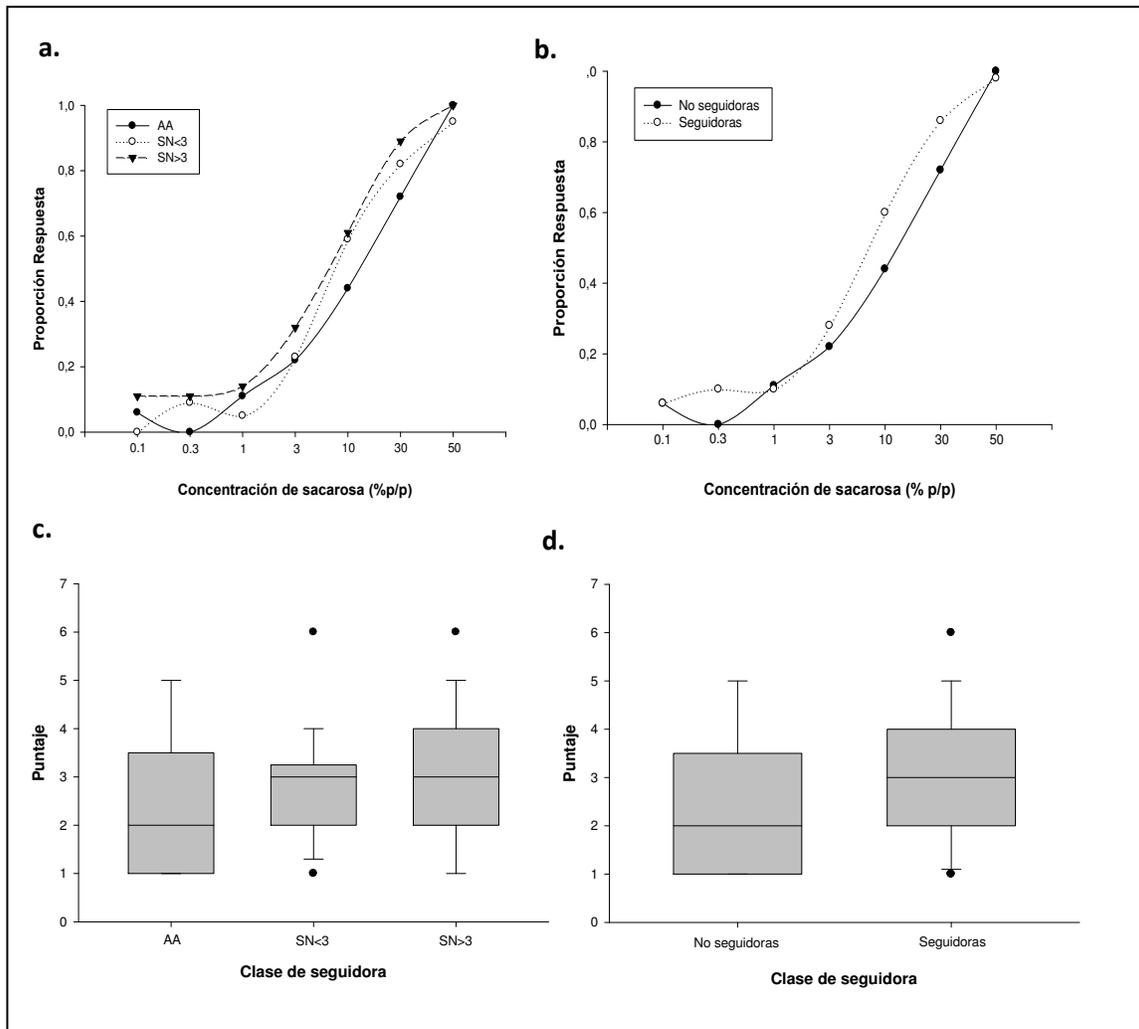


Figura 4.4. Distribución respuestas al azúcar. Arriba: las líneas indican la proporción acumulada. Abajo: puntaje de URA para cada grupo. (AA: área alejada (N= 18); SN<3 (N=22): seguidoras de 3 o menos contoneos, SN>3 (N=22): seguidoras de más de 3 contoneos).

4.4 Discusión

Si bien no se han encontrado diferencias significativas en los resultados obtenidos en este ensayo, parece oportuno presentarlos debido a las implicancias que pueden tener en una situación natural. La toma de estos datos es compleja, viene acompañada de una gran mortalidad, y la captura de abejas seguidoras de danza no es nada sencilla, como puede serlo la captura de una abeja inmóvil mientras recibe alimento mediante trofalaxia (Farina *et al.* 2007, Martínez y Farina 2008). Sin embargo, estos resultados abren la posibilidad de realizar nuevos ensayos bajo condiciones más controladas y que permitan obtener conclusiones más sólidas. Los presentes resultados muestran una tendencia en la que aquellas abejas que no siguen danza presentan un puntaje más bajo (mayor umbral) respecto de aquellas que sí lo hacen. De esta manera, las abejas podrían incrementar su nivel de sensibilidad al azúcar recompensado, ya sea siguiendo danzas o permaneciendo cerca de ese entorno comunicacional (von Frisch 1967). Uno de los componentes informacionales de la danza de las abejas es la predisposición a responder a la información (von Frisch 1923; Grüter y Farina 2009). Es decir, este entorno comunicacional afectaría el nivel motivacional de las abejas del entorno aumentando la probabilidad o el nivel de muchas respuestas a otros estímulos, alcanzando un estado de excitación (“arousal”), que es de corta duración, pero puede acelerar los procesos de adquisición de información (Hammer y Menzel 1995). En otras palabras, un alto nivel motivacional y un adecuado nivel de “arousal” facilitarían la adquisición de la información transmitida en la danza de reclutamiento. Esto tiene sentido si se tienen en cuenta trabajos que reportan que la

danza de las abejas atrae no sólo a potenciales abejas recolectoras (von Frisch 1967; Seeley 1995) sino también a procesadoras de alimento, las cuales reciben la descarga de las recolectoras (Farina 2000).

Por otro lado, los umbrales de respuesta al azúcar de las abejas involucradas en la recepción de néctar dentro de la colmena, se modifican de acuerdo a la calidad del alimento (Martinez y Farina 2008). Es decir, abejas que reciben una solución azucarada de baja concentración por parte de las recolectoras, muestran alto puntaje (bajo umbral) mientras que aquellas que reciben solución azucarada de alta concentración presentan un alto umbral (bajo puntaje). La relación entre la calidad del alimento entrante y la sensibilidad de la abeja receptora podría funcionar de manera tal que, receptoras con alto URA rechacen a recolectoras que cargan alimento de baja calidad, mientras que aquellas receptoras con bajo URA acepten un amplio rango de calidad de alimento. Es decir, tener altos umbrales de respuesta implica que la probabilidad de aceptación de alimento por parte de las procesadoras, sea baja. De esta manera, la colonia de abejas tiene la habilidad de dirigir su fuerza de recolección hacia la mejor fuente de alimento encontrada en el área que está siendo explotada (Seeley 1995).

Con todo esto, el hecho de poder medir umbrales de azúcar en referencia a lo aprendido dentro de la colmena, es una evidencia más de la capacidad que poseen las abejas de poder transferir información adquirida en un contexto a otro que poco se le parece. En nuestro caso, abejas que se encontraban dentro de la colmena bajo condiciones naturales, siguiendo danzas o no, fueron capturadas y sus URA evaluados en condiciones de laboratorio (encepadas).

Para finalizar, nuestro estudio se plantea como una aproximación metodológica para profundizar en el análisis del estado motivacional de los individuos previo a la actividad recolectora inmediata, el cual es necesario seguir desarrollando para mejorar los resultados obtenidos; así como también es necesario desarrollar procedimientos que permitan estudiar la transferencia de memorias olfativas aprendidas dentro del contexto de la danza a otros contextos, como ser bajo condiciones de laboratorio.

5

Los aromas florales aprendidos dentro de la colmena tienen un efecto a largo término en el reclutamiento

5.1 Introducción

Los animales sociales usan numerosas señales para guiar a co-específicos hacia un objetivo particular (Wilson 1971; Bradbury y Vehrencamp 1998). El comportamiento de comunicación mejor estudiado en invertebrados es la danza de contoneo de las abejas (von Frisch 1967). Abejas recolectoras exitosas despliegan un movimiento en forma de “8” sobre la cera del panal, proveyendo a sus compañeras de nido de información acerca de la localización del sitio de alimentación recientemente explotado. La eficiencia de la danza

como estrategia de reclutamiento, sin embargo, depende parcialmente de la concomitante transferencia de información olfativa de la danzarina hacia sus seguidoras (von Frisch 1923; Lindauer 1971; Farina y Wainseboim 2005; Grüter y Farina 2009a).

Durante el reclutamiento hacia fuentes de alimento aromatizadas, las compañeras de nido pueden aprender ese olor del cuerpo de las recolectoras exitosas mientras danzan (von Frisch 1967) y de las muestras de alimento transferidas a través de trofalaxia (Farina *et al.* 2005, 2007; Gil y De Marco 2005). La memorización de claves olfatorias dentro del nido puede, a su vez, ayudar a las abejas reclutadas a localizar el sitio de alimentación advertido (Capítulo 2 de esta Tesis). Además, el influjo de alimento aromatizado afecta no sólo a las recolectoras sino también a obreras jóvenes de edad pre recolectora (Grüter *et al.* 2006) que experimentaron el olor del alimento mientras realizaban tareas dentro del nido (Lindauer 1952; Seeley 1982). Experiencias olfativas en obreras de edad pre recolectora podrían ser importantes en el futuro reclutamiento y el comportamiento de búsqueda. Abejas jóvenes de colmena pueden recuperar memorias asociativas hasta 10 u 11 días después del influjo de néctar aromatizado al nido (Grüter *et al.* 2009). Memorias olfativas establecidas desde unos pocos días después de la emergencia del imago pueden, de hecho, ser recuperadas a edades recolectoras (ej. cuando las abejas comúnmente inician las actividades de recolección) incluso 9 a 12 días después de la circulación de alimento aromatizado dentro de la colmena (Arenas *et al.* 2008, 2009a, b). Hasta ahora, no hay evidencia que muestre que las memorias olfativas adquiridas dentro de la colmena a edades pre recolectoras afecten el subsecuente reclutamiento.

Dentro del contexto de danza, abejas entrenadas a recolectar de un alimentador aromatizado pueden ser rápidamente reactivadas a reanudar la explotación de la fuente de alimento conocida después de haber seguido danzarinas que llevaban consigo el olor presentado en el alimentador (von Frisch 1923; Lindauer 1971). Sin embargo, si abejas que sólo experimentaron estos olores dentro de la colmena, de modo que no tuvieron experiencia acerca de la localización de la fuente de alimento advertida, pueden ser más fácilmente reclutadas por danzarinas que cargan el olor previamente experimentado, necesita ser investigado.

Aquí estudiamos si experiencias con olores dentro de la colmena pueden modificar los patrones de interacción entre las danzarinas y las seguidoras expuestas a alimento con olor 8 días antes. Pensamos que, después del establecimiento de memorias olor-recompensa a través del influjo de néctar aromatizado, las abejas seguidoras tenderían a seguir danzas en las cuales la abeja reclutadora presente el olor ya experimentado dentro del nido. También nos propusimos estudiar diferencias en la ocurrencia de esas interacciones según la edad a la cual las seguidoras experimentaron el olor por primera vez. Finalmente, se evaluó el efecto de las memorias olfativas formadas dentro de la colmena en el reclutamiento hacia locaciones de alimento señaladas.

5.2 Materiales y métodos

Para analizar los patrones de interacción de las abejas con experiencia olfativa dentro de la colmena durante las danzas, se suplió a las colonias diferentes grupos de obreras recién emergidas identificadas con una marca de color en el tórax. Se esperaba que las obreras marcadas fueran encontradas siguiendo danzas en los subsecuentes días. Estos grupos fueron incorporados de manera que el influjo de alimento con olor (solución de sacarosa aromatizada cargada por recolectoras entrenadas hacia la colmena) tuvo lugar a edades pre recolectoras particulares de la vida de las abejas. Mucho después, cuando la mayoría de esas abejas estaban prontas a iniciar la búsqueda de alimento o ya estaban realizando esta tarea, se monitorearon a fin de analizar qué danzas seguían en su mayoría: (1) danzas realizadas por abejas que traían olores que las abejas habían experimentado 8 días antes en la colmena o (2) danzas realizadas por abejas que traían un olor novedoso. Para descartar cualquier preferencia por las danzas debido a la localización de los sitios de recolección, las interacciones dentro de la colmena fueron también registradas bajo una situación “sin olor”, esto quiere decir que las danzarinas recolectaban solución sin aromatizar. Para estudiar el éxito del reclutamiento de las danzas “con olor”, se contó el número de arribos a los sitios señalados.

5.2.1 Sitio de estudio y animales

Los experimentos fueron realizados de Febrero a Abril del 2010 y 2011 en el Campo Experimental de la Universidad de Buenos Aires. Tres colonias de *Apis mellifera* L. fueron confinadas en 3 colmenas experimentales de observación (C1, C2 y C3) de dos cuadros cada una. Las colmenas de observación contaban con reina, cría y reservas; estaban abiertas de manera que las abejas recolectoras tuvieron libre acceso a flores naturales.

Durante 24 días consecutivos, suplimos a las colonias con obreras recién emergidas de cuadros de cría sellados, mantenidos en incubadora (temperatura: 36°C y humedad relativa: 55/). Antes de ser introducidas en las colmenas, las abejas fueron marcadas con un punto de color en el tórax utilizando marcadores permanentes (Uni, Mitsubishi Pencil Co., Ltd, Tokyo). Usamos diferentes colores cada 2 o 3 días para identificar los grupos de abeja por edad (Figura 5.1). Durante este periodo, incorporamos aproximadamente 2000 abejas recién emergidas en cada una de las colonias, a través de jaulas conectadas a una apertura lateral de las colmenas de observación.

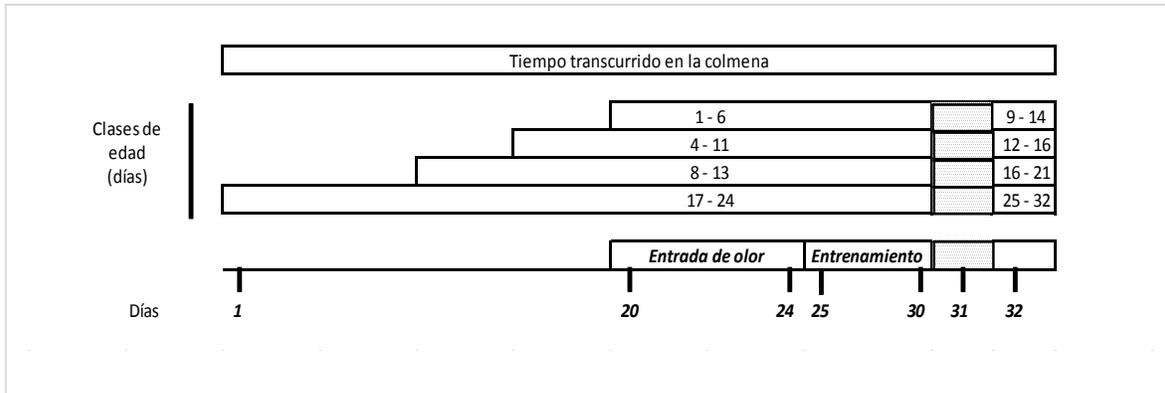


Figura 5.1. Procedimiento experimental durante un periodo de 32 días. Durante los primeros 24 días, abejas recién emergidas fueron marcadas con color e incorporadas en las colmenas de observación a diario. Las fases experimentales (Entrada de olor, Entrenamiento y Evaluación) comenzaron en el día 20. En gris se indica el uso de un olor puro (fenilacetaldéhid, FEN o linalol, LIO) para aromatizar solución de sacarosa (1.8M, 50 ml/litro). Para las colmenas 1 y 3, el olor experimentado fue FEN, mientras que LIO lo fue para la colmena 2. La fase de Entrada de olor duró 5 días. Dentro de ese periodo, encontramos abejas marcadas (abejas con experiencia dentro de la colmena) representando diferentes edades de estimulación (en días; barras grises). En esta fase, un grupo de recolectoras numeradas fue adiestrado a recolectar solución azucarada con olor de un alimentador colocado a una distancia de 5-10m de la colmena. Durante la fase de Entrenamiento, un nuevo grupo de abejas recolectoras fue adiestrado a recolectar solución de sacarosa de dos alimentadores (A1 y A2) ubicados a 80m de la colmena. La fase de Evaluación se dividió en dos partes: situación sin olor (día 31; punteado) y situación con olor (día 32, gris). En cada fase, se permitió que sólo una abeja focal por alimentador recolectara solución. Las clases de edad de las abejas con experiencia dentro de la colmena al día 32 también fueron registradas.

5.2.2. Procedimiento experimental

El experimento constó de tres fases: la Fase de Entrada del olor (días 20 a 24), la Fase de Entrenamiento (días 25 a 30) y la Fase de Evaluación (días 31 y 32) (ver Figuras 5.1, 5.2 para detalles).

Durante la Fase de Entrada del olor, alimento aromatizado fue introducido a la colonia a través de abejas recolectoras para establecer memorias olor-recompensa naturales en las abejas de la colmena. Estudios previos han usado este procedimiento exitosamente en abejas jóvenes (Farina *et al.* 2005, 2007; Grüter *et al.* 2006, 2009). En esta fase experimental, 15 a 20 recolectoras por colonia fueron adiestradas a un alimentador artificial (A0) colocado cerca de la colmena (5-10m). Estas abejas fueron numeradas con etiquetas plásticas (Opalithplättchen) colocadas en el tórax, para su identificación individual. Durante la fase de Entrada del olor, las abejas numeradas recolectaron 14 ml de solución azucarada 1.8M aromatizada por día, durante 5 días consecutivos. Esta solución fue aromatizada con 50 ml de olor puro por litro de solución. Las recolectoras de las C1 y C3 recolectaron solución aromatizada con Fenilacetaldéhidó (FEN), mientras que las recolectoras de la C2 recolectaron solución aromatizada con Linalol (LIO). Se permitió que sólo las abejas numeradas individualizadas recolectaran solución aromatizada de ese alimentador. Asumimos que la solución recolectada (70 ml) durante este período de 5 días fue incorporado a las colmenas. Cuatro grupos de edad de obreras marcadas con color pudieron identificarse durante la Fase de Entrada del olor: 1 a 6, 4 a 11, 8 a 13 y 17 a 24 días de edad (Figuras 5.1).

A lo largo de la Fase de Entrenamiento (días 25 a 30), otros dos grupos de recolectoras (15-30 abejas recolectoras diferentes a las abejas jóvenes introducidas en los días previos) fueron entrenados a visitar dos alimentadores lejanos: alimentador 1 (A1) y alimentador 2 (A2). A1 y A2 fueron colocados a una distancia de 70m entre ellos y a 80m de la colmena, ambos ofrecieron solución azucarada (1.8M) sin olor *ad libitum*. Estas

recolectoras adiestradas durante la Fase de Entrenamiento, que se convertirían en las abejas reclutadoras durante la Fase de Evaluación, fueron numeradas con etiquetas plásticas para su identificación individual, según el alimentador visitado.

Durante la Fase de Evaluación, las recolectoras reclutadas fueron rigurosamente monitoreadas durante sus estadías dentro del nido, entre viajes de recolección, y se registraron las interacciones con sus compañeras de nido. Además, registramos el reclutamiento a los alimentadores. Para esta finalidad, A1 y A2 fueron continuamente observados y, excepto por la abeja reclutadora, todas las abejas que aterrizaron fueron capturadas, identificadas y sacrificadas (sólo se permitió una reclutadora por alimentador). A1 y A2 ofrecieron solución de sacarosa (1.8M) sin olor *ad libitum*. Debido a la recompensa ofrecida y a la distancia a la que se encontraban A1 y A2, la mayoría de las abejas reclutadoras realizaron danzas de contoneo durante el reclutamiento de sus compañeras de nido hacia los alimentadores (von Frisch 1967)

La fase de evaluación se limitó a periodos de 1 hora en los días 31 y 32 del experimento, 7 y 8 días después de haber introducido el olor a la colonia. En el día 31, evaluamos la situación sin olor, es decir, los alimentadores (A1 y A2) ofrecieron solución sin olor y, por ende, las danzas fueron sin olor. Al día siguiente, evaluamos la situación con olor. En este caso, las soluciones de los alimentadores fueron aromatizadas con LIO o FEN (50 ml de olor puro por litro de solución de sacarosa). En un diseño cruzado, cada olor representó el olor que había sido introducido en una colmena (olor familiar) y el olor novedoso para las otras. A1 fue aromatizado con LIO y A2 con FEN para C1 y C2, y viceversa para C3 (A1 fue aromatizado con FEN y A2 con LIO). Comparamos preferencias

de las seguidoras por A1 o A2 dentro y entre las situaciones con o sin olor. Del estudio de las interacciones entre las abejas reclutadoras y las abejas con experiencia dentro de la colmena (las compañeras de nido con marca de color), pudimos cuantificar los efectos de memorias establecidas a diferentes edades pre recolectoras sobre el reclutamiento.

5.3.3 Observaciones comportamentales

Durante los 60 minutos del periodo de evaluación, registramos las danzas realizadas por las abejas reclutadoras usando video cámaras Sony (DCR-TRV 310 and Sony Handycam HDR-SR11). De las grabaciones de video, identificamos las abejas con experiencia dentro de la colmena (marca de color) que siguieron danzas. Definimos a las seguidoras de danza como las abejas con marca de color que se colocaron a una distancia de una abeja de largo de la danzarina y que se movieron de manera que sus cabezas quedaran frente a la danzarina a lo largo de sus circuitos (Biesmeijer y Seeley 2005). Se registraron las danzas sin olor correspondientes a A1 o A2 (situación sin olor), danzas con olor familiar correspondientes a A1 o A2 y danzas con olor novedoso correspondientes a A1 o A2 (situación con olor). También medimos la duración de cada danza realizada por la abeja reclutadora. Al mismo tiempo, capturamos a todas las abejas que fueron reclutadas y aterrizaron en los alimentadores bajo ambas situaciones (sin olor y con olor) para evitar

contarlas dos veces. Además, registramos la hora de arribo y la marca de color de cada abeja.

5.3.4 Análisis estadístico

Se utilizó el modelo lineal generalizado de efectos mixtos (GLMM) en R v.2.9 (R Development Core Team 2006) para el análisis del número de seguidoras de danza de acuerdo al alimentador del cual la recolectora reclutadora recolectaba la solución azucarada y según la situación (con o sin olor). El R ajusta los modelos usando la función lmer (Bates 2007). Se incluyó la colonia como efecto al azar para controlar la no independencia de los datos provenientes de la misma colonia. Incluimos el número de seguidoras de danza y la situación con o sin olor como efectos fijos. Todas las variables dependientes mostraron distribución de Poisson.

Para comparar las preferencias de las seguidoras de danza entre las situaciones con o sin olor, aplicamos la prueba de Fisher (Sokal y Rohlf 1995). La misma prueba fue utilizada para comparar la proporción de todas las abejas con experiencia dentro de la colmena que arribaron a A1 o A2 después de haber sido reclutadas dentro de la colmena.

5.4 Resultados

5.4.1 Seguimiento de danza y experiencias previas

La Figura 5.2 muestra el número de abejas con experiencia dentro de la colmena (abejas con marca de color) que siguieron danzas para la situación con y sin olor para cada estadía en la colmena. Para la situación sin olor (Figura 5.2a, d, g) observamos que el número total de abejas que siguieron danzas de A1 y A2 no difirieron significativamente entre las estadías en la colmena (sucesivos viajes de retorno de la recolectora activa). En la situación con olor, sin embargo, la mayoría de las abejas se dedicaron a seguir danzarinas que provenían de los alimentadores con el olor conocido (Figura 5.2b, e, h). En C1, el alto número de abejas seguidoras con experiencia para A1 (alimentador aromatizado con LIO) fue ampliamente revertido de la situación sin olor a la situación con olor cuando se añadió FEN a A2 como el olor experimentado dentro de la colmena (Figura 5.2b). Un resultado similar se encontró para C3 cuando el PHE fue añadido a A1 como el olor experimentado en la colmena (Figura 5.2h). En C2, el número ligeramente mayor de abejas seguidoras con experiencia para A1 se incrementó fuertemente durante la situación con olor cuando éste alimentador ofreció solución con olor conocido (Figura 5.2e). En conjunto, el análisis reveló que el número de abejas seguidoras con experiencia claramente difirió entre las situaciones con y sin olor (GLMM: $Z = 7.467$, $P < 0.001$) y que las danzarinas llevando el olor experimentado fueron seguidas más que aquellas que llevaban el olor novedoso ($Z = 6.448$, $P < 0.001$).

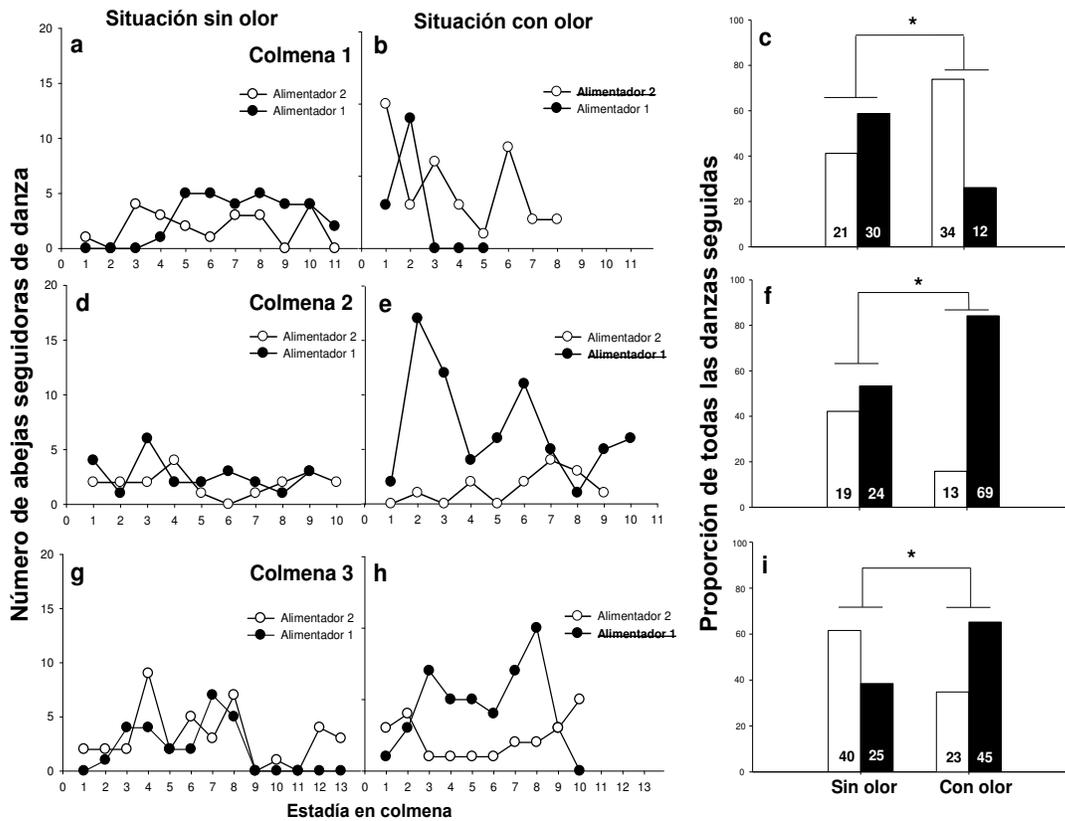


Figura 5.2. Memorias de largo término evocadas en el contexto de danza. Número de abejas con experiencia olfativa dentro de la colmena, que siguieron danzas de abejas focales en sucesivas estadías de colmena. Las abejas focales recolectaron solución azucarada sin olor bajo la situación sin olor (a, d, g) o aromatizada con distintos olores de los alimentadores 1 y 2 durante la situación con olor (b, e, h; Alimentador 1, círculos llenos; Alimentador 2, círculos vacíos). Memorias olfativas dentro de la colmena fueron establecidas 8 días antes de la fase de Evaluación a través de la entrada de solución de sacarosa aromatizada (FEN para las colmenas 1 y 3; LIO para la colmena 2) (c, f, i). Proporción de abejas con experiencia olfativa dentro de la colmena que siguieron danzas bajo las situaciones con y sin olor. El alimentador con el olor que fue experimentado dentro de la colmena, se muestra en negrita. El número de abejas se muestra al pie de cada barra.

La alta proporción de abejas experimentadas que interactuó con las abejas reclutadoras provenientes de lo alimentadores con el olor conocido sugiere fuertemente

que los patrones de interacción social fueron afectados por las experiencias olor-recompensa que ocurrieron 8 días antes dentro de la colmena (prueba de Fisher: C1: $\chi^2=10.56$, $df=1$, $N=97$, $P=0.0019$; Figura 5.2c; C2: $\chi^2=11.89$, $df=1$, $N=125$, $P=0.0006$; Figura 5.2f; C3: $\chi^2=10.24$, $df=1$, $N=133$, $P=0.0014$; Figura 5.2i). No encontramos diferencias estadísticas en la duración de la danza para la situación con olor (GLMM: $Z=0.022$, $P=0.9827$) ni cuando comparamos la situación sin olor con la situación con olor ($Z=1.803$, $P=0.071$). De esta manera, la duración de la danza no influye en si las abejas con experiencias dentro de la colmena siguen danzarinas llevando el olor conocido o el novedoso.

La frecuencia de abejas que siguieron a las abejas reclutadoras no difirió significativamente entre las cuatro clases de edades de abejas expuestas (Figura 5.1 y 5.3a). De este modo, el sesgo observado en la respuesta en el seguimiento de las abejas fue independiente de la edad a la cual las abejas fueron estimuladas. Como consecuencia, los datos de las diferentes clases de edad fueron agrupadas (ver Figura 5.3 para estadística). Además, para la situación sin olor, no encontramos diferencias significativas en la distribución de edades (prueba de bondad de ajuste: alimentador aromatizado con el olor conocido $\chi^2=7.444$, $df=3$, $N=72$, $P=0.065$; alimentador aromatizado con el olor novedoso: $\chi^2=6.416$, $df=3$, $N=89$, $P=0.093$).

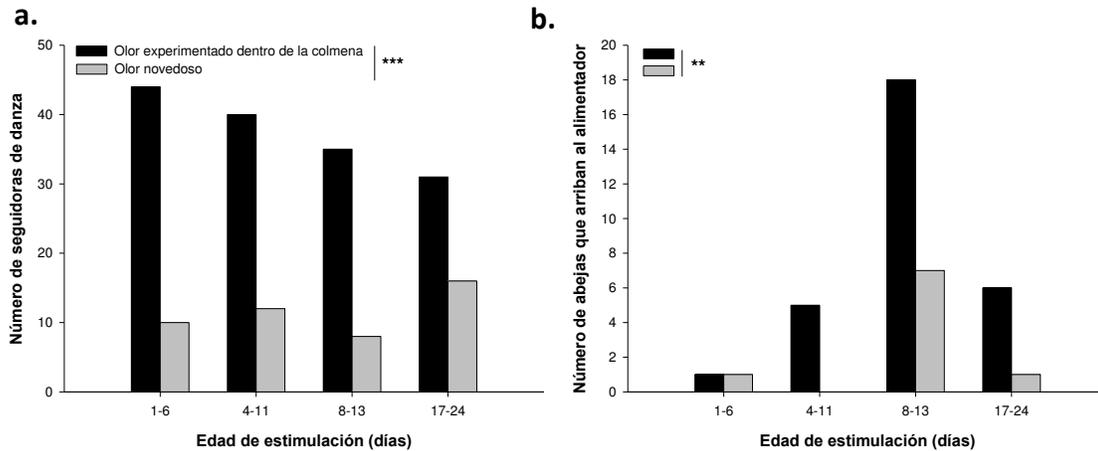


Figura 5.3. Clases de edad de las seguidoras de danza (a) y reclutadas durante la situación con olor (b) (día 32 del experimento y 8 días después de haber ingresado el olor a la colmena), en la cual 2 alimentadores ofrecieron solución de sacarosa con olor, uno con el olor experimentado dentro de la colmena y, el otro, con un olor novedoso. Las distribuciones de las abejas seguidoras de danza y las abejas que arriban al alimentador, mostraron diferencias significativas según el olor transportado por la danzarina ($P < 0.001$, GLMM; y $P < 0.01$, prueba de Fisher, respectivamente) pero no se encontraron diferencias respecto a la edad de estimulación (Prueba de bondad de ajuste: Olor experimentado dentro de la colmena: $P = 0.459$, $N = 150$, $df = 3$, $X^2 = 2.587$; Olor novedoso $P = 0.385$, $N = 46$, $df = 3$, $X^2 = 3.043$). Los asteriscos indican diferencias significativas entre las situaciones: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$.

5.4.2 Arribos

Bajo la situación con olor, los arribos de abejas con experiencia dentro de la colmena a los alimentadores fueron observados sólo para C2 y C3 (ver Figura 5.4). Consistentemente con resultados previos, observamos (Figura 5.2) que la mayoría de los arribos tuvieron

lugar en los alimentadores que ofrecieron el olor experimentado dentro de la colmena (LIO para C2 y FEN para C3; para detalles ver Figura 5.3).

Es interesante, que la mayoría de las abejas con experiencia en colmena que fueron reclutadas a los alimentadores muestran un amplio rango de edades (Figura 5.3), aunque arribaron más abejas de la clase de edad 16 a 21 días que del resto de los rangos de edad.

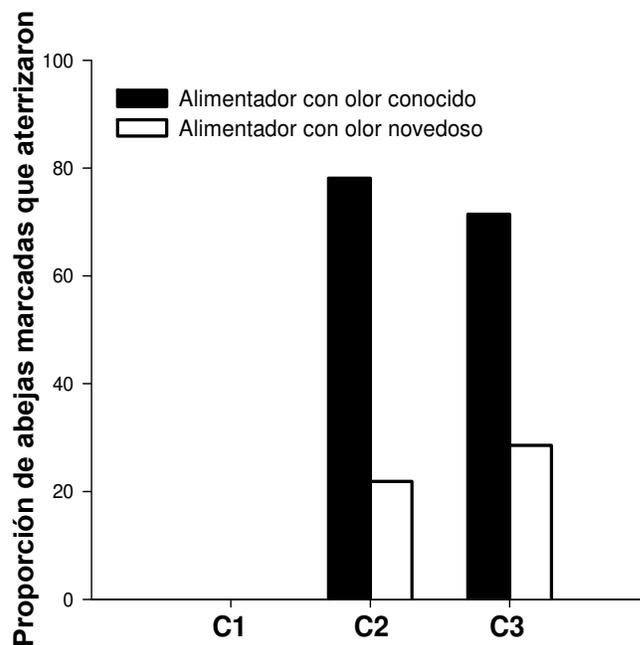


Figura 5.4. Arribos. Proporción de abejas con experiencia olfativa dentro de la colmena que aterrizaron en los alimentadores bajo la situación con olor, para todas las colonias experimentales. Negro: alimentador que ofreció el olor experimentado dentro de la colmena (FEN para colmena 1 y 3; LIO para colmena 2). Blanco; alimentador con olor novedoso (LIO para colmena 1 y 3; FEN para colmena 2).

5.5 Discusión

Los resultados muestran que experiencias olfativas tempranas dentro de la colmena, las cuales ocurren mayormente a edades pre recolectoras, sesgan la elección hacia una u otra danzarina. Este sesgo podría explicarse por la existencia de memorias olfativas estables de largo término que fueron adquiridas dentro de la colmena durante el influjo de alimento aromatizado. Como consecuencia de estas experiencias dentro de la colmena, las seguidoras mostraron más interacciones con las danzarinas que llevaban el olor aprendido que con las danzarinas llevando en olor novedoso. Además, un concomitante incremento en el número de abejas involucradas en el seguimiento de estas danzas promueve un incremento en el número de abejas que arriban a los alimentadores que ofrecieron el olor experimentado dentro de la colmena. La introducción de pequeñas muestras de alimento aromatizado a la colmena a través de abejas recolectoras, ha sido usada exitosamente antes para establecer memorias olfativas en abejas de colmena de todas las edades (un alimentador que ofrece sólo 14 ml de solución aromatizada por día; Grüter *et al.* 2006). Memorias asociativas formadas de este modo, pudieron ser recuperadas bajo el paradigma REP (respuesta de extensión de probóscide) 10 días después que la solución fuera introducida (Grüter *et al.* 2009). El paradigma REP ha sido utilizado exitosamente como medida de la retención de memorias olfativas en las abejas tanto en laboratorio como en condiciones naturales (Gerber *et al.* 1996; Menzel 1999). Si una abeja aprendió la asociación entre una recompensa (solución de sacarosa) y un estímulo biológicamente relevante como un olor floral, la subsecuente recepción del olor sólo puede causar una

respuesta condicionada, la extensión de la probóscide (Menzel 1999). Eventos de aprendizaje asociativo conducen a estas memorias debido a la relación entre el olor presente en el alimento y las muestras de alimento líquido percibidas como recompensa vía trofalaxia (Farina *et al.* 2005, 2007; Gil y De Marco 2005). Esto, junto con la rápida distribución de alimento líquido entre las compañeras de nido permitiría una rápida propagación de información del olor floral (Grüter *et al.* 2006).

Anecdóticamente, Nixon y Ribbands (1952) reportaron que, luego de introducir 20 ml de solución azucarada radioactiva usando seis abejas recolectoras entrenadas, un 20% de la población de la colonia (24500 individuos) fueron radioactivos en 4 horas. El incremento en el número de abejas seguidoras de danza que experimentaron el olor no puede ser explicado por la duración de la danza, la cual no difirió entre las abejas reclutadoras que llevaban el olor conocido y las que llevaban el olor novedoso. Más aún, la adición de olor a un alimentador no incrementa por sí sola la actividad de seguimiento de danza, en cambio, una danzarina llevando el olor conocido fue necesaria para incrementar la actividad de seguimiento de danza. Concomitantemente con el alto número de abejas involucradas en el seguimiento de danzas, la mayoría de las reclutadas arribaron a los alimentadores que ofrecieron el olor experimentado días antes dentro de la colmena, lo cual sugiere que esta clave ambiental tiene un rol en la activación de abejas para encontrar el objetivo. Por lo tanto, proveemos la primera evidencia de que información relacionada con el alimento adquirida por las abejas, mientras realizan actividades dentro de la colmena y a edades tempranas como adultos, puede ser funcional mucho después, en el contexto de reclutamiento de la danza de contoneo.

Un trabajo previo ha mostrado que las abejas prefieren seguir danzarinas llevando alimento aromatizado con el olor que han experimentado previamente (Grüter *et al.* 2008). Más aún, las preferencias recolectoras no se limitan a olores experimentados en el campo, sino que incluyen aquellas experiencias mientras las abejas estaban dentro del nido (Free 1969; Farina *et al.* 2005; Arenas *et al.* 2007, 2008; Capítulo 2 de esta tesis). Aquí, mostramos que estas preferencias pudieron establecerse varios días antes que las abejas fueran activadas a recolectar alimento y probablemente, mientras ellas realizaban tareas muy diferentes a las relacionadas con la recolección. Por lo tanto, memorias olfativas podrían continuar sesgando la elección por una danzarina (reclutamiento de nuevas recolectoras al sitio de alimentación indicado) incluso en aquellos casos en que un sitio de recolección aromatizado vuelve a ser productivo luego de un largo periodo de agotamiento. En este sentido, Grüter y Ratnieks (2011) documentaron que cuando una fuente de alimento conocida aromatizada deja de ofrecer recompensa, las recolectoras son mucho más propensas a seguir danzas que indican una ubicación diferente pero con el mismo olor más que a aquellas danzas de una fuente natural con un olor completamente diferente. Los resultados del presente estudio sugieren que las seguidoras de danza adquieren información del olor floral en un contexto diferente (mientras realizan tareas dentro del nido) y que este sesgo se traslada en un sesgo en el reclutamiento en una escala a largo término.

En las colonias de abejas, las obreras sufren cambios comportamentales de acuerdo a la edad y las necesidades de la colonia (Robinson 1992). En este experimento, y durante el tiempo que el alimento aromatizado fue introducido en la colonia, las abejas

marcadas estaban realizando un amplio rango de tareas, desde el cuidado de crías (niñeras, 1 a 6 y 4 a 11 días) hasta procesamiento de alimento (categoría de 8 a 13 días de edad) e, incluso, recolección (edades de entre 17 y 24 días) (Rösch 1925; Lindauer 1952; Seeley 1982). Diferencias en la elección por una danzarina después de experiencias pre recolectoras sugieren que las memorias asociativas son muy estables e independientes del contexto comportamental en el cual son recuperadas (Gerber *et al.* 1996; Sandoz *et al.* 2000; Arenas y Farina 2008). Como resultado, las experiencias olfativas ganadas mientras desarrollan actividades como niñeras o almacenadoras de alimento podrían ser recuperadas exitosamente en el contexto de reclutamiento (Arenas y Farina 2008; Grüter *et al.* 2009). Así, abejas con experiencia olfativa dentro de la colmena a edades pre recolectoras (edad de estimulación: 1 a 6, 4 a 11 y 8 a 13 días de edad) mostraron un fuerte sesgo hacia el seguimiento de danzarinas aromatizadas con el olor conocido más que aquellas abejas de mayor edad con experiencia en la colmena (17 a 24 días de edad; ver Figura 5.3). Esta evidencia es consistente con estudios previos que mostraron que memorias olfativas establecidas unos pocos días después de emerger el adulto podrían ser recuperadas exitosamente a edades recolectoras y transferidas a diferentes contextos comportamentales (Arenas y Farina 2008; Arenas *et al.* 2008). Más aún, experimentos de laboratorio recientes muestran que eventos de aprendizaje asociativo en abejas jóvenes, en particular aquellas adquiridas entre los 5 y 8 días de edad adulta, mejoran la retención de nuevos olores aprendidos más tarde en su vida (Arenas *et al.* 2009b) y también promueven cambios estructurales y funcionales en el lóbulo antenal (primer centro olfativo en el cerebro de los insectos) siguiendo a un aprendizaje olfativo temprano

(Arenas *et al.* 2009a, 2012). Si consideramos la complejidad sensitiva de una colmena, la fuerte respuesta sesgada encontrada para abejas con experiencias pre recolectoras es consistente con lo obtenido bajo condiciones experimentales más controladas. Bajo estas condiciones, tanto el momento como la naturaleza de las estimulaciones sensoriales tempranas interactúan afectando la recuperación de memorias olfativas tempranas (Arenas y Farina 2008; Arenas *et al.* 2009b). Más aún, encontramos que las abejas reclutadoras que tenían entre 16 y 21 días de edad (experimentaron el olor entre los 8 y 13 días de edad dentro de la colmena) fueron más propensas a arribar a los alimentadores que aquellas abejas de otras edades. Probablemente, esto se debe a que las abejas obreras de esa edad (16 a 21 días) normalmente cambian de desempeñar tareas dentro de la colmena a realizar tareas fuera de la colmena (recolección) (ver Lindauer 1952; Rösch 1925; Seeley 1982). Recolectoras novatas serían más propensas a ser reclutadas hacia un nuevo sitio de alimentación que recolectoras de mayor edad, las cuales podrían ya estar participando de la explotación de una fuente.

Mediante la alteración de los patrones de interacción entre las abejas recolectoras y las abejas con experiencia dentro de la colmena, las memorias olfativas podrían tener un efecto en el reclutamiento, al menos, en tres diferentes pasos. En primer lugar, una alta proporción de abejas comprometidas en danzas “aromatizadas” con el olor familiar podrían mejorar las chances de reclutar nuevas recolectoras. Dado que la danza atrae potenciales reclutas (von Frisch 1923; Thom *et al.* 2007), olores florales familiares darían especificidad a esa atracción. En segundo lugar, la presencia de un olor floral conocido (experimentado) en el cuerpo de la danzarina o diluido en el néctar podría facilitar la

decodificación de la danza. En este aspecto, se ha mostrado que, después de la recuperación de memorias olfativas, abejas pre recolectoras son más sensibles a responder a un estímulo excitatorio como el azúcar (Ramírez *et al.* 2010). En el contexto de la danza, el recuerdo de esa memoria asociativa podría llevar a una mejora en la adquisición de nueva información (Hammer y Menzel 1995) codificada, por ejemplo, en la danza. Por lo tanto, es plausible que la recuperación de memorias tempranas en el contexto de la danza baje los umbrales de respuesta, haciendo a las seguidoras más sensibles a evaluar información relevante en el bullicioso entorno de las danzarinas (Bozic y Valenticic 1991; Díaz *et al.* 2007). En tercer lugar, concomitantemente con el incremento en el número de recolectoras con experiencia, también podrían ocurrir cambios en los patrones de otras interacciones sociales, como los eventos trofalácticos (Goyret y Farina 2005; Grüter y Farina 2009b) por ejemplo. Las preferencias de las abejas, con experiencia dentro de la colmena, por el alimento que posee el olor conocido pueden influir drásticamente en la propagación de información. Por otro lado, nuevos análisis deben llevarse a cabo para estudiar los efectos de los olores llevados en la danza, tanto a nivel individual como de colonia, como en el sesgo en las respuestas de orientación y coordinación de las tareas colectivas dentro de la colmena.

Aunque la miel almacenada puede ser una importante fuente de información olfativa, funcionando como una “biblioteca de olores” para la colonia (Free 1969), la pequeña cantidad de alimento aromatizado introducido durante el experimento (70 ml) y el largo periodo entre la entrada del alimento aromatizado y la Fase de Evaluación (Free 1969; Arenas *et al.* 2008; Fernández *et al.* 2009) hacen que el sesgo observado en el

comportamiento no sea causado por la acumulación de volátiles asociados al alimento (ver también Grüter *et al.* 2006, 2009). También hay que tener en cuenta que las abejas de las colmenas experimentales utilizadas podían recolectar alimento de fuentes naturales. Esto implica que otras memorias olor-recompensa pudieron formarse durante el experimento. Sin embargo, los resultados, usando diferentes colonias y diferentes olores como recompensa y como olor novedoso indican que las abejas aprenden a asociar el olor que entra con la recompensa, aunque haya una vía de adquisición alternativa.

En conclusión, estos resultados sugieren que la información del olor floral adquirido mientras se realizan tareas dentro de la colmena, pueden ser útiles mucho más tarde, en el contexto comportamental, con implicancias a nivel social como ser el reclutamiento de compañeras de nido a nuevas fuentes de alimento. A pesar del hecho de que la entrada de olores de fuentes alternativas de alimento podría establecer memorias que debilitaran memorias establecidas previamente, las experiencias olfativas tempranas en la colmena parecen jugar un rol importante en la coordinación de tareas relacionadas con la recolección por períodos muchos más largos de los que se habían considerado hasta ahora. Esta persistencia de información relacionada con el alimento a nivel de la colonia podría abrir nuevas posibilidades para la biología aplicada en abejas, específicamente para mejorar el manejo de las colmenas utilizadas para la polinización de cultivos.

6

Conclusiones generales

Como se ha visto a lo largo de esta Tesis, *Apis mellifera* presenta llamativas habilidades para aprender y memorizar estímulos ambientales asociados a recompensa (von Frisch 1967; Menzel 1999, 2012; Giurfa 2004; Giurfa y Sandoz 2012). En trabajos previos, estas habilidades fueron estudiadas extensamente bajo el protocolo REP (respuesta de extensión de la probóscide), utilizando en la mayoría de los casos, abejas recolectoras (por ejemplo: Bitterman *et al.* 1983, Menzel y Müller 1996, Erber *et al.* 1998, Giurfa 2004). Sin embargo, sólo unos pocos estudios abordaron el aprendizaje en abejas jóvenes (Ray y Ferneyhough 1997, Morgan *et al.* 1998, Pham-Delègue *et al.* 1990, Laloï *et al.* 2001, Behrends y Scheiner 2009) y el rol que tiene la estimulación olfativa dentro del contexto social, si ocurre a edades pre-recolectoras, sobre la toma de decisiones en el contexto recolector y del reclutamiento de nuevos individuos.

En primer lugar, se estudió el efecto de la recolección de alimento aromatizado sobre el sesgo en las preferencias recolectoras de abejas reclutadas, es decir, abejas sin

experiencia para recolectar en una fuente que ofrece un olor idéntico al ofrecido en la colmena (Capítulo 2). Se presentaron en esta Tesis evidencias acerca de las interacciones sociales que ocurren dentro de la colmena entre la abeja recolectora y las potenciales abejas reclutadas, inmediatamente antes de partir en busca de la fuente de alimento señalada. Hasta el momento, se asumía que las abejas necesitaban seguir danza o estar involucradas en intercambios de alimento con una recolectora exitosa para obtener información acerca del olor de la fuente descubierta y dar efectivamente con el sitio de recolección que ofrece ese estímulo. En esta Tesis se ha demostrado que no es imprescindible que existan contactos trofalácticos directos con la recolectora activa ni seguimiento de danza para que la abeja reclutada aterrice en la fuente de alimento “correcta”. De hecho, hemos visto que la interacción más frecuente, es el contacto corporal y que, incluso, abejas que no han tenido ningún tipo de contacto directo con la recolectora activa, son capaces de descubrir la fuente de alimento indicada.

En segundo lugar, se realizó un primer abordaje a nivel de la disponibilidad de compuestos cuticulares en abejas recolectoras expuestas a diferentes niveles de recompensa. El objetivo fue determinar el potencial de esos semioquímicos en el marco de la transferencia de información referida a la productividad del recurso explotado. Se puede mencionar que en aquellas abejas expuestas a recompensa más rica, desde el punto de vista energético, se encontraron hidrocarburos de cadena más corta, respecto de aquellos individuos capturados en una fuente con baja recompensa. Es decir, ya durante la recolección, y producto de la entrada gustativa, se podría estar conformando

este “bouquet” de semioquímicos con potencialidades en el contexto de danza (Thom *et al.* 2007).

En tercer lugar, y en vista a establecer los niveles de respuesta frente a estímulos asociados con recompensa en el contexto de la danza de reclutamiento, se intentó cuantificarlos mediante procedimientos estandarizados de conducta (REP y URA). Si bien, el procedimiento es complejo y genera mucha perturbación en la colmena al capturar abejas activas, se puede inferir que aquellas abejas cercanas al entorno de danza tienden a mostrar una mayor sensibilidad quimiosensorial. Esta situación favorecería la adquisición de información transmitida en el contexto de danza, además de facilitar el establecimiento de memorias asociativas en ese contexto al modificar niveles de “arousal” (Hammer y Menzel 1995).

En cuarto lugar, se estudió el efecto de las memorias olfativas adquiridas dentro de la colmena, a edad pre-recolectora, sobre el posterior reclutamiento. Este tipo de memorias a largo plazo, hasta el momento habían sido estudiadas bajo el paradigma REP y bajo condiciones estrictas de laboratorio (por ejemplo, cría en jaulas de 10x10x10cm Arenas *et al.* 2008). En esta Tesis, se realizó un experimento bajo condiciones controladas, pero sin perder el contexto natural en donde estas interacciones sociales tienen lugar: la colmena. Los resultados muestran que, incluso, 8 días después del ingreso de la solución aromatizada, las abejas presentaron una preferencia por seguir danzas de abejas recolectoras que llevaban consigo el olor con el cual se realizó la estimulación a edad pre-recolectora. Además, aquellas abejas que alcanzaron la edad recolectora al momento de

la evaluación, no sólo prefirieron seguir danzas de olor conocido sino que también arribaron en mayor proporción al alimentador que presentó ese mismo olor.

Considerando todo lo antedicho, y dada la complejidad olfativa que existe dentro de la colmena, donde las abejas jóvenes están constantemente expuestas a aprender olores (durante la transferencia de alimento a compañeras de nido, por ejemplo), hemos visto que las memorias así formadas pueden persistir hasta edades recolectoras, sesgando las preferencias durante los vuelos de recolección (Capítulo 5). Así, la posibilidad que exista información global accesible a todas las abejas del nido y no sólo a las recolectoras (Grüter *et al.* 2006), podría ser muy importante para entender las bases de la recolección de néctar. Además, bajo ciertas circunstancias en donde una misma floración se extiende por más de una generación de abejas, la posibilidad de que las obreras cuenten con información específica de las fuentes a explotar, incluso antes de ser indicadas por las recolectoras exitosas, representaría una ventaja importante para facilitar y hasta activar de forma dirigida la recolección hacia ese recurso.

Como resultado de la modificación de las distintas especies florales en el exterior, los olores predominantes pueden cambiar periódicamente. Esto hace factible la presencia de distintos grupos de recolectoras con preferencias diferentes frente a los olores del ambiente que coexisten en la colonia. De este modo, aumentan las posibilidades de responder de forma eficiente a nivel colectivo frente a cambios repentinos en la disponibilidad de recursos.

De esta manera, la abeja *Apis mellifera* se confirma como un buen modelo para el estudio del aprendizaje y la memoria a corto y largo término bajo condiciones naturales,

siendo posible estudiar sus efectos a una escala biológica social; tema en el que se espera seguir profundizando a través de futuras investigaciones en el laboratorio.

7

7. Bibliografía

- Arenas A, Fernández VM, Farina WM (2007). Floral odor learning within the hive affects honeybees' foraging decisions. *Naturwissens* 94: 218–222.
- Arenas A, Fernández VM, Farina WM (2008). Floral scents experienced within the colony affect long-term foraging preferences in honeybees. *Apidologie* 39(6): 714–722.
- Arenas A, Farina WM (2008). Age and rearing environment interact in the retention of early olfactory memories in honeybees. *JComp Physiol A* 194: 629-640.
- Arenas A, Giurfa M, Farina WM, Sandoz JC (2009a). Early olfactory experience modifies neural activity in the antennal lobe of a social insect at the adultstage. *Eur J Neurosci* 30: 1498-1508.
- Arenas A, Fernández VM, Farina WM (2009b). Associative learning during early adulthood enhances later memory retention in honeybees. *PLoS ONE* 4: e8046.
- Arenas A, Giurfa M, Sandoz JC, Hourcade B, Devaud JM, Farina WM (2012). Early olfactory experience induces structural changes in the primary olfactory center of an insect brain. *Eur J Neurosci* 35: 682-690, doi:10.1111/j.1460-9568.2012.07999.x.
- Bakchine E, Pham-Delégue MH, Kaiser L, Masson C (1992). Modification d'une preference olfactive après apprentissage chez l'abeille: influence de la nature du signal appris. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Série III*, 314: 325-330.
- Baker HG, Baker I (1975). Studies of néctar constitution and pollinator-plant coevolution En: Gilbert LE, Raven PH (eds) *Coevolution of animals and plants*. Texas University Press; Austin, USA pp 100-140.
- Balsam PD (1985). The function of the context in learning and performances, en: Balsam PD, Tomie A (Eds.), *Context and Learning*. Hillsdale, L Erlbaum, New Jersey, 1-22.
- Bates D (2007). lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes. R package version 0.99875-7.
- Behrends A, Scheiner R (2009). Evidence for associative learning in newly emerged honey bees (*Apis mellifera*). *Anim Cogn* DOI 10.1007/s10071-008-0187-7.

- Bhagavan S, Smith BH (1997). Olfactory conditioning in the honey bee, *Apis mellifera*: Effects of odor intensity. *Physiol Behav* 61: 107-117.
- Biesmeijer JC, Seeley TD (2005). The use of waggle dance information by honey bees throughout their foraging careers. *Behav Ecol Sociobiol* 59: 133-142.
- Bitterman ME, Menzel R, Fietz A, Schafer S (1983). Classical-conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J Comp Psychol* 97: 107-119.
- Bolker BM, Brooks ME, Clark CJ, Geange SW, Poulsen JR, Stevens MHH, White JS (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends Ecol Evol* 24: 127-135.
- Bonabeau E, Theraulaz B, Deneubourg JL (1996). Quantitative study of the fixed threshold model for the regulation labour in insect societies. *Proc R Soc Lond B* 263: 1565-1569.
- Bozic J, Valentincic T (1991). Attendants and followers of honey bee waggle dances. *Journal of Apicultural Research* 30: 125-131.
- Bradbury JW, Vehrencamp SL (1998). *Principles of Animal Communication*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.
- Breed M, Leger E, Pearce A, Wang Y (1998). Comb wax effects on the ontogeny of honey bee nestmate recognition. *Anim Behav* 55: 13-20.
- Buckner C (1993). Cuticular polar lipids of insects, en: Stanley-Samuelson D, Nelson D (Eds). *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology*, University of Nebraska Press, Lincoln, pp. 227-270.
- Butler C, Free J (1952). The behavior of worker honeybees at the hive entrance. *Behaviour* 4: 262-284.
- Carew TJ (2000). *Behavioral Neurobiology: the cellular organization of natural behavior*. Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- DeGrandi-Hoffman, Hagler (2000). The flow of incoming nectar through a honey bee (*Apis mellifera* L.) colony as revealed by a protein marker. *Insectes Soc* 47: 302-306.
- de Vries H, Biesmeijer JC (1998). Modelling collective foraging by means of individual behaviour rules in honey bees. *Behav Ecol Sociobiol* 44: 109-124.
- Díaz PC, Grüter C, Farina WM (2007). Floral scents affect the distribution of hive bees around dancers. *Behav Ecol Sociobiol* 61: 1589-1597.
- Erber J, Kierzek S, Sander E, Grandy K (1998). Tactile learning in the honeybee. *J Comp Physiol A* 183: 737-744.
- Esch H (1962). Über die Auswirkung der Futterplatzqualität auf die Schallerzeugung im Werbetanz der Honigbiene. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 26: 302-309.
- Farina WM (1996). Food-exchange by foragers in the hive – a means of communication among honey bees?. *Behav Ecol Sociobiol*, 38: 59-64.
- Farina WM (2000). The interplay between dancing and trophallactic behavior in the honey bees *Apis mellifera*. *J Comp Physiol A* 186: 239-245.

- Farina WM, Wainelboim AJ (2001). Changes in the thoracic temperature of honeybees while receiving nectar from foragers collecting at different reward rates. *JExp Biol* 204: 1653–1658.
- Farina WM, Grüter C, Díaz PC (2005). Social learning of floral odours inside the honeybee hive. *Proc R Soc Lond B* 272: 1923–1928.
- Farina WM, Wainelboim AJ (2005). Trophallaxis within the dancing context: a behavioral and thermographic analysis in honeybees. *Apidologie* 36: 43-47.
- Farina WM, Grüter C, Acosta LE, Mc Cabe S (2007). Honeybees learn floral odors while receiving nectar from foragers within the hive. *Naturwissens* 94: 55–60.
- Farina WM, Grüter C (2009). Trophallaxis: a mechanism of information transfer. In *Food exploitation by social insects: ecological, behavioral, and theoretical approaches*. ed Jarau S. and Hrncir M. (Boca Raton: CRC).
- Fernández PC, Gil M, Farina WM (2003) Reward rate and forager activation in honeybees: recruiting mechanisms and temporal distribution of arrivals. *Behav Ecol Sociobiol* 54: 80–87.
- Fernández VM, Arenas A, Farina WM (2009). Volatile exposure within the honeybee hive and its effect on olfactory discrimination. *J Comp Physiol A* 195: 759-768.
- Free JB (1969). Influence of the odour of a honeybee colony's food stores on the behaviour of its foragers. *Nature* 222: 778.
- Free JB (1987). *Pheromones of social bees*. London: Chapman & Hall.
- Fröhlich B, Riederer M, Tautz J (2001). Honeybees discriminate cuticular waxes based on esters and polar components. *Apidologie* 32: 1–10.
- Gaddes WH, Edgell D (1994). *Learning disabilities and brain function: A neuropsychological approach*. Berling- Springer- Verlag.
- Gardner KE, Seeley TD, Calderone NW (2008). Do honeybees have two discrete dances to advertise food sources? *Anim Behav* 75: 1291-1300.
- Gerber B, Geberzahn N, Hellstern F, Klein J, Kowalksy O, Wüstenberg D, Menzel, R (1996). Honeybees transfer olfactory memories established during flower visits to a proboscis extension paradigm in the laboratory. *Anim Behav* 52: 1079-1085.
- Gil M, De Marco RJ (2005). Olfactory learning by means of trophallaxis in *Apis mellifera*. *J Exp Biol* 208: 671–680.
- Gil M, Farina WM (2002) Foraging reactivation in the honeybee *Apis mellifera* L.: factors affecting the return to a known nectar source. *Naturwissens* 89: 322–325.
- Gilley DC, Kuzora JM, Thom C (2011). Hydrocarbons emitted by waggle-dancing honey bees stimulate colony foraging activity by causing experienced foragers to exploit known food sources. *Apidologie*, DOI: 10.1007/s13592-011-0080-2.

- Giurfa M (2003). Cognitive neuroethology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Curr. Opin Neurobiol.* 13: 726-735.
- Giurfa M (2004). Conditioning procedure and color discrimination in the honeybee *Apis mellifera*. *Naturwissenschaften* 91: 228-231.
- Giurfa M (2007). Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: A taste from the magic well. *J Comp Physiol A* 193 (8): 801-824.
- Giurfa M, Sandoz JC (2012). Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learn Mem* 19: 54-66.
- Goyret J, Farina WM (2005). Non-random nectar unloading interactions between foragers and their receivers in the honeybee hive. *Naturwissenschaften* 92: 440-443.
- Gerber B, Geberzahn N, Hellstern F, Klein J, Kowalksy O, Wustenberg D, Menzel R (1996). Honey bees transfer olfactory memories established during flower visits to a proboscis extension paradigm in the laboratory. *Anim Behav* 52: 1079-1085.
- Grüter C, Acosta LE, Farina WM (2006). Propagation of olfactory information within the honeybee hive. *Behav Ecol Sociobiol* 60: 707-715.
- Grüter C, Farina WM (2007). Nectar distribution and its relation to food quality in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Insect Soc* 54: 87-94.
- Grüter C, Balbuena MS, Farina WM (2008). Informational conflicts created by the waggle dance. *Proc R Soc B* 275: 1321-1327.
- Grüter C, Balbuena MS, Farina WM (2009). Retention of long-term memories in different age groups of honeybee (*Apis mellifera*) workers. *Insectes Soc* 56: 385-387.
- Grüter C, Farina WM (2009a). The honeybee waggle dance: can we follow the steps? *Trends Ecol Evol* 24(5): 242-247.
- Grüter C, Farina WM (2009b). Past experiences affect interaction patterns among foragers and hive-mates in honeybees. *Ethology* 115: 790-797.
- Grüter C, Ratnieks F (2011). Honeybee foragers increase the use of waggle dance information when private information becomes unrewarding. *Anim Behav* 81: 949-954.
- Hadley N (1994). *Water relations in terrestrial arthropods*. Elsevier Books, Oxford.
- Hammer M, Menzel R (1995). Learning and memory in the honeybee. *J Neurosci* 15: 1617-1630.
- Hammer M (1997). The neural basis of associative reward learning in honeybees *Trends Neurosci* 20: 245-252.
- Howard R (1993). Cuticular hydrocarbons and chemical communication, en: Stanley-Samuelson D, Nelson D (Eds.), *Insect lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology*. University of Nebraska Press, Lincoln, pp. 179-226.

- Howard R, Blomquist G (1982). Chemical ecology and biochemistry of insect hydrocarbons, *Annu Rev Entomol* 27: 149-172.
- Hrncir M, Maia-Silva C, Mc Cabe S, Farina WM (2011). The recruiters excitement – features of thoracic vibrations during the honey bees waggle dance related to food source profitability. *J Exp Biol* 214: 4055-4064.
- James W (1890). *Principles of Psychology*. New York: Henry Holt.
- Johnson DL, Wenner AM (1966). A relationship between conditioning and communication in honeybees. *Anim Behav* 14: 261–265.
- Johnson DL (1967). Communication among honey bees with field experience. *Anim Behav* 15: 487–492.
- Kalmus H, Ribbans CR (1952). The Origin of the Odours by Which Honeybees Distinguish their Companions. *Proc R Soc Lond B140* (898): 50-59.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (1992). *Principles of neural science*. New York, Amsterdam, London, Tokyo: Elsevier.
- Kather R, Drijfhout F, Martin SJ (2011). Task group in cuticular lipids in the honey bee *Apis mellifera*. *J Chem Ecol* DOI: 10.1007/s10886-011-9909-4.
- Kearns CA, Inouye DW (1993). *Techniques for pollination biologists*. Boulder, Colorado: University Press of Colorado.
- Kirchner WH, Lindauer M, Michelsen A (1988). Honeybee dance communication: acoustical indications of direction in round dances. *Naturwissenschaften* 75: 629-630.
- Kirchner WH, Grasser A (1998). The Significance of Odor Cues and Dance Language Information for the Food Search Behavior of Honeybees (Hymenoptera: Apidae). *J Insect Behav*, Vol. 11, No. 2.
- Kuwabara M (1957). Bildung des bedingten Reflexes von Pavlovs Typus bei der Honigbiene, *Apis mellifica*. *Journal of the Faculty of Science of Hokkaido University (Series VI Zoology)* 13: 458-464.
- Laloi D, Gallois M, Roger B, Pham-Delègue MH (2001) Changes with age in olfactory conditioning performance of worker honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 32: 231-242.
- Lindauer M (1948). Über die Einwirkung von Duf- und Geschmacksstoff sowie anderer Faktoren auf die Tänze der Bienen. *Z vergl Physiol* 31: 348-412.
- Lindauer M (1952). Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, 34: 299-345.
- Lindauer M (1955). Schwarmbienen auf Wohnungssuche. *Z Vergl Physiol* 37: 263-324.
- Lindauer M (1961). *Communication among social bees*. Harvard University Press, Cambridge.
- Lindauer M (1971). Functional significance of honeybee waggle dance. *American Naturalist* 105: 89-96.
- Mackintosh NJ (1994). *Animal learning and cognition*. Academic Press, London, UK.

- Martínez A, Farina WM (2008). Honeybees modify gustatory responsiveness after receiving nectar from foragers within the hive. *Behav Ecol Sociobiol* 62: 529-535.
- Menzel R, Müller U (1996). Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *A Rev Neurosc* 19: 379-404.
- Menzel R (1999). Memory dynamics in the honeybee. *J Comp Physiol A* 185: 323-340.
- Menzel R, Kirbach A, Hass W-D, Fischer B, Fuchs J, Koblöfsky M, Lehmann K, Reiter L, Meyer H, Nguyen H, Jones S, Norton P, Greggers U (2011). A common frame of reference for learned and communicated vectors in honeybee navigation. *Curr Biol* 21: 645-650.
- Menzel R (2012). The honeybee as a model for understanding the basis of cognition. *Nature* 13: 758-768.
- Michener CD (1974). *The Social Behavior of Bees: A Comparative Study*. Harvard University Press, Cambridge.
- Morgan SM, Butz Huryn VM, Downes SR, Mercer AR (1998). The effects of queenlessness on the maturation of the honey bee olfactory system. *Behav Brain Res* 91: 115-126.
- Nixon HL, Ribbands CR (1952). Food transmission within the honeybee community. *Proc R Soc B* 140: 43-50.
- Núñez JA (1982). Honeybee foraging strategies at a food source in relation to its distance from the hive and the rate of sugar flow. *J Apic Res* 21: 139-150.
- Núñez JA, Giurfa M (1996). Motivation and regulation of honey bee foraging. *Bee World* 77(4): 182-196.
- Page RE, Erber J, Fondrk MK (1998). The effect of the genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* 182: 489-500.
- Pankiw T, Waddington KD, Page RE (2001). Modulation of sucrose response thresholds in honey bees (*Apis mellifera*): influence of genotype, feeding and foraging experience. *J Comp Physiol A* 187: 293-301.
- Pankiw T, Nelson M, Page RE, Fondrk MK (2004). The communal crop: modulation of sucrose response thresholds of pre-foraging honey bees with incoming nectar quality. *Behav Ecol Sociobiol* 55: 286-292.
- Pankiw T, Page RE (1999). The effect of the genotype, age, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees. *J Comp Physiol A* 185: 297-213.
- Pankiw T, Page RE (2000). Modulation of sucrose response thresholds in honey bees (*Apis mellifera*): influence of genotype, feeding and foraging experience. *J Comp Physiol A* 187: 293-301.
- Park W (1925). The storing and ripening of honey by honeybees. *J Econ Entomol* 18: 405-410.
- Pavlov IP (1927). *Lectures on conditioned reflexes*. International publishers, New York.
- Pflumm W (1969). Beziehungen zwischen Putzverhalten und Sammelbereitschaft bei der Honigbiene. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 64: 1-36.
- Pham-Delègue MH, Roger B, Charles R, Masson C (1990). Effect d'une pré-exposition olfactive sur un comportement d'orientation en olfactomètre dynamique à quatre voies chez l'abeille (*Apis mellifera* L.). *Insectes Soc* 37: 181-187.

- Provecho Y, Josens R (2009). Olfactory memory established during trophallaxis affects food search behaviour in ants. *J Exp Biol* 212: 3221–3227.
- Quinn G, Keough M (2002). *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. (Cambridge University Press).
- R Development Core Team (2006). *R: a Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- R Development Core Team (2009). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Ray S, Ferneyhough B (1997). The effects of age on olfactory learning and memory in the honey bee *Apis mellifera*. *Neuroreport* 8: 789-793.
- Ramirez G, Martinez A, Fernández V, Corti Bielsa G, Farina WM (2010). The influence of honeybee gustatory responsiveness on in-hive social interactions. *PLoS ONE* 5(10): e13498. doi: 10.1371/journal.pone.0013498.
- Reinhard J, Srinivasan MV, Guez D, Zhang SW (2004). Floral scents induce recall of navigational and visual memories in honeybees. *J Exp Biol* 207: 4371–4381.
- Reinhard J, Srinivasan MV (2009). The role of scents in honey bee foraging and recruitment. *Food Exploitation by Social Insects: Ecological, Behavioral, and Theoretical Approaches*, pp. 155-172.
- Rescorla RA, Durlach PJ, Grau JW (1985). Context learning in pavlovian conditioning. En: *Context and Learning* (Ed by PD Balsam & A Tomie), pp. 23-56. Hillsdale, New Jersey: Laurence Erlbaum.
- Ribbands CR (1954). Communication between honeybees. I: the response of crop-attached bees to the scent of their crop. *Proc R Entomol Soc Lond A* 30: 1–3.
- Riley JR, Greggers U, Smith AD, Reynolds DR, Menzel R (2005). The flight paths of honeybees recruited by the waggle dance. *Nature* 435: 205–207.
- Robinson, G.E. 1987. Alarm pheromone perception in the honey bee: evidence for division of labor based on hormonally modulated response thresholds. *J Comp Physiol A* 160: 613-619
- Robinson G, Page R (1989). Genetic determination of nectar foraging, pollen foraging, and nest-site scouting in honeybee colonies. *Behav Ecol Sociobiol* 24 (5): 317-323.
- Robinson G (1992). Regulation of division of labor in insect societies. *A Rev Entomol* 37: 637-665.
- Rohrseitz K, Tautz J (1999). Honey bee dance communication: waggle run direction coded in antennal contacts? *J Comp Physiol A* 184:463–470.
- Rösch GA (1925). Untersuchungen über die Arbeitsteilung im Bienenstaat. 1. Teil: Die Tätigkeiten im normalen Bienenstaate und ihre Beziehungen zum Alter der Arbeitsbienen. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie* 2: 571-631.
- Sandoz JC, Laloï D, Odoux JF, Pham-Delègue MH (2000). Olfactory information transfer in the honeybee: compared efficiency of classical conditioning and early exposure. *Anim Behav* 59: 1025-1034.

- Schmitt T, Herzner G, Weckerle B, Schreier P, Strohm E (2007). Volatiles of foraging honeybees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) and their potential role as semiochemicals. *Apidologie* 38. DOI: 10.1051/apido:2006067.
- Schneider R, Erber J, Page RE Jr (1999). Tactile learning and the individual evaluation of the reward in honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* 185: 1-10.
- Schneider R, Page RE Jr, Erber J (2001). The effects of genotype, foraging role, and sucrose responsiveness on the tactile learning performance of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Neurobiol Learn Mem* 76: 138–150.
- Seeley TD (1982). Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behav Ecol Sociobiol* 11: 287-293.
- Seeley TD (1989). Social foraging in honey bees: how nectar foragers assess their colony's nutritional status. *Behav Ecol Sociobiol* 24: 181-199.
- Seeley TD (1995). *The wisdom of the hive: the social physiology of honey bee colonies*. Harvard University Press, Cambridge.
- Seeley TD, Mikheyev AS, Pagano GJ (2000). Dancing bees tune both duration and rate of waggle-run production in relation to nectar-source profitability. *J Com Physiol A* 186: 813-819.
- Singer T (1998). Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *Am Zool* 38: 394-405.
- Skinner BF (1938). *The behavior of organisms*. Appleton, New York.
- Smith BH, Breed MD (1995). The chemical basis for nestmate recognition and mate discrimination in social insects, in: Carde R.T., Bell W.J. (Eds.), *Chemical Ecology of Insects II*, Chapman and Hall, New York, pp. 287–317.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995). *Biometry*. 3rd edn. New York: W. H. Freeman.
- Sokal RR y Rohlf FJ (2000). *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. State University of New York, New York.
- Stabentheiner A (1991). Thermographic monitoring of the thermal behaviour of dancing bees. En: Goodman, L.J., Fisher, R.C. (Eds.), *The Behaviour and Physiology of Bees*. CAB International, Wallingford, UKpp. 89–101 and frontispiece.
- Stabentheiner A (2001). Thermoregulation of dancing bees: thoracic temperature of pollen and nectar foragers in relation to profitability of foraging and colony need. *J Insect Physiol* 47: 385-392.
- Stabentheiner A, Schmaranzer S (1986). Thermografie bei Bienen: Körpertemperaturen am futterplatz und im "Bienenbart". *Verh Dtsch Zool Ges* 79: 417-418.
- Schmaranzer S, Stabentheiner A (1988). Variability of the thermal behavior of honeybees on a feeding place. *J Comp Physiol B* 158: 135-141.
- Stabentheiner A, Hangmüller K (1991). Sweet food means hot dancing in honeybees. *Naturwissenschaften* 78: 471-473.

- Stabentheiner A (1996). Effect of foraging distance on the thermal behavior of honeybees during dancing, walking and trophallaxis. *Ethology* 102: 360-370.
- Tautz J (1996). Honeybee waggle dance: recruitment success depends on the dance floor. *J Exp Biol* 199: 1375–1381.
- Tautz J, Sandeman DC (2003). Recruitment of honeybees to non scented food sources. *J Comp Physiol A* 189: 293–300.
- Thom C, Gilley DC, Hooper J, Esch HE (2007). The scent of the waggle dance. *PLoS Biol* 5: e228.
- Vander Meer R, Breed M, Espelie K, Winston M (1998). Pheromone communication in social insects, ants, bees, wasps and termites, Westview Press, Boulder.
- von Frisch K (1923). Über die Sprache der Bienen. *Zool Jb Physiol* 40: 1–186.
- von Frisch K Lindauer M (1955). Über die Fluggeschwindigkeit der Bienen und über ihre Richtungsweisung bei Seitenwind. *Naturwissenschaften* 42: 377-385.
- von Frisch K (1967). The dance language and orientation of bees. Harvard University Press, Cambridge.
- Waddington K (1990). Foraging profits and thoracic temperature in honey bees (*Apis mellifera*). *J Comp Physiol B* 160: 325-329.
- Wagner D, Brown MJF, Broun P, Cuevas W, Moses LE, Chao DL, Gordon DM (1998). Task-related differences in the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants, *Pogonomyrmex barbatus*. *J Chem Ecol* 24: 2021–2037.
- Wagner D, Tissot M, Gordon D (2001). Task-related environment alters the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants. *J Chem Ecol* 27:1805–1819.
- Wenner AM, Wells PH, Johnson DL (1969). Honey bee recruitment to food sources: olfaction or language? *Science* 164: 84-86.
- Wilson EO (1971). The Insect Societies. Cambridge, Massachusetts: Belknap Press of Harvard University Press.
- Winston, ML (1987). Biology of the honey bee. Harvard University Press, Cambridge.
- Zar HJ (1999). Biostatistical Analysis, 4th edn. Prentice Hall, Englewood Cliffs.
- Zuur AF, Ieno EN, Walker NJ, Saveliev AA, Smith GM (2009). Mixed effects models and extensions in ecology with R. Springer, New York, p 574.

