

Tesis de Posgrado

Importancia de la información espectral y olfativa en las estrategias de recolección de néctar de la abeja *Apis mellífera* L.

Giurfa, Martín

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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:

Giurfa, Martín. (1991). Importancia de la información espectral y olfativa en las estrategias de recolección de néctar de la abeja *Apis mellífera* L.. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2423_Giurfa.pdf

Cita tipo Chicago:

Giurfa, Martín. "Importancia de la información espectral y olfativa en las estrategias de recolección de néctar de la abeja *Apis mellífera* L.". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2423_Giurfa.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

"IMPORTANCIA DE LA INFORMACION
ESPECTRAL Y OLFATIVA EN LAS
ESTRATEGIAS DE RECOLECCION DE
NECTAR DE LA ABEJA *Apis mellifera*
L."

Autor: Martin Giurfa

Director: Dr. Josué A. Núñez

Laboratorio de Fisiología de Insectos
Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

1991

*Tesis .
2423
ej 2.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Josué A. Núñez, Director y Maestro, por sus consejos, aliento permanente y horas y paciencia dedicadas a la enseñanza de la importancia del análisis riguroso y cuantitativo del comportamiento. Quisiera agradecer especialmente su afecto y entusiasmo para conmigo pero, sobre todo, su actitud crítica, volcada siempre en discusiones estimulantes y el saber señalarme, con paciencia, mis errores.

A mis compañeros de laboratorio Claudio Lazzari, Flavio Roces, Walter Farina, Alicia Lorenzo, Pablo Guerenstein y Luciano Moffatt por su amistad y cariño pero también por sus sugerencias y críticas, que ciertamente contribuyeron a la elaboración de esta tesis.

A la Sociedad Argentina de Apicultores (S.A.D.A.) sin la cual este trabajo no hubiera podido ser llevado a cabo. Agradezco a Daniel Barral, Tito Botigieg, Juan Carlos Carambia, Patricia Vázquez, Delicia Panzitta, Cora González, Eduardo Maukisch, Carlos Galoppo, Lucas Martínez, Osvaldo Pascuale, Horacio Escarcena, Martín Terziotti y Hugo Pignol la ayuda invalorable brindada en las instalaciones de su apiario y en el trabajo cotidiano. Agradezco especialmente a Daniel Barral por su amistad y apoyo incondicionales y por haberme dejado aprender su amor y respeto por las abejas.

Al Prof. Dr. Randolf Menzel (Berlin, Alemania), por su colaboración para con mi trabajo de investigación, por la lectura y corrección de gran parte de él y por la oportunidad brindada de trabajar bajo su dirección.

A la International Foundation for Science (Estocolmo, Suecia) por subsidiar generosamente mi trabajo de investigación y por su constante voluntad de apoyar mis iniciativas en ese plano.

A todos mis Amigos, porque en todos estos años, fueron por su calor y afecto, una verdadera Familia.

A Celia, mi abuela, y a Héctor, mi tío, por su vocación constante de ayudarme cotidianamente.

A Sylvia, mi madre, porque con su ejemplo diario me enseñó, a lo largo de muchos años, el amor y respeto por la Verdad y Justicia.

A Gabriela, mi esposa, por su Amor y Paciencia

A Gabriela

«Comme le jour dépend de l'innocence
Le monde entier dépend de tes yeux purs
Et tout mon sang coule dans leurs regards»

PAUL ELUARD

Capitale de la douleur

A mi madre

INDICE

Página

CAPITULO 1:INTRODUCCION GENERAL.....	6
1. La Abeja Recolectora de Néctar.....	7
1.1. Sociabilidad y Castas.....	7
1.2. La división temporal de tareas.....	7
1.3. El correlato glandular de la división temporal de castas.....	8
1.4. La recolección de alimento.....	9
2. La Visión de los Colores en la Abeja Doméstica.....	11
2.1. Tricromaticidad del sistema visual de las abejas.....	14
2.2. Psicofísica del Color.....	15
2.2.1. Colorimetría Simple.....	16
2.2.2. Colorimetría Mayor.....	18
2.3. Procesos antagonistas de color.....	19
3. La Orientación por Olores en la Abeja Doméstica.....	22
3.1. La Feromona de la Glándula de Nasonof.....	25
3.2. "Footprints" o Marca de las Patas.....	27
3.3. El (Z)-11-eicosen-1-ol.....	28
4. Preguntas.....	29
PRIMERA PARTE: LA INFORMACION ESPECTRAL.....	30
CAPITULO 2: IMPORTANCIA DE LA INFORMACION ESPECTRAL EN LA RECOLECCION DE NECTAR DE LA ABEJA <i>Apis mellifera</i> : ¿MUESTRAN LAS ABEJAS PREFERENCIAS ESPECTRALES DURANTE LA RECOLECCION DE NECTAR?.....	31
1. Introducción.: Las Preferencias de Colores.....	31
2. Materiales y Métodos.....	35
2.1. Dispositivo experimental.....	35
2.2. Procedimiento experimental.....	39
2.3. Estadística.....	41
3. Resultados.....	41
4. Discusión.....	48
5. Conclusión.....	52
CAPITULO 3: PREFERENCIAS ESPECTRALES Y GENERALIZACION DE COLORES EN LA ABEJA <i>Apis mellifera</i>	53
1. Introducción.....	53
2. Materiales y Métodos.....	54
2.1. Procedimiento experimental.....	54
2.2. Estadística.....	57
3. Resultados.....	57
4. Discusión.....	63
5. Conclusión.....	68

SEGUNDA PARTE: LA INFORMACION OLFATIVA.....	70
CAPITULO 4: IMPORTANCIA DE LA INFORMACION OLFATIVA EN LA RECOLECCION DE NECTAR DE LA ABEJA <i>Apis mellifera</i> L.: USO DE UNA SUSTANCIA DE "MARCADO NEGATIVO".....	
1. Introducción: el Mercado Negativo de Fuentes de Alimento.....	71
2. Materiales y Métodos.....	74
3. Resultados.....	76
4. Discusión.....	82
CAPITULO 5: EL PAPEL DE LA MARCA NEGATIVA EN LA COMUNICACION QUIMICA INTRAESPECIFICA.....	
1. Introducción.....	87
2. Materiales y Métodos.....	88
2.1 Procedimiento experimental.....	88
3. Resultados.....	90
4. Discusión.....	94
CAPITULO 6: UN CONTEXTO NATURAL PARA LA ESTRATEGIA DE MERCADO NEGATIVO: EL CARDO SILVESTRE <i>Carduus acanthoides</i>	
1. Introducción.....	97
2. Materiales y Métodos.....	98
3. Resultados.....	100
4. Discusión.....	105
TERCERA PARTE: LA INTERACCION ENTRE EL COLOR Y EL OLOR.....	
111	
CAPITULO 7: LA INTERACCION ENTRE LA MARCA NEGATIVA Y LA SATURACION ESPECTRAL.....	
112	
1. Introducción.....	112
2. Materiales y Métodos.....	113
2.1. Procedimiento.....	113
2.2. Estadística.....	116
3. Resultados.....	116
4. Discusión.....	120
CAPITULO 8: CONCLUSION.....	
123	
CAPITULO 9: BIBLIOGRAFIA.....	
126	

CAPITULO 1

INTRODUCCION GENERAL

El mundo provee una variedad de información que permite a los seres vivos orientarse en sus respectivos entornos. Dentro de la gama prácticamente infinita de parámetros disponibles que los animales pueden utilizar para guiar eficientemente determinadas conductas se hallan las señales visuales y las olfativas.

Dentro de las señales visuales, la *información espectral* resulta prioritaria para determinados organismos capaces de ver colores. Las diferencias en la longitud de onda de la luz emitida por fuentes lumínicas o reflejadas por ciertos objetos definen el mundo visible de un organismo con visión cromática.

Por otro lado, las señales olfativas pueden también contribuir a hacer más eficiente la orientación de un animal hacia un objetivo dado. De vital importancia resultan, por ejemplo, determinados olores como los de potenciales fuentes de alimento o como aquellos que intervienen, a modo de verdaderos mensajeros, en la comunicación química intraespecífica (*feromonas*).

En este capítulo se realiza una breve introducción referida a la abeja recolectora de néctar *Apis mellifera* L. para luego hacer hincapié en la visión de colores y en la orientación olfativa; la abeja doméstica, por su parte, constituye uno de los pocos animales en los cuales visión y olfato han sido considerablemente estudiados. El análisis en profundidad que se ha hecho de este modelo animal permite entonces el planteo de nuevas preguntas como las que dan origen a esta tesis.

1. LA ABEJA RECOLECTORA DE NECTAR

1.1. Sociabilidad y Castas:

La abeja doméstica italiana *Apis mellifera ligustica* Spin. (Clase Insecta, Orden Hymenoptera, Superfamilia Apoidea, Familia Apidae, Subfamilia Apinae, Tribu Apini [Michener 1969]) es un insecto social. Hablar de sociabilidad (Wilson 1971) implica decir que estas abejas poseen tres características relevantes que las definen como integrantes de una sociedad verdadera:

- la cooperación de varios individuos en el cuidado de la cría.
- la superposición de por lo menos dos generaciones, de modo que la descendencia puede asistir a sus progenitores durante algún período de su vida.
- la división reproductiva del trabajo, esto es, la coexistencia en una misma sociedad de individuos fértiles y de otros más o menos estériles trabajando en beneficio de los primeros.

Respecto de este último punto, tres castas coexisten en una colonia de *Apis mellifera*: la reina, los zánganos y las obreras.

1.2. La división temporal de tareas:

Las abejas no sólo presentan las castas morfológicas diferenciadas y estables, arriba citadas. Dentro de las obreras existen además *castas temporales*, esto es el desempeño de tareas diferenciadas de acuerdo a la edad. Como su propio nombre lo sugiere, las obreras se encargan virtualmente de todas las tareas de la colonia. El cuidado y alimentación de la cría, la vigilancia de la colmena, el ataque a potenciales predadores, la

ventilación y mantenimiento de la temperatura de la cámara de cría y la búsqueda de agua, néctar y polen son sólo algunas de las actividades que las obreras deben realizar a lo largo de su vida. Estas tareas presentan un ordenamiento temporal que podría definirse como "de adentro hacia afuera"; esto es, las primeras tareas se realizan en el interior de la colmena mientras que las últimas se van realizando cada vez más en el exterior de la misma.

Si bien las características y requerimientos de la colonia pueden influenciar el momento en que una dada tarea se realiza (Kolmes 1985), la secuencia típica de tareas temporales (Rösch 1925, 1927, Lindauer 1952, Ribbands 1952, Sakagami 1953, Smith 1974, Seeley 1982, Winston & Punnet 1982, Winston 1987) determina que las tareas de recolección de alimento se inicien alrededor del día 20 de la vida adulta.

1.3. El correlato glandular de la división temporal de castas:

Esta división temporal de tareas tiene ciertamente un correlato glandular y hormonal. Se ha demostrado (Winston 1987) que las glándulas mandibulares, hipofaríngeas y de la cera alcanzan considerables dimensiones en los primeros días de vida de las obreras (días 5 a 15), en coincidencia con el desempeño de las actividades de cuidado y alimentación de la cría y de construcción de panales. El tamaño de estas glándulas se reduce con el consecuente cese de estas tareas y con el cambio a la manipulación del alimento aportado por las recolectoras. Al mismo tiempo las glándulas hipofaríngeas empiezan a secretar la invertasa necesaria para el procesamiento del néctar en miel (Simpson et al 1968). Cuando las obreras empiezan a asumir tareas de guardianas, la glándula del aguijón pasa a producir la máxima cantidad de compuestos de alarma y, al mismo tiempo, las glándulas

mandibulares dejan de producir alimento larval para empezar a secretar la feromona de alarma, 2-heptanona, que sería liberada ante pilladoras de otras colmenas y ante otros potenciales enemigos (Shearer & Boch 1965, Boch & Shearer 1967).

Del mismo modo, cuando las guardianas pasan a ser recolectoras de alimento, se observa un decremento del 40% en la masa corpórea, básicamente del abdomen (Harrison 1986). Así, pese a que existen aún pocos datos en este sentido, existe una correlación visible entre el desarrollo glandular, la producción de ciertas feromonas y compuestos hormonales y el desempeño de determinadas tareas. Sin embargo, un elemento parece no coincidir con el presente cuadro de situación. Se ha informado (Simpson 1961) que la producción de 2-heptanona por las glándulas mandibulares es máxima en las recolectoras de néctar antes que en las abejas guardianas, donde se supondría que esta feromona tendría mayor incidencia de acuerdo a las interpretaciones propuestas (Butler 1966, Simpson 1966). Sobre este punto volveremos más adelante (ver Capítulo 8).

1.4. La recolección de alimento:

La recolección de alimento es, como se dijo, la última tarea que desempeñan las obreras antes de morir. Dos recursos provistos por las flores constituyen la base alimentaria de las abejas: el néctar y el polen. El primero proporciona los hidratos de carbono y el segundo, las proteínas, lípidos y vitaminas necesarios tanto para el desarrollo larval cuanto para las funciones que, ya adulta, cumple la abeja. Las condiciones de la colonia y la propia actividad exploratoria, sumadas al intercambio informacional de las abejas recolectoras, determinan la prioridad de un recurso sobre el otro.

El período de vida de una recolectora es muy corto (alrededor de una semana). Así, durante ese tiempo reducido, las recolectoras deben realizar gran número de viajes de recolección: se ha estimado que el número de viajes de recolección gira alrededor de 32 (Bodenheimer 1958) aunque este valor debe subestimar el número real. Ribbands (1949), por ejemplo, observó que una misma recolectora realizó 29 viajes de colecta de polen en un solo día.

La distancia de vuelo acumulada por una recolectora parece ser determinante de la duración de su vida. Aparentemente, el límite superior alcanzable sería de 800 km, luego de lo cual, las abejas morirían, independientemente de que esta distancia se haya recorrido en cinco o en más días (Winston 1987). En una situación natural, y considerando que el rango superior de vuelo en condiciones normales es de 2 km aproximadamente (Seeley 1985), esta distancia acumulada se alcanza en pocos días.

La conclusión inmediata es que las recolectoras deben programar su actividad de modo de ser altamente eficientes en ese corto lapso de tiempo disponible. Numerosas estrategias son empleadas con este fin. El objetivo de esta tesis es justamente *analizar de qué manera pueden ser empleadas ciertas señales sensoriales, como los estímulos de color y ciertas sustancias químicas como las feromonas de orientación, para lograr una alta eficiencia recolectora.*

Para esto, hace falta, en primer lugar, introducir algunos conceptos básicos referidos a la visión de colores y a la orientación olfativa en la abeja doméstica.

2. LA VISION DE LOS COLORES EN LA ABEJA DOMESTICA:

La visión de los colores se define como la capacidad de distinguir colores espectrales en base a las diferencias de longitud de onda existentes, independientemente de las diferencias de brillo (intensidad) que pudiesen existir entre esos colores (Menzel 1979). Así, la propiedad fundamental de los sistemas de visión de colores es la capacidad de asignar un color constante a un objeto, independientemente del amplio rango de fluctuaciones de energía y de longitud de onda de la luz iluminante (Ottoson & Zeki 1985).

La sensación de color está provista, según la Teoría de Young-Helmholtz (Young 1802; Helmholtz 1896), por tres entradas independientes que proporcionan al cerebro la información para las representaciones perceptuales de *tono*, *saturación* y *brillo*. Estas tres cualidades determinan, via introspección, nuestra experiencia del color. El *tono* es el atributo de la percepción de color relacionado con la longitud de onda propiamente dicha; es denotado habitualmente como "azul", "verde", "amarillo", "rojo", etc. La *saturación* es la cualidad referida al "contenido de un color puro" o "pureza de un color". Para entender esta idea, digamos por ejemplo que si se tiene una pintura clara, por ejemplo rosa, y se le agrega rojo, la pintura obtenida será más saturada en rojo. El *brillo*, por su parte, es el atributo de la percepción de color que permite clasificar a un objeto como miembro de una serie que va del blanco (100 % de brillo) al negro (0 % de brillo).

En base a estas tres variables es posible entonces definir un *Espacio de Percepción de Color*. En este espacio tridimensional, un color percibido es un punto caracterizado por coordenadas de tono, saturación y brillo (Figura 1).

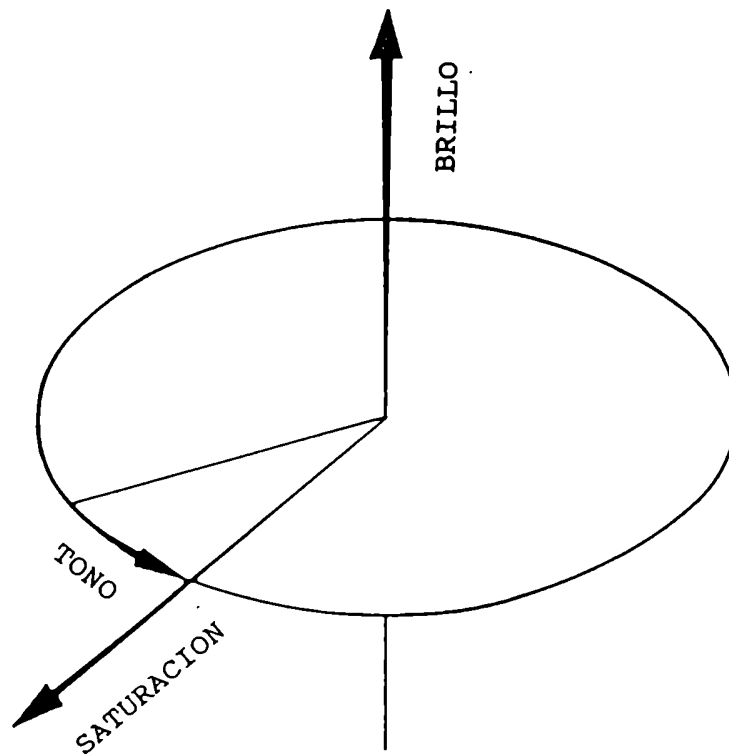


Figura 1. Diagrama esquemático de la organización del espacio de percepción de colores en términos de tono, saturación y brillo (adaptado de Wyszecki & Stiles: *Colour Science* (1967), John Wiley & Sons, Inc., New York).

Es importante destacar que la existencia de distintos tipos de fotorreceptores, con distintas propiedades espectrales, no puede ser considerada como prueba definitiva de la percepción de colores por un animal dado. La presencia de estos fotorreceptores es sólo una premisa de la visión de color; la prueba definitiva acerca de la visión de colores en un contexto dado la dan los experimentos de comportamiento en los cuales se entrena al animal estudiado a una luz o pigmento monocromático para luego variar, en el ensayo posterior, la intensidad y la longitud de onda. De acuerdo a las performances de reconocimiento y discriminación de colores espectrales se puede entonces establecer la existencia o no de la visión de colores. Fue justamente en base a estas performances que Karl von Frisch (1914) pudo establecer la visión de colores de la abeja doméstica. Von Frisch adiestró a un grupo de recolectoras a un platillo con solución azucarada y luego situó el platillo sobre un cartón de color azul de modo que las abejas lo pudiesen ver al acercarse y mientras tomaban solución azucarada. Seguidamente rodeó al cartón azul con otros cartones de formato semejante pero de coloración variable desde el blanco, pasando por varias gradaciones de gris, hasta el negro. En el centro de cada cartón, inclusive en el azul, situó un platillo vacío y limpio (no frecuentado antes por abejas). A su llegada a la mesa experimental, las abejas se dirigieron al cartón azul, probándose así que distinguían al azul como color en sí y no como una categoría de brillo y/o saturación. Este mismo experimento fue repetido con otros estímulos de color, entre ellos el rojo, determinándose entonces que las abejas pueden ver colores aunque son ciegas para el rojo. Posteriormente, Daumer (1956) demostró que las abejas son particularmente sensibles a luz UV de 350 nm y que UV (360 nm) y verde-azulado (490 nm) son, para la abeja,

colores complementarios, lo mismo que azul (440 nm) y una mezcla de UV y amarillo (590 nm). Estableció que las abejas poseen *visión tricromática de los colores*, donde los tres colores primarios son UV (360 nm), azul (440 nm) y verde (588 nm). Concluyó además que la visión de los colores de las abejas era semejante a la del ser humano sólo que el espectro de colores visibles de los insectos se hallaba "corrido" hacia longitudes de onda menores. Así, las abejas ven colores en un rango de longitudes de onda que va desde los 300 hasta los 620 nm mientras que el ser humano lo hace en el rango de 400 a 700 nm.

2.1. Tricromaticidad del sistema visual de las abejas:

Cada uno de los aproximadamente 5500 omatidios del ojo compuesto de una abeja contiene 9 células fotorreceptoras (Gribakin 1969, Menzel & Blakers 1976). Estas células se hallan recubiertas por una lente y por un cono cristalino y se disponen en forma concéntrica. La porción central donde convergen, el rabadoma, es una estructura que actúa como guía de ondas de luz y está formado por los rabadómeros o conjuntos de microvellosidades de cada célula. En estas microvellosidades, y estrechamente asociada a las estructuras de membranas, se halla la rodopsina, el ftopigmento involucrado en la visión de color. Este pigmento absorbe una relativamente amplia banda de frecuencias de ondas electromagnéticas naturales y es, por ende, el responsable de la sensibilidad lumínica de los fotorreceptores. La rodopsina está constituida por una porción proteica y por un grupo cromóforo, el retinal. En los insectos, la rodopsina se isomeriza en metarrodopsina al absorber un cuanto de luz; ésta, a su vez, vuelve a rodopsina al absorber otro cuanto de luz. Cambios en la porción proteica de la rodopsina determinan variaciones en los

picos de absorción máxima dentro del rango de los 330 a los 700 nm. Así se provee al ojo con la sensación de color; si bien en cada célula fotorreceptora hay fotorpigmento que absorbe cuantos de luz, la probabilidad de absorción de cuantos de luz de un color u otro variará de acuerdo a las distintas rodopsinas, es decir de acuerdo a sus distintas propiedades de absorción espectral (Hamdorf 1979). De ahí resulta la distinta sensibilidad espectral de los fotorreceptores.

En cada omatidio frontal, coexisten los tres tipos de fotorreceptores en un arreglo característico: de las nueve células fotorreceptoras, dos son del tipo UV ($\lambda_{\text{máx}} = 335 \text{ nm}$), dos del tipo azul ($\lambda_{\text{máx}} = 435 \text{ nm}$) y cuatro del tipo verde ($\lambda_{\text{máx}} = 540 \text{ nm}$) (Menzel et al. 1986). La novena célula es más corta y probablemente también del tipo UV (Menzel & Snyder 1974). En concreto, como cada omatidio mira a un punto particular del espacio, cada uno de estos puntos será analizado simultáneamente por los tres canales espectrales, UV, azul y verde. De este modo, el mosaico visual de la abeja será tricromático en cada punto de visión.

2.2. Psicofísica del Color:

Dos aproximaciones experimentales diferentes son usadas en el análisis de los sistemas de visión de colores: los experimentos de *igualación de colores* y los experimentos de *diferenciación de colores*. Schrödinger (1920 a,b) usó esta distinción para definir a la *colorimetría simple* y a la *colorimetría mayor* respectivamente.

2.2.1. Colorimetría Simple: el diagrama de cromaticidad de la abeja

En los experimentos de colorimetría simple (igualación de colores), el sujeto experimental debe juzgar visualmente si dos colores pueden igualarse o no ya que la misma sensación de color puede ser producida por diferentes mixturas de luces cromáticas. Cualquier color espectral Q puede definirse así como una mezcla, en proporciones adecuadas, de tres colores primarios.

En general, un color Q se representa en un *diagrama de cromaticidad bidimensional*. En este plano, la dimensión "brillo" ha sido suprimida de modo tal que el diagrama de cromaticidad presenta, en todos sus puntos, brillo constante, permaneciendo sólo las dimensiones "tono" y "saturación". Este diagrama recibe habitualmente el nombre de "*Triángulo de Colores*" y es un triángulo simétrico cuyos vértices están definidos por las tres luces primarias; en el caso del ser humano se trata de los primarios definidos por la CIE (Commission Internationale de l'Éclairage): Azul (radiación monocromática de 435.8 nm), Verde (radiación monocromática de 546.1 nm) y Rojo (radiación monocromática de 700 nm). La línea recta que conecta los extremos del espectro recibe el nombre de *Línea de Púrpuras*.

Es de destacar que las tres luces primarias de los vértices pueden ser reemplazadas por otras luces. Así, se puede construir un *Espacio de Color Fisiológico* donde los primarios corresponden ahora a los flujos de fotones absorbidos por cada uno de los tres tipos de fotorreceptores.

En el caso de la abeja, Daumer (1956) demostró que un *Triángulo de colores* podía aplicarse con éxito en la descripción cuantitativa de los resultados de experimentos de igualación de colores, considerando las tres luces primarias: UV (360 nm), azul

(440 nm) y verde (588 nm). Del mismo modo, dado que las sensibilidades espectrales de los tres tipos de fotorreceptores son en este caso conocidas, se puede construir el Triángulo de Colores de la abeja *Apis mellifera*. Este diagrama de cromaticidad fisiológico representa un plano de *brillo constante* (Menzel 1979, Menzel & Lieke 1983) (Figura 2) donde los vértices del triángulo representan los flujos de fotones absorbidos por los tres tipos de fotorreceptores, UV, azul y verde. Los colores monocromáticos se ubican a lo largo de la línea oscura de puntos negros que representan colores espectrales separados por intervalos de 10 nm, desde 300 a 630 nm, y la línea que conecta los 300 y 630 nm es la línea de púrpuras.

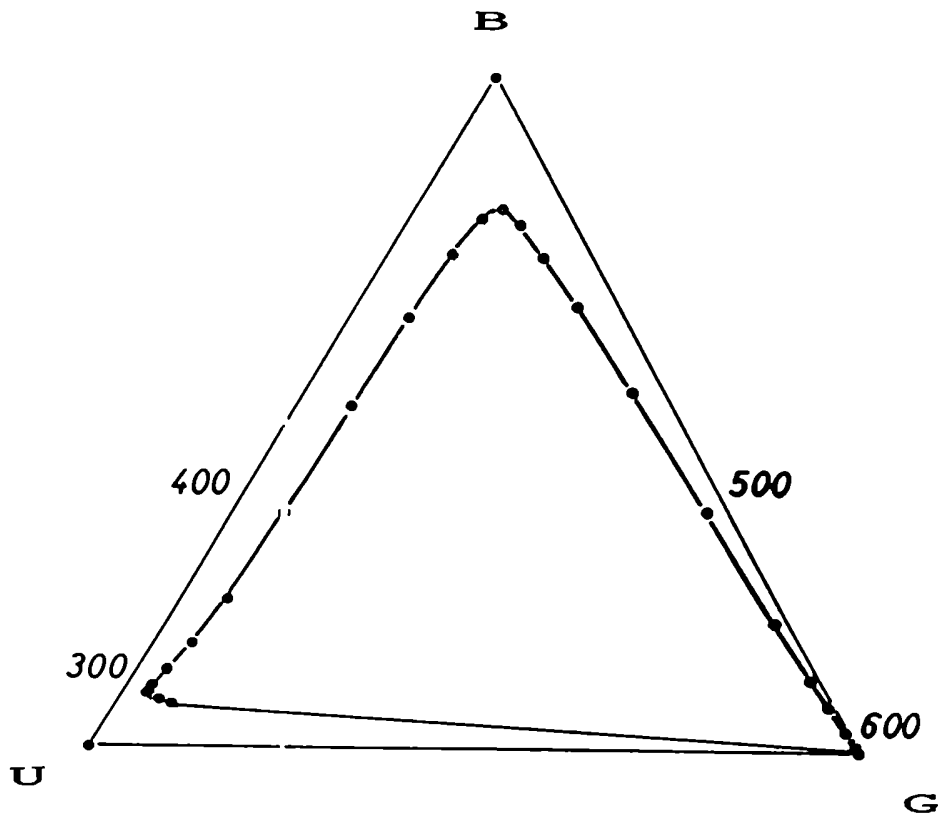


Figura 2. Diagrama de cromaticidad de la abeja. Los vértices representan los flujos de fotones absorbidos por los tres tipos de fotorreceptores (U: ultravioleta; B: azul; G: verde). Los colores monocromáticos yacen a lo largo de la línea con puntos que representan colores espectrales separados por 10 nm desde 300 a 630 nm. La línea que conecta los 300 y los 630 nm es la línea de púrpuras (de Menzel 1985).

2.2.2. Colorimetría mayor: distancias perceptuales en el espacio de colores de la abeja:

En el caso de los experimentos de Colorimetría Mayor (Diferenciación de Colores), el sujeto experimental debe elegir cuál de dos colores se asemeja más a un color dado. Ya que los juicios de diferenciación son fundamentalmente distintos a los de igualación de colores, resulta imposible hacer predicciones relativas a diferencias entre colores a partir de los diagramas de cromaticidad.

En el procesamiento de las señales de color por los fotorreceptores, existe una fluctuación debida a los ruidos surgidos en la absorción fotónica y en su transducción a señales eléctricas. Si dos objetos son tan parecidos en sus reflexiones espectrales que sólo difieren dentro del rango de fluctuación mencionado, el sistema nervioso no será capaz de discriminar los dos objetos y el animal confundirá los dos colores. Así, alrededor del locus de cada color en el Triángulo de Colores se genera una "zona gris" o "zona de incertidumbre" dentro de la cual la diferenciación espectral por el sistema nervioso no es posible. De acuerdo a esto, dos colores serán mejor diferenciados en la medida en que un mayor número de zonas de incertidumbre los separe.

La diferenciación de colores se relaciona con la resolución del sistema de visión de colores. En las abejas, la resolución de este sistema fue medida originalmente por von Helversen (1972) en experimentos diseñados para medir los umbrales de discriminación de luces espectrales de distinta longitud de onda pero de igual brillo. La discriminación de colores fue sensiblemente mejor para el violeta (440 nm) y para el verde-azulado (490 nm); esto es, las abejas pueden discriminar perfectamente estos dos colores de otros

corridos en tan solo 8 nm (hacia arriba o hacia abajo) en longitud de onda. Backhaus y Menzel (1987) descubrieron luego que variaciones regulares en la saturación (del 10%) no implicaban variaciones coincidentes y regulares en la resolución perceptual. Esto quiere decir que no existe una relación simple entre la resolución perceptual (diferenciación) y la distancia geométrica entre los loci de los estímulos de color en el Diagrama de Cromaticidad.

2.3. Procesos antagonistas de color:

De lo anterior se deduce que otra representación de las distancias perceptuales entre los estímulos espectrales es necesaria. Backhaus et al. (1987a) sugirieron que sólo dos escalas eran necesarias para representar las diferencias entre estímulos de color. Como ninguna de las escalas se relacionaba directamente con las entradas de los tres tipos de fotorreceptores, se sugirió que se correlacionaban con las coordenadas de tono y saturación o con los ejes antagonistas Azul/Púrpura (UV-Verde) y UV/Azul-Verde.

La base fisiológica de esta suposición reside en la existencia de dos grandes grupos de neuronas antagonistas de color en el cerebro de la abeja (Hertel 1980, Kien & Menzel 1977). Se han detectado, en efecto, *neuronas UV/Azul-Verde* (respuesta excitatoria ante el UV e inhibitoria ante el azul y/o el verde o viceversa) y *neuronas Azul/UV-Verde* (respuesta excitatoria ante el azul e inhibitoria ante el UV y/o el verde y viceversa). No han sido detectadas neuronas Verde/UV-Azul.

Así, las dos escalas fueron interpretadas como los valores de excitación de estos dos tipos de neuronas espectrales antagonistas. Backhaus y colaboradores (Brandt et al. 1989)

sugirieron que estas neuronas antagonistas recibían entradas lineares, de distinto signo y peso, de los tres tipos de fotorreceptores. Estos coeficientes fueron calculados en base a la evidencia comportamental de elección de colores y se propuso entonces que la escala A era igual a:

$$-9.86 E_u + 7.70 E_a + 2.16 E_v,$$

y la escala B igual a:

$$-5.17 E_u + 20.25 E_a -15.08 E_v,$$

siendo E las diferencias en la excitación de los fotorreceptores UV (u), azul (a) y verde (v).

Así, la escala A corresponde en realidad al proceso espectral antagonista UV/Azul-Verde y la escala B corresponde al proceso espectral antagonista Azul/UV-Verde. El espacio antagonista de colores resultante que permite representar fehacientemente las distancias perceptuales espectrales se representa en la Figura 3.

En este gráfico, cada color tiene nuevamente un locus pero esta vez, el intervalo entre dos locus se relaciona directamente con la capacidad de discriminación de la abeja.

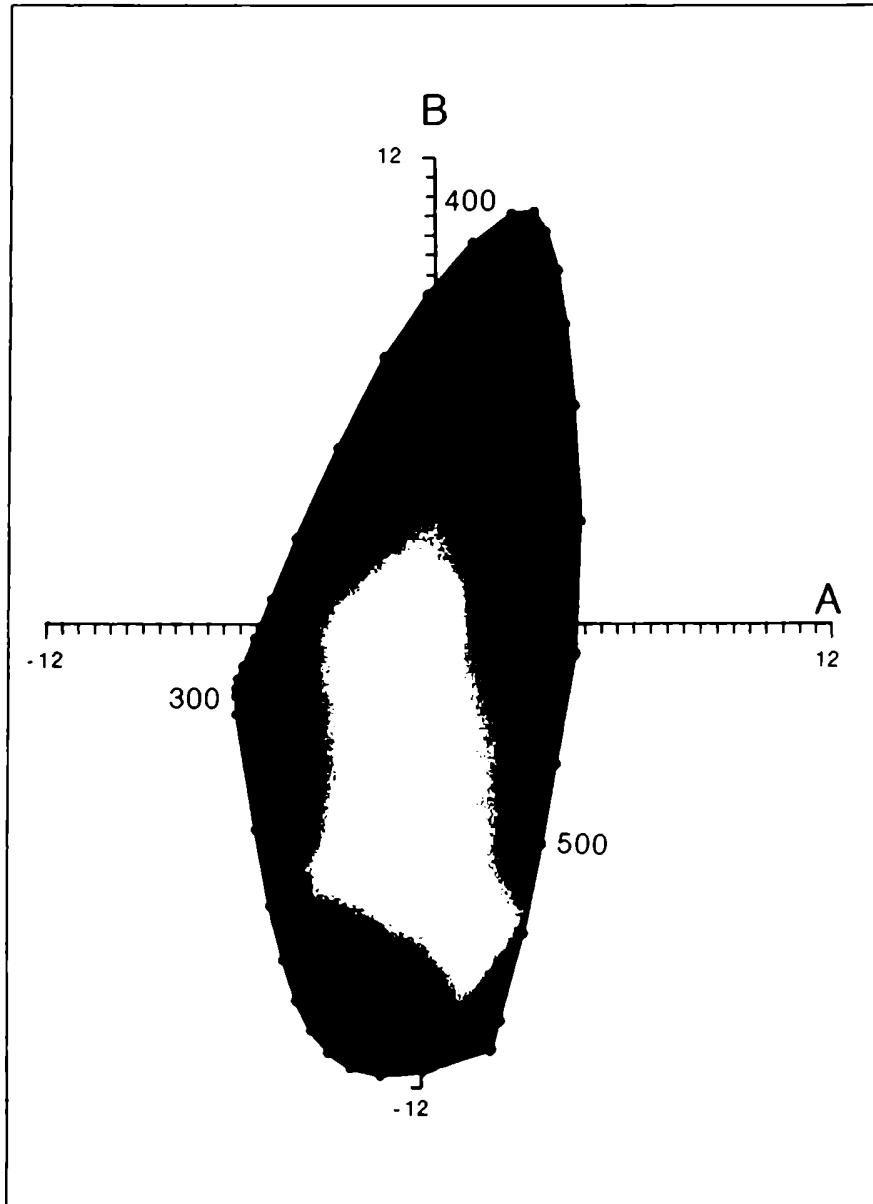


Figura 3. Espacio antagonista de colores. Los ejes A y B corresponden a los dos procesos espectrales antagonistas UV/Azul-Verde y Azul/UV-Verde respectivamente.

3. LA ORIENTACION POR OLORES EN LA ABEJA DOMESTICA

A principios de siglo, la hipótesis de que las abejas eran capaces de reconocer las flores en base a sus diferentes fragancias florales era atractiva más no del todo comprobada. Al poco tiempo, Karl von Frisch (1919) demostró fehacientemente la capacidad de discriminación olfativa de las abejas en base a experimentos en los que se entrenaba a las abejas a un olor originalmente recompensado con solución azucarada y posteriormente se las enfrentaba a 23 olores distintos entre los cuales se hallaba el original. La conclusión inmediata de los trabajos de von Frisch fue que, así como ocurre con los colores, las abejas pueden aprender y memorizar olores de modo de ser más eficientes en determinados contextos, como por ejemplo en la orientación hacia la colmena o hacia fuentes de alimento.

Posteriormente, fueron realizados experimentos de condicionamiento de la proboscis de abejas frente a estímulos olfativos y, paralelamente, registros extracelulares en las sensilla olfativas que apoyaron estas conclusiones (Vareschi 1971). Los experimentos en cuestión demostraron esta capacidad de discriminar olores distintos así como la de generalizar olores que, por compartir en sus moléculas ciertas estructuras químicas, resultan semejantes para las abejas.

Se ha demostrado además que las abejas detectan mejor las fragancias florales y sus feromonas atractivas (Schwarz 1955) antes que olores carentes de significado en su vida diaria (Fischer 1957). Esto ya había sido observado por von Frisch en sus primeros experimentos de aprendizaje olfativo (1919): las abejas aprenden más rápidamente los olores florales, como ocurre en el caso del Geraniol, sustancia que forma parte además de una

feromona atractiva de las abejas. Sin embargo, la plasticidad de la abeja es tal que, incluso olores originalmente aversivos como el Lisol (usado por los apicultores para impedir la aproximación de abejas) o el propanol pueden ser usados para condicionar a las abejas a una determinada fuente de alimento (Menzel 1985). Del mismo modo, inclusive el dióxido de carbono (rehuído en altas concentraciones) (Kuwabara & Takeda 1956), el vapor de agua (Hertz 1934) y la propia feromona de alarma de las abejas (Acetato de isopentilo) pueden ser eficientemente aprendidos (Menzel 1985). La conclusión general, establecida por Menzel (1985), es que existiría una predisposición que favorecería el aprendizaje de ciertos olores antes que de otros en el contexto de las fuentes de alimento. Sin embargo, la capacidad de aprendizaje de la abeja es tan grande que prácticamente cualquier estímulo olfativo puede ser asociado con una recompensa alimentaria y por ende aprendido.

Esto tiene importancia en varios contextos. Por un lado, en la colmena y durante el proceso de reclutamiento a través de la danza, las abejas reclutadas perciben y aprenden el olor floral de la fuente de la cual proviene la reclutadora (impregnado en su cuerpo), facilitándose así la posterior ubicación de esas fuentes por aquellas abejas que las visitan por primera vez (Frisch 1967). Por otro lado, durante la recolección de alimento, los olores actúan como señales atractantes y orientadoras para las recolectoras (Vogel 1983). Así, los olores florales intervienen también en el mantenimiento de la llamada "constancia floral" (Faegri & van der Pijl 1967) de las abejas: durante la recolección diaria de alimento, y por varios días inclusive, las abejas trabajan sobre una dada especie floral, sin prestar atención a especies adyacentes que también proveen recompensa de néctar y polen. Esta constancia no es el resultado de una fijación rígida,

sino, dado que las abejas son generalistas, la manifestación de las capacidades de aprendizaje y memorización ya mencionadas. Entre los varios estímulos florales que ayudan a mantener esta constancia en la medida en que la especie explotada sea rentable, están los colores y las fragancias florales: ayudan a la discriminación del morfo floral sobre el cual están trabajando las abejas.

Así, el significado biológico de los olores florales debe buscarse necesariamente en la interrelación abeja-planta. Estas señales, junto con otras más (colores, formas, etc) hacen a la planta conspicua y diferente de otras plantas competidoras y facilitan la optimización de la actividad recolectora de la abeja.

Otros olores, esta vez provenientes de la propia abeja contribuyen a hacer más eficiente la recolección de néctar: se trata de las *feromonas* (Karlson & Lüscher 1959) asociadas a esta tarea, producidas por las abejas recolectoras. En general, las feromonas tienen importancia fundamental en la comunicación intraespecífica y en la sociabilidad de la abeja melífera (Blum 1988). En el caso particular de las abejas obreras, las sustancias hasta ahora conocidas, asociadas con la recolección de alimento, pueden ser clasificadas como "**Sustancias de Marcado Positivo**" debido a que, al ser liberadas en un medio dado, atraen a individuos coespecíficos a las superficies previamente marcadas.

Varias sustancias de este tipo han sido citadas para la abeja recolectora *Apis mellifera*, aunque también para varias especies de abejorros del género *Bombus* (Cameron 1981, Free 1987, Schmitt & Bertsch 1990) y para varias especies de abejas sin aguijón de los géneros *Melipona* y *Trigona* (Lindauer & Kerr 1958, Villa & Weiss 1990).

En la abeja *Apis mellifera*, se han encontrado hasta ahora las siguientes feromonas de marcado positivo, asociadas con la recolección de alimento:

- Feromona de la Glándula de Nasonof
- "Footprints" o Marca de las Patas
- (Z)-11-eicosen-1-ol

3.1. La Feromona de la Glándula de Nasonof:

Tal vez la más conocida de las sustancias arriba citadas sea la feromona de la Glándula de Nasonof. Esta glándula se halla situada en la superficie dorsal del séptimo tergito abdominal (McIndoo 1914, Snodgrass 1956) y queda habitualmente cubierta por la superposición de del sexto tergito. En determinados contextos, las obreras exponen la glándula, flexionando hacia abajo la porción terminal de su abdomen previamente elevado. Al mismo tiempo aletean, generando así una corriente aérea sobre la glándula y facilitando la dispersión de la feromona (Sladen 1901, Free 1968). La naturaleza atractante de la feromona de la Glándula de Nasonof fue inicialmente enunciada por Sladen (1901, 1902, 1905) y luego comprobada por Free y Butler (1955) y por Boch y Shearer (1962).

Estudios sobre la naturaleza química de la feromona de Nasonof han demostrado hasta ahora la existencia de al menos siete compuestos que la integran: Geraniol (Boch & Shearer 1962), Nerol y (E,E)-Farnesol (Pickett et al. 1980), (E)-Citral y (Z)-Citral (Weaver et al. 1964) y los ácidos Geránico y Nerólico (Boch & Shearer 1964). El más abundante de estos compuestos es el Geraniol cuya cantidad en la glándula varía a lo largo de la vida del individuo y estacionalmente (Boch & Shearer 1963, Pickett et

al. 1981): alcanza un máximo (alrededor de 1.0 μ g) en las abejas que empiezan a trabajar como recolectoras (18-20 días) y durante la primavera. El proceso de identificación de compuestos integrantes de esta feromona es, a decir de Free (1987), un proceso lento y seguramente no concluído.

La exposición de la Glándula de Nasonof y la liberación de su feromona ocurren en varios contextos comportamentales de los cuales la señalización de flores u otras potenciales fuentes de alimento por las recolectoras de néctar es el que nos interesa (Frisch & Rösch 1924, Renner 1960, Free & Racey 1966, Free 1968, Free & Williams 1972). Durante la recolección de alimento, y en fuentes particularmente atractivas, las abejas exponen sus glándulas de Nasonov. Esto ocurre sobre todo en fuentes artificiales que presentan abundancia de solución azucarada (Frisch 1923).

La importancia de esta feromona en un aumento de la eficiencia recolectora quedó demostrada por los ensayos en los que la relación de recolectoras atraídas a platillos con solución azucarada con y sin feromona de Nasonof (impregnada en papel de filtro) era de 12 a 1 respectivamente (Renner 1960). Del mismo modo, Free (1968) demostró que abejas que visitaban por primera vez una fuente de alimento eran atraídas e inducidas a bajar a platillos con solución azucarada y glándulas de Nasonov. Si bien las recolectoras son reclutadas mediante danzas que informan la dirección y distancia de las fuentes de alimento, no siguen las direcciones de manera muy precisa (Frisch 1967) y, en realidad, tampoco es tan deseable que así ocurra. Las fuentes naturales suelen estar distribuídas en vastas áreas; así, si los puntos de llegada de las recolectoras están también distribuídos en forma amplia, la eficiencia recolectora de la colonia es mayor que si

estuviesen reducidos a una zona puntual. En este contexto, la feromona de Nasonof puede resultar un sistema orientador capaz de corregir, a cortas distancias de las fuentes de alimento, un cierto rango de errores en la precisión de su ubicación.

3.2. "Footprints" o Marca de las Patas

Otra feromona de "marcado positivo" de las abejas recolectoras es la denominada "Footprint" (Marca de las Patas) (Butler et al. 1969). Esta es depositada tanto en la piquera de acceso a la colmena, ayudando así a la orientación de las abejas que retornan (Ribbands & Speirs 1953, Lecomte 1956, Butler et al. 1969, 1970), como en la superficie de fuentes de alimento (Butler et al. 1969). En este último contexto, se demostró que fuentes artificiales de alimento previamente visitadas por otras abejas - ausentes en el momento del ensayo - eran mucho más atractivas que fuentes equivalentes sin visitas previas de abejas (Ribbands 1954, Butler et al. 1969, Ferguson & Free 1979). Esto mismo se demostró en *Apis florea* (Free & Williams 1979), en algunas especies del género *Bombus* (Cameron 1981, Schmitt & Bertsch 1990) y en algunas especies de Meliponinos (Lindauer & Kerr 1958). Por otro lado, el efecto attractante ejercido por la sustancia depositada en estas superficies tiene larga duración ya que fuentes artificiales previamente marcadas mantuvieron su atractivo durante varias horas inclusive (Butler et al. 1969, Ferguson & Free 1979). Este mismo efecto fue observado por Schmitt y Bertsch (1990) en abejorros.

Si bien la sustancia depositada es muy efectiva en la inducción del descenso de recolectoras a las fuentes marcadas, no se conoce aún hasta qué distancia es percibida y efectiva. Tampoco se conoce aún su naturaleza química. Chauvin (1962)

sugirió que esta sustancia es producida por las glándulas de Arnhart, situadas en los tarsos de las patas. Ferguson y Free (1979) han sugerido en cambio que la fuente de olor se halla distribuída por toda la superficie del cuerpo, siendo la superficie dorsal de tórax y abdomen particularmente efectiva en inducir el descenso de otras recolectoras. Esto llevó a que , originalmente, estos autores hablaran de una nueva feromona, distinta de los "footprints" previamente descubiertos. A partir de sus bioensayos, hablaron de una Feromona de Marcado para la Recolección ("Forage Marking Pheromone"). Posteriormente, el propio Free (1987) corrigió esta afirmación, diciendo que la Feromona de Marcado para la Recolección y los "footprints" eran en realidad una misma cosa.

3.3. El (Z)-11-eicosen-1-ol:

El (Z)-11-eicosen-1-ol es la sustancia de "marcado positivo" más recientemente descubierta (Free et al. 1982).

Este compuesto es uno de los 24 hasta ahora identificados como componentes de la feromona de alarma de la cámara del aguijón (Blum 1982, Pickett et al. 1982). Sin embargo, ensayado aislado de los componentes restantes (Free et al. 1982), mostró tener una única función: atraer recolectoras a superficies de fuentes artificiales de alimento previamente marcadas con él. Esta sustancia ejerce una fuerte atracción tanto sobre recolectoras condicionadas previamente a la fuente de alimento en cuestión como sobre recolectoras reclutadas por las abejas experimentadas. Por otro lado, no fue efectiva en inducir el descenso a fuentes de agua marcadas; sólo fue efectiva en el contexto de la recolección de alimento.

En suma, tanto los olores florales como las propias feromonas atractivas contribuyen a la orientación de las abejas en el contexto de la recolección de néctar.

De este modo, señales de color y olfativas desempeñan un papel importante en la eficiencia recolectora de estos insectos. Al respecto, nos preguntamos acerca de la posible existencia de preferencias espectrales y de la existencia y empleo de una sustancia de "marcado negativo" (i.e. una sustancia que, al ser liberada en un medio dado, generaría el rechazo de otras abejas) para la orientación dentro de un grupo de flores.

4. PREGUNTAS

Planteamos concretamente las siguientes preguntas:

- ¿Existen preferencias por determinados estímulos espectrales durante la recolección de néctar?
- ¿Existen evidencias acerca del empleo de una feromona de características "negativas" (repelentes) empleada durante la recolección de néctar para señalar flores recientemente visitadas?
- ¿Existe algún tipo de relación entre la información provista por las claves espectrales y el empleo o no de la feromona negativa?

Estas tres preguntas determinan precisamente las tres partes de las que se compone esta tesis.

Primera Parte

CAPITULO 2

IMPORTANCIA DE LA INFORMACION
ESPECTRAL EN LA RECOLECCION DE
NECTAR DE LA ABEJA *Apis
mellifera*: ¿MUESTRAN LAS ABEJAS
PREFERENCIAS ESPECTRALES DURANTE
LA RECOLECCION DE NECTAR?

1. INTRODUCCION: LAS PREFERENCIAS DE COLORES

Varios estudios han sugerido la existencia de preferencias innatas por ciertos colores en las abejas recolectoras. Esta idea surge, en realidad, con el propio Darwin (1877) quien afirmó que "las abejas y varios insectos polinizadores debían guiarse *instintivamente* hacia las flores con el fin de obtener nectar y polen ya que así lo hacen, sin instrucción previa, tan pronto como emergen del estadio pupal". De este modo, Darwin anticipó el concepto de *Imagen Innata de Búsqueda*, imagen que permitiría a las abejas "saber", sin ninguna experiencia previa, cómo luce una fuente potencial de alimento, es decir, una flor (Kevan & Baker 1983). Así, el empleo de estas imágenes innatas de búsqueda facilitaría, no sólo la localización de las flores, sino también la elección de las mismas a posteriori del aprendizaje de sus características salientes (Menzel 1985).

Sin embargo, la existencia de imágenes innatas de búsqueda supone, de algún modo, la prefijación rígida sobre determinados estímulos, asociados con sus fuentes alimentarias. Contrariamente a esto, la abeja no presenta un comportamiento recolector

instintivo especializado ya que visita numerosas especies florales (exóticas y endémicas) a lo largo de su vida. Así, una hipótesis alternativa (Menzel 1985), si bien no niega la existencia de una cierta "predisposición" por ciertos estímulos, sugiere que las imágenes innatas de búsqueda deberían ser lo suficientemente débiles como para no inhibir la orientación y explotación de fuentes alimentarias distintas y más rentables en términos de recompensa ofrecida.

Existen muy pocos estudios referidos a una predisposición instintiva de las abejas por ciertos estímulos de color. El más acabado de ellos, más que estudiar este punto en concreto, analizó las performances de aprendizaje y memorización de las abejas para distintos estímulos espectrales mediante *Ensayos de Aprendizaje* (Menzel 1967, 1968 & 1969). Menzel logró demostrar que bastaban tres experiencias recompensadas con néctar sobre un color dado para que éste quedase memorizado durante el resto de la vida del animal y que, además, ciertos colores se aprendían más rápidamente que otros. Las abejas eran entrenadas a un color determinado, en el cual recibían recompensa de solución azucarada, para luego ser sometidas a la elección de dos colores alternativos no recompensados, uno de los cuales era el de entrenamiento. En cada caso se varió tanto el número de recompensas previas al ensayo de elección cuanto el color alternativo enfrentado al de entrenamiento en el ensayo. El violeta (400-420 nm) se aprendía más rápidamente y se elegía con mayor precisión que el azul (en segundo lugar), que el amarillo (en tercer lugar), que el verde (en cuarto lugar), que el ultravioleta (en quinto lugar) y que el verde azulado que se aprendía más lentamente y con menor precisión (Menzel 1967). Estos resultados fueron independientes del brillo de los colores ofrecidos y de la longitud de onda del color

alternativo. Además, el azul presentaba un intervalo de retención mayor que el del amarillo (Menzel 1968), lo cual coincide con los resultados de los experimentos de aprendizaje descritos.

En base a esto, Menzel sugirió que la tasa diferencial de aprendizaje de los distintos colores sugeriría, en realidad, una predisposición innata por determinados estímulos espectrales tal que el violeta sería el más "preferido" y el verde-azulado el menos "preferido".

Pese al rigor con que fueron realizados estos trabajos, no dejan de ser una prueba indirecta de la existencia de estas Imágenes Innatas de Búsqueda, en este caso referidas a los colores. Otros autores intentaron usar los llamados *Ensayos de Elección Espontánea* para analizar el problema de las preferencias de colores (Oettingen-Spielberg 1949, Butler 1951, Ludwig - citada en Frisch 1967 p. 247). En estos ensayos se trata de ver qué señales de color son elegidas espontáneamente por una abeja inexperimentada cuando se dirige a una fuente de alimento.

Los resultados disponibles de tales trabajos son contradictorios por un lado y susceptibles de crítica por el otro. Efectivamente, Oettingen-Spielberg (1949) afirma que las abejas exploradoras prefieren el amarillo sobre el azul mientras que Ludwig (citada en Frisch 1967) sostiene lo contrario. Por su parte, Butler (1951) afirma que, para las recolectoras, azul y amarillo son igualmente atractivos.

El principal problema de estos ensayos es que no pueden asegurar que una abeja ensayada no haya tenido alguna experiencia previa capaz de influenciar su elección posterior. Este punto cuestiona ya de por sí solo el planteo original de los experimentos. Además, el tamaño muestral es muy bajo (Oettingen-Spielberg 1949, Butler 1951) y la motivación recolectora de los

animales ensayados no resulta claramente definida. Si la motivación recolectora no es considerada en una performance de recolección de alimento, los resultados son altamente cuestionables. Por último, los experimentos no excluyen la interferencia de señales atractivas de naturaleza olfativa (feromonas) que podrían sesgar la elección posterior de otras abejas recolectoras y por ende amplificar el posible atractivo de un color dado (Butler 1951).

Estos trabajos no excluyen tampoco la posible acción de señales espectrales supuestamente neutras en los comportamientos de elección observados; esto es, se dice habitualmente que ciertos estímulos visuales como el gris o el blanco no constituyen información "válida" en términos de visión de color y que no podrían influenciar la elección espontánea de colores. Luego veremos hasta qué punto este último factor puede ser realmente importante en la elección espontánea de colores de las abejas.

Ante la imposibilidad de controlar fehacientemente si una abeja recolectora que viene del campo ha tenido o no experiencia previa sobre otros colores que pudiesen sesgar su elección, decidimos encarar el problema de las preferencias espontáneas con un diseño experimental diferente a los anteriores.

Básicamente, empleamos *Ensayos de Asimetría* en los cuales las abejas son entrenadas intensivamente a un color dado recompensado y luego se las enfrenta al color de entrenamiento y a un color nuevo, ambos recompensados, estudiándose entonces posibles sesgos hacia alguno de los dos colores. Se buscó así analizar si la posible presencia de preferencias espontáneas por determinados colores era capaz de "torcer" los efectos del aprendizaje previo, en una situación en la que, como se explicó, la experiencia anterior del animal está definida y controlada.

2. MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron abejas *Apis mellifera ligustica* del apiario de la Sociedad Argentina de Apicultores (S.A.D.A.), González Catán, provincia de Buenos Aires (lat. 34.6° Sur). La colmena empleada se hallaba a 60 m del laboratorio.

2.1. Dispositivo experimental:

Se empleó un *Simulador de Flujo de Néctar* (Núñez 1971) (Figura 4), situado en el laboratorio, sobre una mesa junto a una ventana abierta.

El dispositivo consiste en un disco acrílico de 50 cm de diámetro en el cual van insertas 12 flores artificiales idénticas, numeradas y separadas entre sí por una distancia de 10 cm. Una unidad inyectora de 12 microburetas tipo Scholander (Kirk 1950) abastece de solución azucarada con flujo constante a las flores a través de delgadas cánulas de polietileno. Un sistema de embrague permite acoplarlas en grupos de 3 a un motor sincrónico. Así, el flujo resultante por bureta puede regularse a voluntad. Cada flor consiste en una plataforma sobre la cual ajusta un disco acrílico de 5 cm de diámetro con una perforación central de 3 mm de diámetro. Sobre este disco se sitúa otro similar con una perforación central de 1 cm en la que se adapta un tubo de acceso de PVC de 8 mm de diámetro interno. La abeja visitante se ve obligada a penetrar en el tubo de PVC para recolectar la solución azucarada que fluye en la base de la flor. Entre ambos discos se sitúa un cartón de color igualmente perforado que será el estímulo ensayado. De este modo, las señales de color no entran en contacto directo con las abejas y no pueden ser marcadas con feromonas que podrían sesgar la elección (Figura 4c).

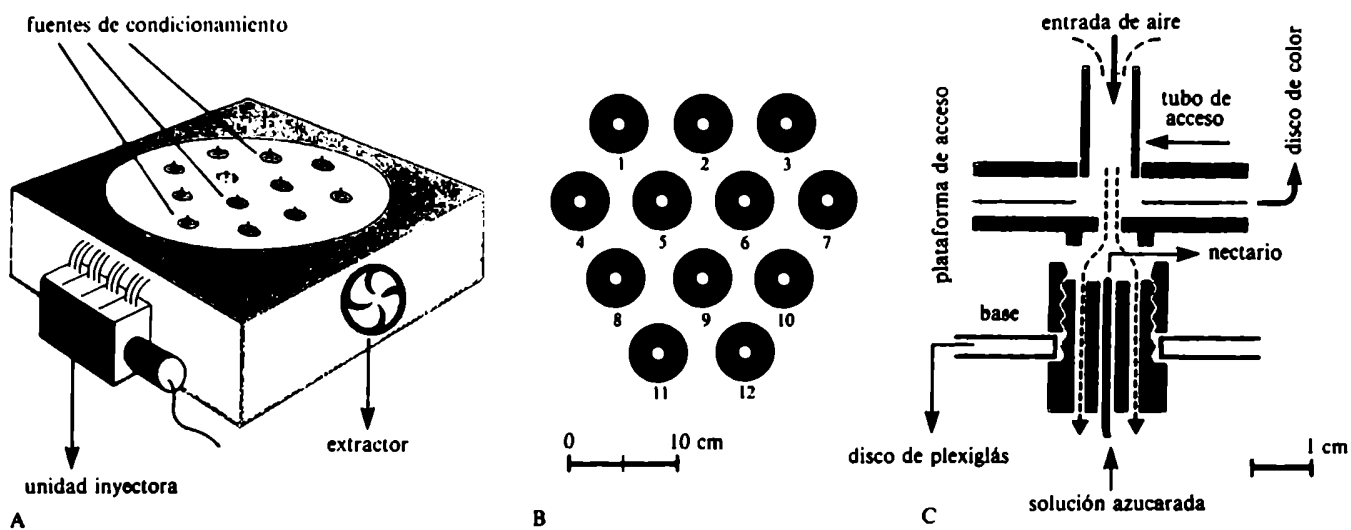


Fig. 4. Simulador de flujo de néctar: a) vista de conjunto; b) vista superior; c) sección radial de una flor.

Cada flor recibió idéntico flujo de solución azucarada 50% (p/p) a través de sendas cánulas acopladas a un dispositivo inyector (microbureta de tipo Scholander [Kirk 1950]), accionado por un motor sincrónico.

El flujo total ofrecido en el dispositivo fue de $1.02 \mu\text{l}/\text{min}$ (cada flor recibió $1/12$ de este flujo total, i.e. $0.09 \mu\text{l}/\text{min}$). Calibraciones previas fueron realizadas con el objeto de asegurarse de que todas las flores proveyesen realmente el mismo flujo de solución azucarada. Con este flujo en el dispositivo, las abejas realizaron 196 ± 2.62 inspecciones florales por visita (Media \pm E.S.; $n=308$ visitas).

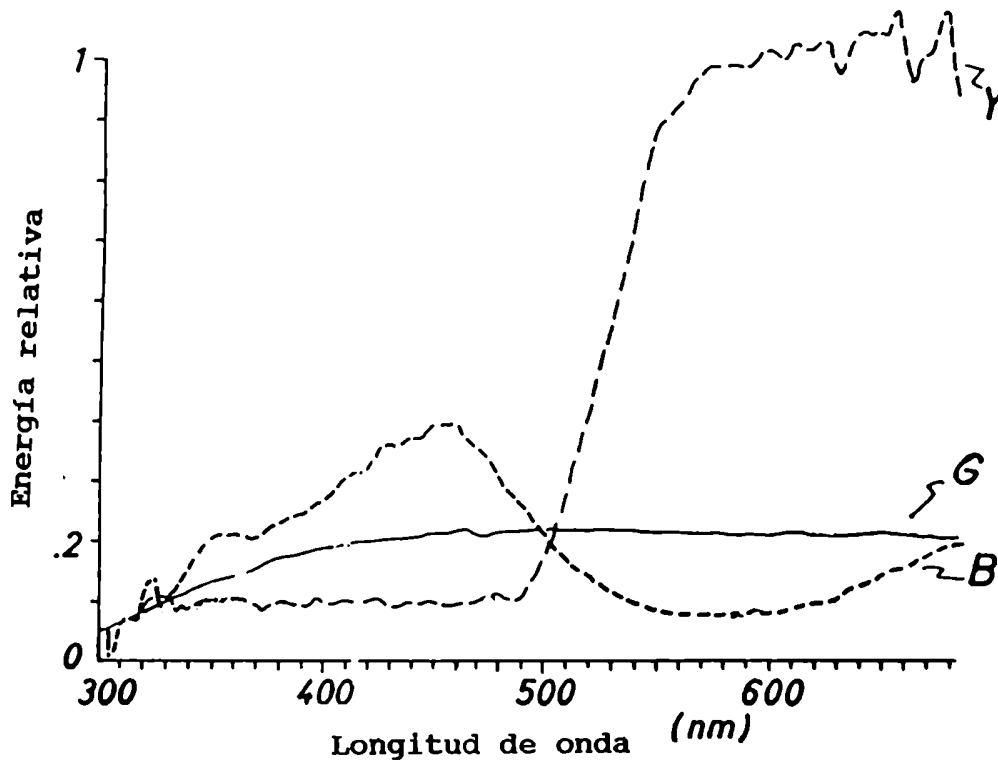
Los colores usados en las flores fueron amarillo y azul (fácilmente discriminados uno del otro por las abejas [Daumer 1956, Rose & Menzel 1981]) sobre un fondo gris neutro en el disco acrílico de base (Figura 5). Las curvas de reflexión de los estímulos empleados fueron determinadas por el Prof. Dr. Randolph Menzel (Berlín, Alemania).

El motor sincrónico se encendía cada vez que que la abeja experimental llegaba al simulador y se apagaba en el momento en que dejaba el dispositivo para dirigirse a la colmena

Las flores numeradas fueron asignadas a dos grupos definidos en base a series aleatorias de números. Así las flores 1, 2, 3, 5, 8 y 12 fueron asignadas al **Grupo I** mientras que las flores 4, 6, 7, 9, 10 y 11 integraron el **Grupo II**. De este modo se aseguró una distribución azarosa de las posiciones cuando los dos colores eran presentados al mismo tiempo en el simulador.

Un calefactor infrarrojo, ubicado a 1m de altura sobre el dispositivo, mantuvo la temperatura del área de forrajeo a aproximadamente 24°C .

A)



B)

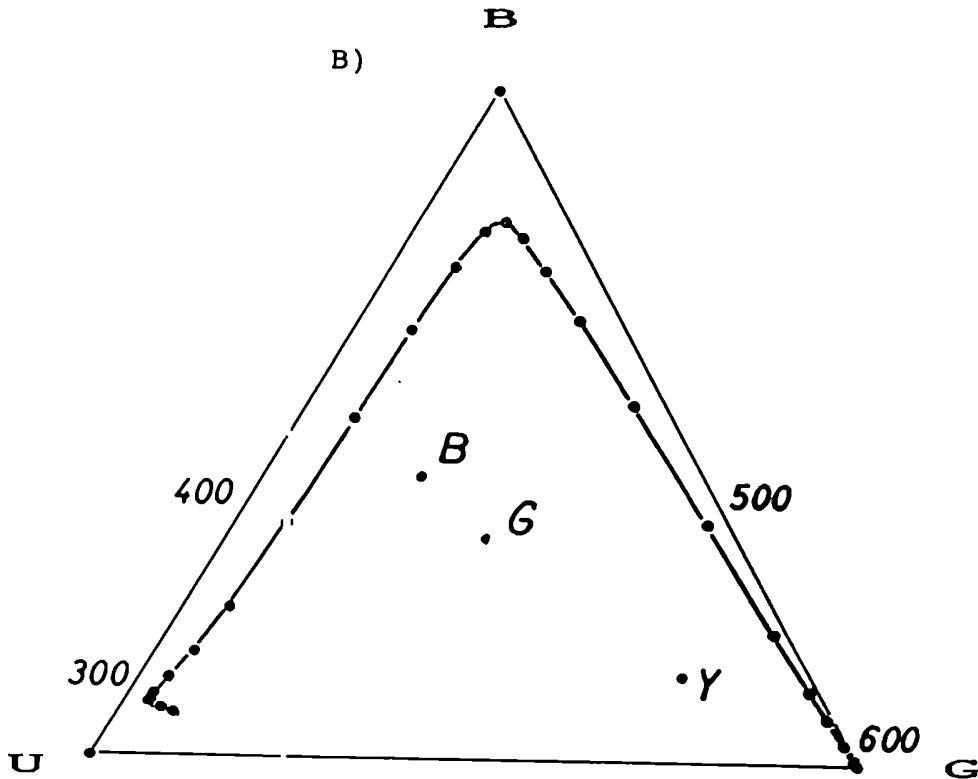


Figura 5. (a) Funciones de reflexión espectral de los dos estímulos usados. B: azul; Y: amarillo (G: fondo gris). (b) Diagrama de cromaticidad de la abeja con los loci de las dos señales de color usadas; B: azul; Y: amarillo; G: fondo gris. La línea espectral está marcada a los 300, 400, 500 y 600 nm.

2.2. Procedimiento experimental:

Las abejas fueron condicionadas a trabajar en el dispositivo experimental. Para esto, un platillo con solución azucarada (la misma que se provee luego en el simulador) es situado en la piquera de la colmena. Cuando las abejas empiezan a libar en él, el plato sobre el que se hallan es transportado al lugar donde se halla el simulador de doce flores. Las abejas pronto aprenden el recorrido y van y vienen de la colmena al laboratorio, al cual entran mediante una ventana previamente abierta. Cuando se retira el platillo, las abejas empiezan a buscar la solución, la que finalmente encuentran fluyendo en el fondo de las flores, condicionándose entonces a trabajar regularmente en el dispositivo.

Una vez logrado esto, se elegía una abeja para las mediciones experimentales y se la identificaba mediante un punto de color en el tórax (Frisch 1967). Las abejas restantes eran capturadas, alimentadas y enjauladas para uso posterior.

Cuatro *situaciones experimentales* consecutivas fueron ofrecidas a la abeja en el simulador durante series de visitas sucesivas:

- (1) todas las flores del simulador presentaban el color A (azul o amarillo), como primer color de entrenamiento.
- (2) en las flores del Grupo I (o II), el color presentado fue ahora el color B (amarillo o azul), i.e., un segundo color alternativo era presentado en el simulador.
- (3) todas las flores del simulador presentaron el color B (amarillo o azul), como segundo color de entrenamiento.

- (4) en las flores del Grupo II (o I) el color presentado fue ahora el color A (azul o amarillo), i.e., nuevamente dos colores eran presentados simultáneamente en el simulador.

Dos series de entrenamiento fueron llevadas a cabo. En la *primera serie de entrenamiento*, cada situación descrita anteriormente duró dos visitas consecutivas. Así, durante las visitas 1 y 2, la abeja encontró a todas las flores con el color A; durante las visitas 3 y 4 encontró los colores A y B simultáneamente; durante las visitas 5 y 6 encontró el color B y finalmente, durante las visitas 7 y 8 encontró los colores A y B simultáneamente.

En la *segunda serie de entrenamiento*, cada situación fue presentada durante nueve visitas consecutivas, i.e. durante las visitas 1-9 encontró a las flores con el color A y así sucesivamente.

Se realizaron siete réplicas de cada serie experimental, con una abeja cada una.

Los parámetros comportamentales medidos fueron:

El Tiempo de Visita: el tiempo que una abeja pasa en el simulador durante una visita.

El Tiempo de Ausencia: el tiempo que una abeja pasa fuera del simulador entre visitas.

La Elección Floral: la aproximación en vuelo de la abeja a una flor, seguida por un aterrizaje y/o por una inspección plena de la misma.

Los experimentos fueron realizados durante dos períodos distintos en lo que respecta al flujo de néctar en las fuentes naturales: verano (Diciembre-Marzo) con altos flujos de néctar y otoño (Marzo-Mayo) con bajos flujos de néctar.

2.3. Estadística:

Las posibles desviaciones de una distribución azarosa de las inspecciones respecto de los dos colores fue analizada mediante el Test de G (Sokal & Rohlf 1981).

Las posibles desviaciones de un arreglo azaroso de las *secuencias de inspecciones* sobre un mismo color fueron analizadas mediante el Test de Rachas (Draper & Smith 1966).

3. RESULTADOS

Un posible sesgo hacia los grupos I o II por efectos posicionales fue analizado durante las situaciones experimentales 1 y 3, es decir, cuando todas las flores del simulador presentaban un único color, amarillo o azul. Los resultados del Test de G se presentan en la Tabla 1. En estas situaciones, no se observaron desvíos de una distribución azarosa de las inspecciones entre los dos grupos I y II. Así, cuando un único color era presentado en el dispositivo, las abejas no se guiaban por una posible información de posiciones.

El desvío de una distribución azarosa de las inspecciones entre los dos grupos *hacia el color de entrenamiento* (amarillo o azul) como resultado de las situaciones experimentales 1 y 3 fue analizado en las series experimentales 2 y 4, i.e. cuando las

flores de uno de los grupos (I o II) presentaban el color alternativo. En este caso, las abejas encontraron seis flores amarillas y seis flores azules, todas recompensadas. Los resultados del Test de G muestran que durante la primera visita de la nueva situación con dos colores (visitas 3 y 10 de las series de entrenamiento 1 y 2 respectivamente), las abejas eligieron significativamente el color de entrenamiento (color A). Sin embargo, esta asimetría en la elección de los dos colores persistió, por lo general, sólo durante el primer tercio de esta visita (visita n° 3 de la primera serie de entrenamiento y visita n° 10 de la segunda serie de entrenamiento). Pronto las abejas empezaron a elegir por igual ambos colores. No existieron diferencias en la tasa de extinción de la preferencia inicial entre la primera serie de entrenamiento (2 visitas de entrenamiento) y la segunda serie de entrenamiento (9 visitas de entrenamiento).

Por último, en la cuarta situación experimental no se observó desviación alguna de una distribución azarosa de las inspecciones pese a que nuevamente los dos colores se hallaban presentes en el dispositivo.

Ante estos resultados, nos preguntamos si realmente la información "colores distintos" era usada por las abejas cuando los colores A y B eran presentados simultáneamente en el dispositivo ya que, las inspecciones se distribuían azarosamente entre estos dos colores. Para esto analizamos nuestros datos mediante el Test de Rachas. Este test evalúa si el número de rachas sobre dos categorías cualquiera A y B (secuencias de tipo AAA-BB-AA-BBB-A-B: seis rachas totales sobre seis A y seis B, por ejemplo) sigue o no un arreglo azaroso. En otras palabras, si las abejas realizan secuencias de inspecciones relacionadas con el

color de acuerdo a un patrón inusual (si siguen o alternan colores), esto se traducirá en un número menor o en un número mayor de rachas que el esperable por azar respectivamente.

Nótese, respecto del ejemplo anterior de las rachas, que dos maneras distintas de distribuir los seis A y los seis B son: AAAAAA-BBBBBB o bien A-B-A-B-A-B-A-B-A-B-A-B. En ambos casos la distribución resultante de las elecciones sobre A y B parece azarosa (6A vs 6B) pero las secuencias de elección se apartan del azar: en el primer caso hay sólo dos rachas (se sigue el color) y en el segundo caso hay doce rachas (se alterna el color).

Tabla 1

Situación	1ª Serie			2ª Serie		
	Visita	G	P	Visita	G	P
1ª	1	0.35	NS	1	0.03	NS
	2	0.00	NS	2	0.25	NS
2ª	3	10.36	<0.005	10	11.56	<0.001
	4	0.67	NS	11	0.27	NS
3ª	5	0.71	NS	19	0.74	NS
	6	0.38	NS	20	0.72	NS
4ª	7	0.08	NS	28	0.05	NS
	8	0.67	NS	29	0.005	NS

Para la segunda serie de entrenamiento (9 visitas por situación) se presentan sólo las dos primeras visitas de cada situación. Los valores de G para las visitas faltantes fueron todos NS.

Los resultados obtenidos al comparar los datos agrupados de la 1ª y 3ª situación experimental versus los de la 2ª y 4ª situación experimental (un color vs dos colores en el simulador) se presentan en la Tabla 2(a) para la primera serie de entrenamiento y en la 2(b) para la segunda serie de entrenamiento. Los datos presentados son el número de visitas de cada situación experimental en las que las secuencias de inspecciones se apartaron de un arreglo azaroso o no. Obviamente, cuando un solo color está presente en el simulador (1ª y 3ª situación), las dos categorías sobre las que se consideran las secuencias de inspecciones son los grupos I y II de flores a los que se les asignaba posteriormente colores distintos (2ª y 4ª situación).

En las dos series de entrenamiento se observa que el número de visitas en las que las secuencias de inspecciones no siguieron un arreglo azaroso fue significativamente mayor toda vez que los dos colores eran presentados simultáneamente en el simulador. Del mismo modo, cuando un solo color era presentado en el dispositivo (control: situación 1ª y 3ª), las visitas mostraron secuencias de inspecciones azarosas en relación con los grupos de flores I y II.

Que las secuencias de inspecciones no siguieran un arreglo azaroso en el tiempo toda vez que dos colores se presentaban simultáneamente en el dispositivo, nos indica que la información de color era tomada en cuenta (pese a que las inspecciones se distribuían por igual sobre los dos colores) pero no nos indica de qué manera esto ocurría.

Para esto calculamos la longitud media de racha (número total de inspecciones/número de rachas) en aquellas situaciones en las que las secuencias de inspecciones se apartaron del azar (situaciones experimentales 2ª y 4ª: dos colores en el dispositivo).

Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Se observa que, en ambas series de entrenamiento, la longitud media de racha fue significativamente **mayor** que lo esperado por azar en la primera visita de la segunda situación experimental, i.e. cuando las abejas encontraron por primera vez los dos colores, el de entrenamiento y el nuevo, en el simulador. Esto es, las abejas "siguieron" el color A.

En las visitas restantes, en ambas series de entrenamiento, la longitud media de racha fue en cambio significativamente **menor** que lo esperado por azar (longitud media de racha en la 3^a situación experimental (un color solo) = 1.88 ± 0.06 vs longitud media de racha en la 4^a situación experimental (dos colores) = 1.73 ± 0.03 ; $t = 6.3245$; $P < 0.001$). Esto es, las abejas pasaron a "alternar" colores en rachas cortas.

Tabla 2

Test de Rachas	1 ^a y 3 ^a situación (control)	2 ^a y 4 ^a situación (test)	G	P
<u>(a) Primera Serie</u>				
<0.005	1	27	31.57	<0.001
NS	27	1	31.57	<0.001
Total	28	28		
<u>(b) Segunda Serie</u>				
<0.005	9	107	97.51	<0.001
NS	117	19	78.53	<0.001
Total	126	126		

Número de visitas en las que las secuencias de inspecciones se apartaron de un arreglo temporal azaroso (<0.005) o no (NS) para la primera serie de entrenamiento [2(a)] y para la segunda serie de entrenamiento [2(b)].

Tabla 3

Situación	Primera Serie		Segunda Serie	
	Visita	LMR ± D.S.	Visita	LMR ± D.S.
2 ^a	3	2.37 ± 0.32	10	2.75 ± 1.01
	4	1.77 ± 0.17	11	1.57 ± 0.14
4 ^a	7	1.72 ± 0.04	28	1.70 ± 0.04
	8	1.74 ± 0.06	29	1.74 ± 0.09

LMR: longitud media de racha=número total de inspecciones/número de rachas.

4. DISCUSION

En el presente diseño experimental, las abejas no mostraron asimetrías en la elección de color (Tabla 1). Esta falta de asimetría fue independiente de la hora del día, de la estación y de la secuencia de colores propuesta en el simulador.

Luego de un condicionamiento intensivo a un color en ausencia de otros, las abejas mostraron un sesgo en sus elecciones hacia el color de entrenamiento durante la primera visita de la segunda situación experimental (dos colores - Tabla 1). Este sesgo desapareció luego de unas pocas inspecciones recompensadas en el color nuevo. Este comportamiento muestra que las abejas revirtieron rápidamente su aprendizaje original al ser también recompensadas en el color novedoso. En efecto, la abeja es muy eficiente en la recolección de néctar y ante una situación desventajosa (de mantenerse en sólo seis flores del color original obtendría, obviamente, la mitad del néctar recogido en la experiencia anterior, cuando las doce flores presentaban el color A), decide inspeccionar el color "desconocido" y muy pronto aprende que también el nuevo color ofrece recompensa: así, trabajando en ambos, obtiene el monto de solución azucarada original.

Que las abejas puedan revertir el aprendizaje de ciertos estímulos no es un hecho novedoso (Menzel 1969, 1985, Bogdany 1978). En un entorno natural que varía en la oferta de especies florales, resulta fundamental la posibilidad de aprender nuevos estímulos asociados con flores más rentables.

El análisis estadístico del número de rachas en los dos colores mostró que el color es continuamente usado como clave de orientación durante las visitas de recolección de las abejas en el

simulador. Esto se muestra en las Tablas 2(a) y 2(b), donde se observa que toda vez que dos colores fueron presentados simultáneamente en el dispositivo, el número de rachas sobre ambos colores se desvió significativamente de lo esperado por azar. Por otro lado, una posible información referida a la posición de las flores en el dispositivo no fue usada por las abejas que recolectaban néctar en el simulador. Esto se observa también en las Tablas 2(a) y 2(b) donde, en las situaciones-control (un solo color presente), la mayor parte de las visitas no mostró desvíos significativos de lo esperable por azar en lo que respecta a las secuencias de inspecciones sobre los grupos I y II.

Si se toma además en cuenta la longitud de racha, el color aprendido originalmente (color A) fue seguido a través de rachas más largas que las esperables por azar durante la primera visita de la segunda situación experimental. Luego, las abejas pasaron a realizar rachas más cortas que las esperables por azar (Tabla 3). Sin embargo, dado que el cambio de "seguir el color de entrenamiento" a "alternar" ocurrió luego de unas pocas inspecciones y con distintos lapsos de tiempo en cada abeja, la longitud media de racha en la primera visita de la segunda situación experimental mostró una alta variabilidad (Tabla 3).

Así, estos resultados sugieren que la información de color es usada para saltar de un grupo de flores con un color a otro grupo de flores con otro color, en una estrategia que parece relacionada con la probabilidad de encontrar recompensa en un mismo color. Esto es, dado que la información de posición no es usada por las abejas, cada inspección reiterada sobre un mismo color disminuiría la probabilidad de encontrar recompensa en ese color. Una

solución posible es pues "saltar" permanentemente de un color a otro.

Estos resultados apoyan la idea de que el color es una clave para la toma de decisiones durante la recolección de néctar, tal como se infiere de la conocida "constancia floral" de las abejas (Frisch 1914, 1967, Faegri & van der Pijl 1966) que despliegan su actividad recolectora sobre un único tipo de flores por visita, independientemente de que en las inmediaciones existan otros morfos o especies florales capaces de proveer una atractiva recompensa en néctar o polen.

En condiciones naturales, flores diferentes pueden requerir patrones motores diferentes para la explotación del néctar y del polen. De ocurrir así, tales flores tienen alta probabilidad de estar señalizadas por colores distintos (Heinrich 1975). Así, la constancia de colores representaría en realidad una estrategia tendiente a optimizar la manipulación floral al evitar la complicación que tendrían las abejas de tener que asociar un patron motor de inspección dado con distintos colores al mismo tiempo. La recolección de alimento es entonces más eficiente si las abejas trabajan "en serie" (es decir, siguiendo un solo tipo floral), como realmente lo hacen en tanto y en cuanto la oferta en néctar de ese tipo floral sea rentable.

Los abejorros (*Bombus sp.*) también recolectan néctar y polen de una gran variedad de flores y, en cada momento, cada individuo trabaja sobre un número limitado de especies florales. Esto es, como la abeja *A. mellifera*, las especies de *Bombus* son generalistas florales pero los individuos son especialistas (Heinrich 1976). Sin embargo, el hecho de que en selvas tropicales tanto diferentes especies de abejas sin aguijón cuanto

la propia abeja africanizada *A. m. scutellata* (Núñez, comunicación personal) despliegan un comportamiento recolector altamente poliléctico (i.e. visitan habitualmente distintas especies florales en un mismo viaje de recolección) muestra que otras estrategias son posibles.

Por último, si bien no pudimos demostrar la existencia de preferencias espontáneas capaces de "torcer" el aprendizaje de un color dado en el presente diseño experimental, demostramos una falta de asimetría entre el azul y amarillo empleados. De esto podría concluirse que esta falta de asimetría indicaría una prominencia similar del azul y del amarillo lo cual coincidiría con la ausencia de preferencia por alguno de estos dos colores. Sin embargo, podría ocurrir en realidad que el aprendizaje de colores en las fuentes de alimento tenga un efecto tan fuerte que enmascararía cualquier preferencia espontánea débil.

La elección espontánea de colores en las fuentes de alimento resulta así prácticamente imposible de estudiar experimentalmente ya que el animal debe estar motivado para la búsqueda de alimento en un lugar dado y que la obtención misma del alimento involucra el rápido aprendizaje de las claves, visuales y otras, relacionadas con la fuente de alimento. Así, si las abejas fuesen capaces de generalizar de una clave visual a otra, como realmente parecen hacerlo (Menzel & Núñez, trabajo inédito), cualquier preentrenamiento tendría en realidad un fuerte impacto en la elección posterior de colores aun si se usaran señales de color "neutras" (grises, blancas o negras).

Este último punto es el que da origen precisamente al siguiente capítulo.

5. CONCLUSION

No se observaron preferencias por alguno de los dos colores empleados (azul y amarillo) en el diseño experimental empleado.

Sin embargo, el análisis de las secuencias de inspecciones mostró que las abejas emplearon una estrategia relacionada directamente con las señales de color: el color fue usado como clave para saltar de un grupo de flores con un color a otro grupo de flores con otro color en una estrategia que parece relacionada con la probabilidad de encontrar recompensa en un mismo color.

Se observa así cómo el color puede constituir una herramienta para la optimización de la recolección de néctar.

Se plantea finalmente la pregunta acerca de si las preferencias espontáneas observables por determinados colores no podrían estar en realidad influidas por la generalización y aprendizaje de señales de color teóricamente neutras.

CAPITULO 3

PREFERENCIAS ESPECTRALES Y
GENERALIZACION DE COLORES EN LA
ABEJA *Apis mellifera*

1. INTRODUCCION

Como se dijo en el capítulo anterior, las preferencias espontáneas de las abejas por determinados colores han sido inferidas a partir de estudios de aprendizaje (Menzel 1967, 1968). El tema de las preferencias innatas por ciertos colores no ha sido aún analizado adecuadamente toda vez que se intentó estudiar el así llamado comportamiento de elección espontánea de abejas en libre vuelo. Una dificultad importante de estos ensayos es la fuerte influencia que ejercerían los procedimientos de preentrenamiento que podrían oscurecer información preexistente.

Se ha sugerido además que las abejas usarían la información aprendida en un lugar nuevo antes que transferir experiencias previas de lugares distintos. De ser así, este hecho subrayaría aún más la importancia de los procedimientos de preentrenamiento en relación con el comportamiento de elección de las abejas recolectoras. Planteamos entonces la pregunta acerca de si las preferencias espontáneas de las recolectoras podrían estar afectadas por la generalización de claves espectrales teóricamente neutras, ofrecidas durante el proceso de entrenamiento. Los resultados obtenidos permitieron establecer una jerarquía de colores, surgida de ensayos de elección posteriores a situaciones

de preentrenamiento controladas en el simulador de flujo de néctar.

2. MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron abejas *Apis mellifera ligustica* de una colmena situada a 40 m del laboratorio, instalada en el apiario de la Sociedad Argentina de Apicultores (S.A.D.A.), González Catán, provincia de Buenos Aires (lat. 34.6° Sur).

Se usó el simulador de flujo de néctar ya descrito.

2.1. Procedimiento experimental:

Las abejas fueron primero entrenadas a recolectar néctar en las doce flores numeradas sin marcas de color sobre un fondo gris. El flujo total de solución azucarada 50% (p/p) provisto fue 2.04 $\mu\text{l}/\text{min}$ (cada flor recibió 1/12 de este flujo total, es decir, 0.17 $\mu\text{l}/\text{min}$). Con este flujo total, las abejas realizaron 117.5 ± 3.65 inspecciones por visita (media \pm S.E.; n=80 visitas).

Luego, una abeja fue seleccionada para las medidas experimentales, señalada mediante un punto de color en el tórax y entrenada, durante dos visitas consecutivas, a recolectar solución azucarada en las flores que presentaban, cada una, un disco de aluminio que reflejaba un espectro continuo (Figura 6). El resto de las abejas fue enjaulado para uso posterior.

Luego del entrenamiento, la abeja experimental fue enfrentada a dos (Experimento 1) o tres colores (Experimento 2) no recompensados en el simulador. Para esto, dos o tres grupos de flores fueron previamente definidos (Grupos I, II y III). En cada

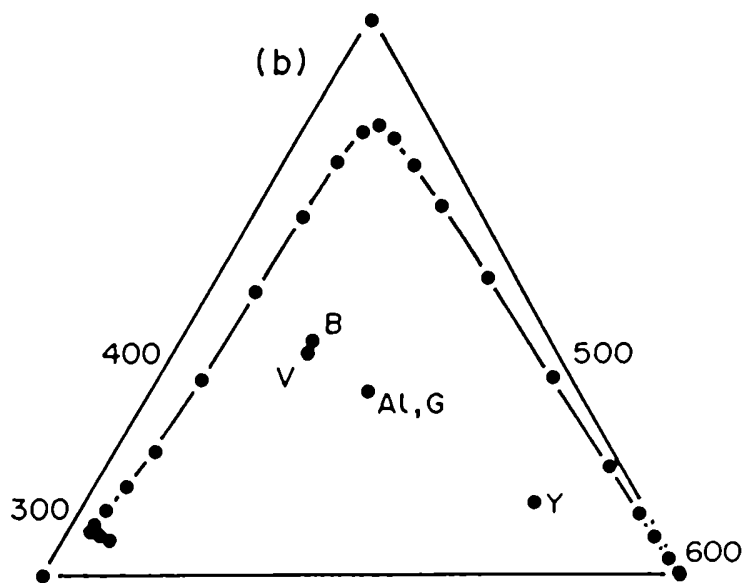
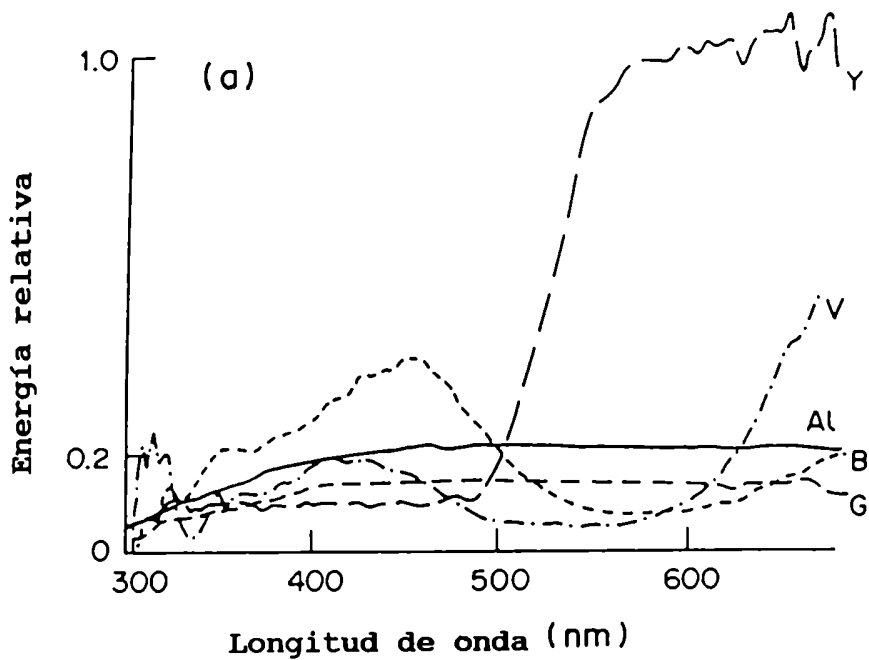


Figura 6. (a) Funciones de reflexión espectral de los cuatro estímulos usados. Al: aluminio; V: violeta; B: azul; Y: amarillo; G: fondo gris. (b) Diagrama de cromaticidad de la abeja con los loci de las cuatro señales de color usadas; Al: aluminio; V: violeta; B: azul; Y: amarillo; G: fondo gris. La línea espectral está marcada a los 300, 400, 500 y 600 nm.

flor, el disco de aluminio fue situado, como los discos de color, entre los discos acrílicos y no podía, por ende, ser marcado por las abejas.

La elección floral (aproximación en vuelo de la abeja a una flor, seguida por un aterrizaje y/o por una inspección plena de la misma) fue medida durante las dos visitas de entrenamiento y durante los primeros 5 minutos de la tercera visita, i.e. durante las dos visitas con el aluminio recompensado y durante los primeros 5 minutos de la visita en la cual estaban presentes los colores no recompensados.

Los colores usados fueron: violeta, amarillo y azul (Figura 6).

Los colores se cambiaban de un grupo a otro (I, II o III), de una abeja a otra. Cada abeja actúa así como control de las otras.

Los resultados fueron obtenidos a partir de 147 visitas de 49 abejas distintas.

Para descartar un posible cambio de las propiedades cromáticas de los discos de aluminio, inducido por los discos acrílicos que los recubrían, los primeros fueron puestos sobre los segundos en visitas-control de entrenamiento. Los discos de colores fueron mantenidos bajo los discos acrílicos en las visitas-test. Los resultados no mostraron en este caso ningún efecto de los discos acrílicos en el comportamiento de elección de las abejas.

Los parámetros espectrales de los cartones de color y sus respectivos espectros de reflexión fueron obtenidos por gentileza del laboratorio del Prof. Dr. Randolph Menzel (Berlin, Alemania); el espectro de reflexión de los discos de aluminio fue obtenido

por el Grupo Argentino del Color (G.A.C.) del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (I.N.T.I.), Buenos Aires.

Los experimentos fueron realizados durante dos períodos distintos en lo que respecta al flujo de néctar en las fuentes naturales: verano (Diciembre-Marzo), con altos flujos de néctar, y otoño (Marzo-Mayo), con bajos flujos de néctar, de 1989.

2.2. Estadística:

El desvío de una distribución azarosa de las inspecciones entre los dos colores (Experimento 1) fue analizado mediante el Test de G (Sokal & Rohlf 1981).

El Test de X^2 fue usado con el mismo fin cuando tres colores eran presentados simultáneamente en el dispositivo.

3. RESULTADOS

En el Experimento 1, una asimetría en las elecciones hacia el violeta surgió cuando este color fue enfrentado al amarillo (Tabla 4). Los valores medios de las 13 abejas estudiadas en esta situación muestran que las abejas realizaron una elección simétrica de los grupos I y II y que luego esta elección se desvió significativamente hacia el violeta en la visita-test ($G=21.26$; $P<0.001$). Por otro lado, si se toman los valores de la visita-test de cada una de las 13 abejas, un valor de G de heterogeneidad puede ser obtenido. En este caso (violeta vs. amarillo), $G_{het}=16.28$ que es NS con 12 grados de libertad; i.e., todas las

abejas prefirieron de la misma significativa manera al violeta cuando éste fue enfrentado al amarillo.

Al ofrecer violeta y azul simultáneamente, se observó una simetría aparente entre los dos colores; tomando en cuenta los valores medios de las 12 abejas estudiadas en esta situación, azul y violeta parecen ser elegidos por igual (Tabla 5: $G=2.69$; NS). Sin embargo, el valor de G para los datos agrupados (G_{pooled}) de las 12 réplicas (violeta: 398 inspecciones - azul: 251 inspecciones) fue $G=33.59$ ($gl:1$; $P<0.001$) y muestra que hubo un desvío pronunciado hacia el violeta. De las 12 abejas estudiadas, 5 mostraron un valor de G significativo (sesgo hacia el violeta) y 7 mostraron un valor de G no significativo. Con todo, $G_{het}=18.66$, que es NS con 11 grados de libertad. Esto es, aun cuando 7 abejas no mostraron valores de G significativos, en todos los individuos ensayados existió una tendencia hacia el violeta al ser enfrentado al azul. No se observó sesgo alguno hacia el azul.

Finalmente, cuando el azul y el amarillo fueron ofrecidos simultáneamente en el dispositivo, un desvío significativo hacia el azul fue observado (Tabla 6: $G=6.26$; $P<0.025$). Sin embargo, aun cuando el valor de G para los datos agrupados de las 8 abejas estudiadas fue altamente significativo (azul: 211 inspecciones - amarillo: 86 inspecciones; $G=54.28$; $gl:1$; $P<0.001$), el valor de G_{het} fue 79.94 ($gl:7$; $P<0.001$). Esto es, no todas las abejas mostraron una desviación clara hacia el azul cuando éste fue enfrentado al amarillo, aun si los valores medios o los agrupados evidenciaron un desvío significativo hacia el azul.

El Experimento 2 confirmó el orden jerárquico establecido para los tres estímulos espectrales: violeta en primer lugar, azul en segundo lugar y amarillo en tercer lugar. Las abejas, que

realizaron durante las visitas de entrenamiento una elección simétrica de los tres grupos de flores previamente definidos, mostraron en la visita-test un desvío significativo hacia el grupo de flores violetas, siendo el azul, a su vez, más preferido que el amarillo (Tabla 7: $\chi^2=11.77$; $gl:2$; $P<0.005$).

Finalmente, para analizar hasta qué punto el estímulo del aluminio es "neutro" respecto de la elección de colores (i.e. si influye o no en la elección de colores), fue ofrecido enfrentado al violeta (seis flores con aluminio y seis flores violeta), luego de las dos consabidas visitas de entrenamiento a las flores con discos de aluminio. Los resultados se presentan en la Tabla 8. Los valores medios de las nueve abejas estudiadas en esta situación muestran que los insectos aprendieron a asociar efectivamente el estímulo del disco de aluminio con la recompensa de solución azucarada y que por ende lo prefirieron frente al violeta ($G=7.27$; $P<0.01$). Por otro lado, el valor de G_{het} calculado fue de 10.11 que es NS con 8 grados de libertad. Esto es, todas las abejas prefirieron significativamente con igual sesgo el aluminio antes que el violeta.

Tabla 4

	Visita	Grupo I	Grupo II	Total	G
<i>Entrenamiento</i>	1	53	56	109	0.08 (NS)
	2	61	61	122	0 (NS)
<i>Test</i>		Violeta: 38 Amarillo: 8 Total: 46 G = 21.26 (P<0.001)			

Violeta vs amarillo (n=13 abejas). Valores medios de elección floral de 13 abejas en un test en el que flores violetas eran enfrentadas a flores amarillas luego de dos visitas de entrenamiento a flores con discos de aluminio.

En la visita-test, los colores fueron asignados en forma variable a los Grupos I y II (seis flores cada uno) de modo de asegurar una distribución aleatoria en el simulador de flujo de néctar

Tabla 5

	Visita	Grupo I	Grupo II	Total	G
<i>Entrenamiento</i>	1	49	48	97	0 (NS)
	2	60	58	118	0.02 (NS)
<i>Test</i>		Violeta: 33 Azul: 21 Total: 54 G = 2.69 (NS)			

Violeta vs azul (n=12 abejas). Valores medios de elección floral de 12 abejas en un test en el que las flores violetas eran enfrentadas a flores azules luego de dos visitas de entrenamiento a flores con discos de aluminio.

En la visita-test, los colores fueron asignados en forma variable a los Grupos I y II (seis flores cada uno) de modo de asegurar una distribución aleatoria en el simulador de flujo de néctar.

Tabla 6

	Visita	Grupo I	Grupo II	Total	G
<i>Entrenamiento</i>	1	43	49	92	0.39 (NS)
	2	61	61	122	0 (NS)
<i>Test</i>		Azul:	26		
		Amarillo:	11		
		Total:	37		
		G = 6.26 (P<0.025)			

Azul vs amarillo (n=8 abejas). Valores medios de elección floral de 8 abejas en un test en el que las flores azules eran enfrentadas a flores amarillas luego de dos visitas de entrenamiento a flores con discos de aluminio.

En la visita-test, los colores fueron asignados en forma variable a los Grupos I y II (seis flores cada uno) de modo de asegurar una distribución aleatoria en el simulador de flujo de néctar.

Tabla 7

	Visita	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Total	X ²
<i>Entrenamiento</i>	1	39/39	39/39	39/39	117	0(NS)
	2	37/36.33	36/36.33	36/36.33	109	0.02(NS)
<i>Test</i>		Violeta:	21/13.33			
		Azul:	13/13.33			
		Amarillo:	6/13.33			
		Total:	40			X ² = 11.77 (P<0.005)

Violeta vs azul vs amarillo (n=7 abejas). Valores medios de elección floral de 7 abejas en un test en el que las flores violetas eran enfrentadas a flores azules y a flores amarillas luego de dos visitas de entrenamiento a flores con discos de aluminio. Bajo barras, las frecuencias esperadas para cada grupo según una distribución aleatoria de las inspecciones en los Grupos I, II y III.

En la visita-test, los colores fueron asignados en forma variable a los Grupos I, II y III (cuatro flores cada uno) de modo de asegurar una distribución aleatoria en el simulador de flujo de néctar.

Tabla 8

	Visita	Grupo I	Grupo II	Total	G
<i>Entrenamiento</i>	1	54	50	104	0.15 (NS)
	2	48	53	101	0.25 (NS)
<i>Test</i>		Aluminio: 29			
		Violeta: 12			
		Total: 41			
		G = 7.27 (P<0.01)			

Aluminio vs violeta (n=9 abejas). Valores medios de elección floral de 9 abejas en un test en el que las flores con aluminio eran enfrentadas a flores violetas luego de dos visitas de entrenamiento a flores con discos de aluminio. En la visita-test, el aluminio y el violeta fueron asignados en forma variable a los Grupos I y II (seis flores cada uno) de modo de asegurar una distribución aleatoria en el simulador de flujo de néctar.

4. DISCUSION

Nuestros resultados sugieren que, luego de un entrenamiento a una señal de reflexión relativamente continua y equivalente en el espectro visible (el aluminio), un orden jerárquico respecto de la elección de colores como señales en las fuentes de alimento puede ser establecido en las abejas de libre vuelo. El Experimento 1 permitió la comparación entre pares de colores y el Experimento 2 confirmó el orden jerárquico establecido en el Experimento 1.

Las abejas entrenadas al aluminio, con una reflexión espectral relativamente pareja en el espectro visible y una reflexión en el UV mayor que la del fondo, mostraron una preferencia por el violeta, luego por el azul y finalmente por el amarillo. Parece difícil decidir si este comportamiento de elección sesgada resulta de preferencias innatas espontáneas por ciertos colores luego de entrenamiento a una señal teóricamente "neutra" (Menzel 1967, 1985) o de procesos de generalización de la señal de aluminio entrenada.

La segunda posibilidad supone que la señal de aluminio no sería en realidad "neutra" ya que podría influir la elección posterior de estímulos espectrales. Que la señal no es neutra y que es, en cambio, asociable con la recompensa de solución azucarada se puede ver en la Tabla 8: entre el aluminio y el violeta, las abejas prefirieron significativamente el aluminio. Por otro lado, si se habla de generalización de estímulos espectrales, una estimación de las distancias perceptuales entre los estímulos usados es necesaria.

Como se dijo en el capítulo 1, la determinación de tales distancias es posible mediante el uso del modelo de Backhaus et al. (1987a) y de Menzel y Backhaus (1989), quienes encontraron que

las dos dimensiones perceptuales que definen el espacio de color de la abeja corresponden a dos procesos oponentes de color: UV/Azul-Verde y Azul//UV-Verde. En este modelo, la diferencia perceptual total entre estímulos espectrales se calcula como la suma de las distancias absolutas en las escalas A y B de la Figura 7 (escala A: UV/Azul-Verde; escala B: Azul/UV-Verde). De la Figura 7 (calculada para una adaptación al fondo gris usado), se puede obtener las distancias perceptuales D entre los loci de nuestros cuatro estímulos usados según:

$$D = | (A_i - A_{Alu}) | + | (B_i - B_{Alu}) |,$$

donde A_i y B_i son las coordenadas del color i en las escalas A y B respectivamente.

Las distancias D son: entre aluminio y violeta, 2.39; entre aluminio y azul, 2.72 y entre aluminio y amarillo, 5.90. Así, el orden jerárquico de colores obtenido en los experimentos de "elección espontánea" puede relacionarse con un proceso de generalización en el cual las abejas, entrenadas a la señal de aluminio, prefirieron luego la señal espectral más cercana a la señal preentrenada. Considerando las distancias establecidas entre el aluminio y el azul y el amarillo, los resultados de elección espectral de estas señales se pueden también interpretar como consecuencia del proceso de generalización, en el cual el azul fue preferido al estar más cerca que el amarillo de la señal de aluminio. Del mismo modo, las diferencias en la elección del violeta respecto del azul pueden relacionarse con la mayor cercanía del violeta al locus del aluminio pese a que la diferencia en distancias parece pequeña. El amarillo, el color más alejado, fue así el menos preferido.

En la situación experimental que dio origen al modelo de Backhaus et al. (1987a) (vease también Menzel & Backhaus 1989), el

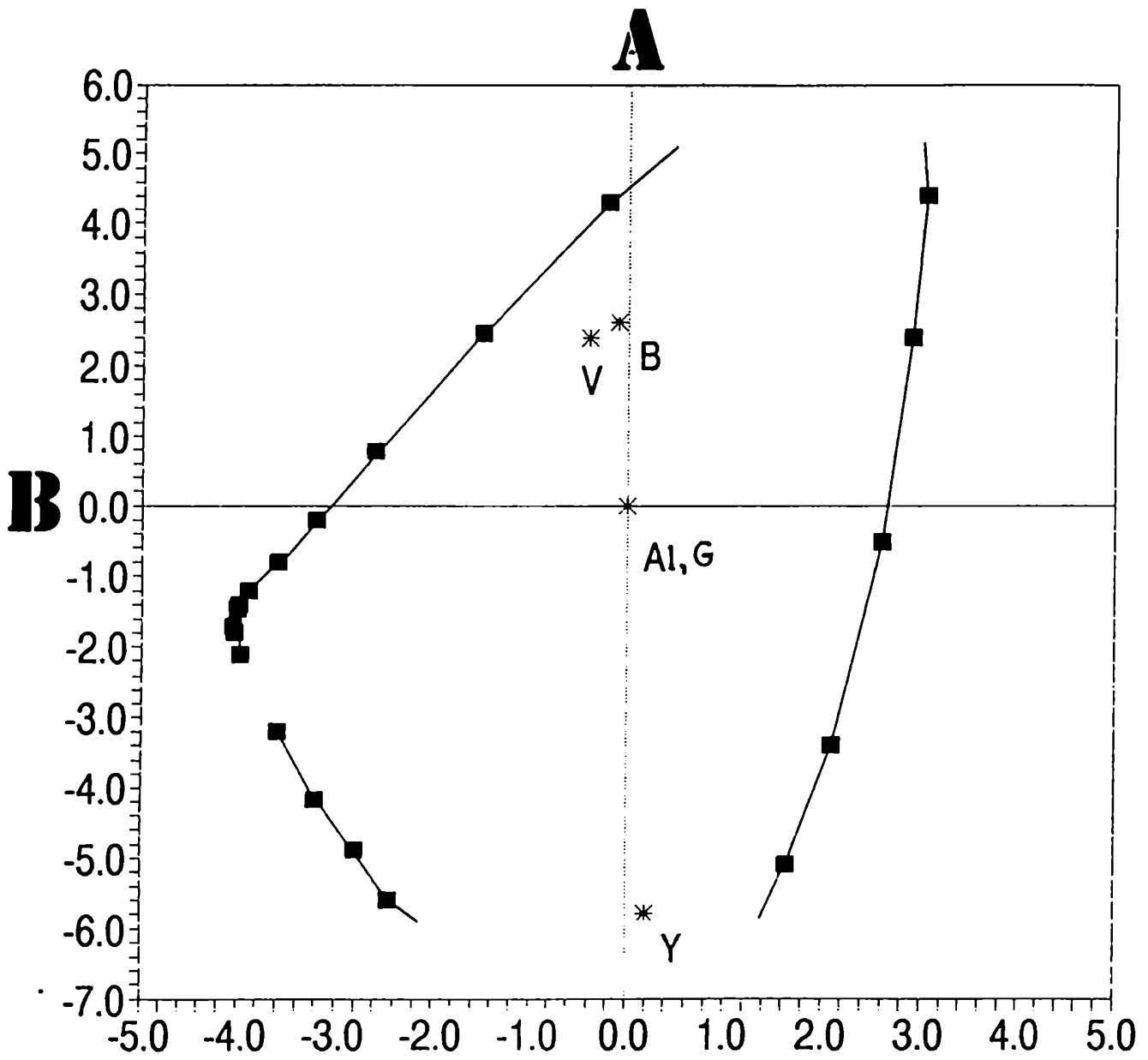


Figura 7. Espacio antagonista de colores incluyendo los cuatro loci de los cuatro estímulos espectrales usados. Al: aluminio; V: violeta; B: azul; Y: amarillo; G: fondo gris. Los ejes A y B corresponden a los dos procesos espectrales antagonistas UV/Azul-Verde y Azul/UV-Verde respectivamente.

brillo es ignorado por las abejas en experimentos de entrenamiento a colores en los cuales las abejas no son entrenadas particularmente a diferencias en el brillo de señales de escasa diferencia en tono y saturación (vease también Backhaus et al. 1987b). Esto coincide con los resultados de Daumer (1956) y von Helversen (1972) (en este contexto, el brillo se define como la suma de las absorciones de los tres tipos de fotorreceptores espectrales luego de adaptación al fondo empleado en el experimento). Sin embargo, las abejas pueden percibir diferencias en el brillo de las señales de color tal como se vio en los primeros experimentos de von Frisch (1914) y en experimentos de fototaxis más recientes (Menzel & Greggers 1985). Así, nuestros resultados podrían estar influenciados en realidad por preferencias espontáneas o aprendidas relacionadas con esta dimensión; i.e. las abejas bajaron al violeta no por el violeta en sí ni por su proximidad perceptual al aluminio, sino por alguna característica especial del brillo. Sin embargo, la medición de los parámetros espectrales empleados nos permitió establecer el siguiente orden jerárquico referido al brillo: (1) azul: 1.3411; (2) amarillo: 1.2266; (3) violeta: 1.0114. Como se ve, este orden no es correlacionable en modo alguno con el obtenido para la elección espectral. De este modo, descartamos que el brillo haya sido una variable relevante en la elección "espontánea" de colores de las abejas.

No podríamos excluir la incidencia de preferencias innatas por colores en nuestros resultados, sobre todo si se considera que el orden de colores propuesto coincide con el orden de preferencias establecido por Menzel (1967) a partir de sus ensayos de aprendizaje : el violeta es aprendido más rápidamente y elegido con mayor precisión, seguido luego por el azul, el amarillo, el

verde, el UV y finalmente el verde-azulado que es aprendido más lentamente y con menor precisión. Sin embargo, es importante subrayar que procesos de generalización diferencial pueden explicar por sí solos nuestros resultados.

Las condiciones ecológicas externas podrían haber influenciado la elección espectral de las abejas estudiadas, i.e. el balance global de las flores nectaríferas - y de sus colores - en el entorno podría reflejarse en realidad en el comportamiento de elección observado. Sin embargo, las 40 abejas usadas arrojaron resultados concordantes en experimentos que cubrieron diferentes períodos de disponibilidad de néctar en las fuentes naturales y diferentes floraciones predominantes (verano y otoño). Por ende, este factor también es descartable como relevante en nuestros resultados.

La principal conclusión de nuestros resultados es que el preentrenamiento desempeña un papel decisivo en el llamado comportamiento de elección espontánea. Las abejas eligen las señales espectrales en una fuente artificial en función de la experiencia previa aprendida en esa misma fuente antes que transferir la información aprendida en lugares distintos. Aun cuando las señales espectrales posteriormente elegidas no estuvieron disponibles durante el preentrenamiento, procesos de generalización diferencial son posibles y pueden entonces influenciar fuertemente cualquier elección "espontánea". Así, el término "espontáneo" adquiere un valor relativo ya que, al no existir señales "neutras", cualquier estímulo podría afectar la elección de colores. Tal como fue afirmado por Menzel (comunicación personal), cualquier ensayo de aprendizaje parece

borrar la vieja memoria e inducir un comportamiento de búsqueda guiado por la nueva información aprendida en el nuevo lugar.

5. CONCLUSION

A lo largo de nuestros experimentos no pudimos demostrar la existencia de preferencias espontáneas, de naturaleza innata, por determinados estímulos espectrales. Esto no significa necesariamente que tales preferencias no existan; puede ocurrir (Menzel 1985) que las abejas muestren en realidad ciertas predisposiciones innatas por ciertos colores pero que éstas sean "débiles" de tal forma que el efecto del aprendizaje las enmascare fácilmente. Este punto constituye justamente una de las principales conclusiones de la primera parte de nuestra tesis: las capacidades de aprendizaje y memorización de estímulos espectrales en la abeja doméstica son tan desarrolladas que cualquier obtención de alimento en una fuente involucra el aprendizaje rápido de las señales asociadas a él de modo tal que, de faltar estas señales posteriormente, pueden ser fácilmente generalizables e influenciar así cualquier elección de estímulos espectrales.

Así, hasta los estímulos pretendidamente neutros pueden ser generalizados, lo cual permite replantear la validez del término "elección espontánea" desde el momento en que esta espontaneidad es también la manifestación de un comportamiento aprendido.

Un experimento crítico posible para probar la existencia o no de preferencias innatas por ciertos colores - actualmente imposible de realizar con los medios que poseemos - consistiría en ofrecer, luego del entrenamiento al aluminio, estímulos

espectrales equidistantes del locus del aluminio (en términos de distancias perceptuales). Así, si la elección resulta aún sesgada hacia algún color, esto podría deberse a las preferencias innatas aludidas, suponiendo que otros factores extraños hayan sido controlados. Sin embargo, este experimento implica el control exacto y calculado de las distancias perceptuales, esto es del tono y de la saturación de los colores a usar, un hecho imposible de lograr con simples cartones de colores pero sí realizable con filtros de color y otros dispositivos adecuados. Del mismo modo, diferentes estímulos espectrales podrían usarse en el entrenamiento con el fin de detectar posibles dependencias del proceso de generalización en relación con la longitud de onda.

Segunda Parte

CAPITULO 4

Importancia de la información olfativa en la recolección de néctar de la abeja *Apis mellifera* L.: uso de una sustancia de "mercado negativo"

1. INTRODUCCION:EL MERCADO NEGATIVO DE FUENTES DE ALIMENTO

El valor funcional de las feromonas de "mercado positivo" se ve al considerar que estas señales permiten la orientación y localización de las fuentes de alimento a cortas distancias. Por ello resultan importantes en la eficiencia recolectora de las abejas. Una intervención similar de sustancias de "mercado negativo" (sustancias que, al ser liberadas, producen el rechazo de las superficies marcadas) en la eficiencia recolectora fue, al principio descartado (Butler 1966, Simpson 1966).

Se ha postulado que los animales nectarívoros sólo pueden realizar una estimación de los contenidos de néctar después de haber probado efectivamente las flores (Pyke 1978). Sin embargo, en el caso de las abejas, se ha sugerido que las recolectoras pueden distinguir flores con néctar de flores vacías visualmente (Thorp et al. 1975), por el olor del néctar en sí (Heinrich 1979, Marden 1984) o por gradientes intraflorales de humedad (Corbet et al. 1979).

Núñez (1967) demostró además experimentalmente que una sustancia de mercado negativo debía ser usada por las recolectoras para distinguir flores con flujo de néctar (recompensadas) de flores sin flujo de néctar (agotadas). Trabajando con doce flores artificiales idénticas (6 recompensadas y 6 agotadas) conectadas a

un extractor de aire, pudo demostrar que las flores agotadas eran rechazadas por las recolectoras, que centraban entonces sus inspecciones en las flores recompensadas, y que estos rechazos desaparecían cuando el extractor de aire era encendido. Por ello, propuso la existencia de una sustancia de marcado negativo, empleada para permitir el reconocimiento de flores agotadas y hacer así más eficiente la recolección de néctar.

Pese a estos resultados, el tema de un probable marcado negativo de flores sólo reaparecería diez años más tarde. En base a observaciones de campo y sin demostración experimental, otros autores sugirieron la existencia de una feromona de marcado negativo en la recolección de néctar: Frankie y Vinson (1977) en *Xylocopa virginica texana*, Corbet et al. (1984) en *Apis mellifera* y en *Bombus pratorum*, Wetherwax (1986) en *Apis mellifera* y Kato (1989) en *Bombus diversus* observaron rechazos de ciertas flores y postularon la existencia de sendas sustancias de marcado negativo de acción similar. Ninguno de estos autores, salvo Corbet et al., quienes parecen haber interpretado mal el diseño experimental, cita el trabajo original de Núñez.

Los trabajos de Frankie y Vinson (1977) están referidos a la recolección de néctar de *X. v. texana* en flores de *Passiflora incarnata*; estos autores observan que cada flor es visitada, en promedio, cada diez minutos. Si una flor es visitada antes de este período, los insectos la rechazan. Por su parte, Corbet et al. (1984) observan, tanto para *A. mellifera* recolectando néctar en flores de *Epilobium angustifolium* y de *E. fleischeri* como para *B. pratorum* en flores de *Borago officinalis*, que flores recientemente visitadas tienen menor probabilidad de ser inmediatamente revisitadas. En el caso de *A. mellifera*, estos rechazos se verificaron si las abejas volvieron a las flores en un

intervalo comprendido entre 1 y 2 minutos; en el caso de *B. pratorum*, el intervalo en cuestión estuvo comprendido entre 2 y 3 minutos. Wetherwax (1986) observa que *A. mellifera*, recolectando néctar en *Lotus corniculatus*, rechazan flores cuyo contenido en néctar es menor en 41% que una muestra al azar de estas flores mientras que las flores aceptadas presentan un contenido de néctar superior en 24% a dicha muestra al azar. Finalmente, Kato (1988) observa que, durante la recolección de néctar en tres especies japonesas del género *Impatiens* (*I. textori*, *I. hypophylla*, e *I. noli-tangere*), *B. diversus* rechazan aquellas flores que han sido recientemente visitadas (hasta 2 minutos antes). Como se ve, estos datos constituyen observaciones congruentes con la hipótesis de un marcado negativo de flores recientemente visitadas más no demostraciones acabadas de la misma.

En nuestro caso, estudiamos la posible utilización de una sustancia de marcado negativo en una situación en que todas las flores de un dispositivo artificial presentaban recompensa de solución azucarada. Se analizaron los comportamientos relacionados con la probable estrategia de marcado negativo y su incidencia en la eficiencia recolectora de la abeja *A. mellifera*.

Esto implicó también un estudio de los patrones de movimiento de las abejas ensayadas en el dispositivo experimental y un análisis de la incidencia de estos movimientos en la eficiencia recolectora

2. MATERIALES Y METODOS

Se emplearon abejas *Apis mellifera ligustica* de una colmena situada a 50 metros del laboratorio, en el apiario de la Sociedad Argentina de Apicultores (S.A.D.A.), González Catán, Provincia de Buenos Aires.

Estas abejas fueron previamente entrenadas a recolectar solución azucarada 50% (p/p) en el Simulador de Flujo de Néctar (Núñez 1971) antes descrito. Fueron entonces marcadas con un punto de color en el tórax (Frisch 1967) para facilitar su posterior identificación.

En este caso, todas las flores del dispositivo experimental presentaron flujo continuo de solución azucarada. El flujo total de solución azucarada provisto fue de 2.04 $\mu\text{l}/\text{min}$ (cada flor recibió 1/12 de este flujo total, esto es, 0.17 $\mu\text{l}/\text{min}$). Calibraciones previas fueron realizadas de modo de asegurar que el flujo de recompensa era realmente equivalente para las doce flores del dispositivo experimental.

Como se muestra en la Figura 4c, cada flor artificial presentaba en su base dos perforaciones adyacentes a la cánula que proveía la solución azucarada de modo que las marcas olfatorias podían ser arrastradas y/o afectadas accionando el extractor.

Luego del pre-entrenamiento, se seleccionaba a una abeja para las medidas experimentales mientras que el resto era enjaulado para uso posterior. Cada individuo fue seguido durante dos visitas consecutivas al Simulador de Flujo de Néctar. Aprovechando la numeración asignada previamente a las flores artificiales, durante la primera visita se midió el número de Inspecciones (descensos en los cuales la abeja se introdujo totalmente en el tubo de acceso de las flores artificiales) y de

Rechazos (descensos en los cuales la abeja introdujo sólo las antenas en el tubo de acceso para luego abandonar inmediatamente la flor) en sus secuencias temporales. También se midieron el Tiempo de Visita (tiempo transcurrido desde la llegada de la abeja al Simulador de Flujo de Néctar hasta su partida hacia la colmena) y el Tiempo de Ausencia (tiempo transcurrido entre visitas).

En la segunda visita, luego de haber accionado el extractor de aire, se midieron los mismos parámetros anteriores.

Sólo se usaron aquellas abejas cuyos Tiempos de Ausencia fueron inferiores a 5 minutos de modo de asegurar una buena motivación recolectora (Media \pm e.s.: 3.12 ± 0.13 min; $n=50$). Cuarenta (40) abejas fueron estudiadas, totalizando así ochenta (80) visitas. Con el fin de verificar que el orden de los tratamientos no incidió sobre los resultados observados, diez (10) abejas más fueron usadas como grupo control y sometidas a una secuencia invertida de tratamientos (esto es, primera visita con el extractor de aire encendido, segunda visita con el extractor de aire apagado).

Dado que, en cada caso, el mismo individuo fue medido dos veces (antes y después), el Test de t para muestras apareadas fue usado para el análisis estadístico (Zar 1984, pp 150-153).

Para evitar la memorización de la posición espacial de las flores respecto del entorno, el disco acrílico sobre el cual éstas estaban montadas era girado a intervalos irregulares.

3. RESULTADOS

Los resultados presentados en la Tabla 9 muestran que tanto el número medio de inspecciones por visita como el número medio de rechazos por visita variaron significativamente dependiendo del encendido o apagado del extractor de aire. Con el extractor encendido, las abejas realizaron un mayor número de inspecciones florales ($t=12.34$; $gl:39$; $p<0.001$) pero apenas 0.13 ± 0.05 rechazos por visita ($x \pm e.s.$; $n=40$). Previamente, con el extractor apagado, habían realizado un número medio de 11.43 ± 0.79 rechazos por visita ($x \pm e.s.$; $n=40$) ($t=14.24$; $p<0.001$).

La Tasa de Recolección, definida como el número de flores visitadas por minuto fue la misma en las dos situaciones experimentales (con el extractor encendido o apagado) ($t=0.11$; NS). Sin embargo, la duración de la visita (Tiempo de Visita) fue significativamente mayor en la segunda visita, con el extractor de aire encendido ($t=8.96$; $p<0.001$); esto es, las visitas se prolongaron al hacer las abejas, en esta situación, un mayor número de inspecciones florales.

Los resultados de la Tabla 10 muestran que la única fuente de variación en el diseño experimental fue el tipo de tratamiento en sí (extractor encendido o apagado) y no el orden en que estos tratamientos fueron aplicados. Cada valor de la Tabla 9 fue comparado con el valor equivalente de la Tabla 10, obtenido bajo un mismo tratamiento. Para esto se usó un Test de t para dos muestras independientes. Las ocho comparaciones fueron no significativas.

La manifestación del comportamiento de rechazo fue luego analizada en las cuarenta abejas originales, en relación a las secuencias temporales de inspecciones florales. Para esto, definimos seis categorías de secuencias temporales observables en nuestro experimento: Evento 0, definido como el "retorno inmediato a la flor que se acaba de abandonar" , Evento 1, definido como el "retorno a una flor particular luego de haber visitado otra flor", Evento 2, definido como el "retorno a una flor dada luego de haber visitado dos flores distintas" y así sucesivamente hasta el Evento 5 ("retorno a una flor dada luego de visitar cinco flores distintas") (Figura 8). Así, las visitas íntegras de las abejas pudieron ser descompuestas y analizadas en términos de estas secuencias dinámicas.

Establecimos entonces la probabilidad de manifestación de cada uno de estos eventos en las dos situaciones experimentales (P_A : probabilidad de manifestación bajo la situación A, i.e., con el extractor apagado; P_B : probabilidad de manifestación bajo la situación B, i.e., con el extractor encendido). En la Tabla 11, comparando la hilera de P_A con la de P_B , se puede observar que el uso del extractor de aire no afectó la probabilidad de manifestación de cada evento. Las comparaciones apareadas para cada Evento fueron todas no significativas luego de emplear un Test para la Comparación de Proporciones (Zar 1984, p. 395). Sin embargo, la comparación entre Eventos dentro de una misma hilera muestra que, en ambas situaciones experimentales, la probabilidad de manifestación fue la misma para los Eventos 1,2,3,4 y 5 ($\chi^2=8.95$; gl:4; NS; con el extractor apagado/ $\chi^2=8.24$; gl:4; NS; con el extractor encendido) pero fue significativamente menor para

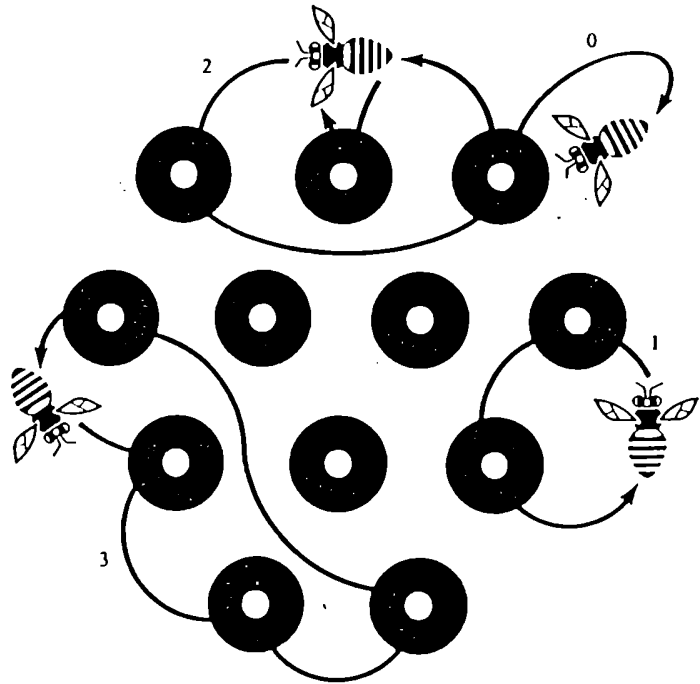


Figura 8. Algunos ejemplos de posibles eventos 0, 1, 2 y 3.

el Evento 0 ($\chi^2=265.25$; gl:5; $p<0.001$ con el extractor apagado/
 $\chi^2=247.31$; gl:5; $p<0.001$ con el extractor encendido).

El porcentaje de rechazos en cada tipo de evento fue establecido en ambas situaciones experimentales. Los resultados se presentan en la Tabla 11. El porcentaje de rechazos fue máximo (89.99 ± 2.70 ; media \pm e.s.; $n=40$) cada vez que las abejas retornaron inmediatamente a la flor recién abandonada (Evento 0) y disminuyó hasta alcanzar valores no significativamente distintos de cero cuando las abejas visitaron cuatro o más flores antes de regresar a la misma flor. Una vez encendido el extractor de aire, el porcentaje de rechazos fue cero para todos los tipos de eventos (0.63 ± 0.44 ; 0.59 ± 0.33 y 0.23 ± 0.23 no distintos significativamente de cero: $t=1.43$; $t=1.78$; $t=1$ respectivamente). Esto es, el retorno inmediato a la flor que se acaba de abandonar ocurre con muy baja probabilidad pero, cuando acontece, el porcentaje de rechazos es máximo

TABLA 9: Valores obtenidos en las dos situaciones experimentales: con el extractor de aire apagado y encendido respectivamente.

	Extractor Apagado ($\bar{x} \pm E.S.$; n=40)	Extractor Encendido ($\bar{x} \pm E.S.$; n=40)	t	p
Inspecciones por Visita	124.55 \pm 5.07	169.83 \pm 4.60	12.34	<0.001
Rechazos por Visita	11.43 \pm 0.79	0.13 \pm 0.05	14.24	<0.001
Tasa de Recolección (n° de flores/min)	8.20 \pm 0.18	8.19 \pm 0.18	0.11	NS
Tiempo de Visita (min)	16.59 \pm 0.57	21.00 \pm 0.63	8.96	<0.001

TABLA 10: Valores obtenidos en las dos situaciones experimentales invertidas: con el extractor de aire encendido y apagado respectivamente.

	Extractor Encendido ($\bar{x} \pm E.S.$; n=10)	Extractor Apagado ($\bar{x} \pm E.S.$; n=10)	t	p
Inspecciones por Visita	162.90 \pm 8.44	120.80 \pm 6.12	8.51	<0.001
Rechazos por Visita	0.10 \pm 0.10	9.30 \pm 0.52	17.97	<0.001
Tasa de Recolección (n° de flores/min)	8.14 \pm 0.19	8.17 \pm 0.23	0.54	NS
Tiempo de Visita (min)	20.27 \pm 1.35	16.11 \pm 1.02	6.73	<0.001

TABLA 11: Secuencias Temporales de Recolección de Néctar: probabilidad de manifestación de cada evento y porcentaje de rechazos asociado a las dos situaciones experimentales A y B (extractor de aire apagado y extractor de aire encendido respectivamente); n=40 abejas.

Evento	0	1	2	3	4	5
P_A	0.06	0.20	0.18	0.18	0.18	0.21
P_B	0.06	0.20	0.17	0.19	0.19	0.20
P_A vs P_B	NS	NS	NS	NS	NS	NS
% A (% de Rechazos en A)	89.99 ± 2.70	43.42 ± 2.51	8.25 ± 1.84	1.95 ± 0.60	0.16 ± 0.16	1.39 ± 1.39
% B (% de Rechazos en B)	0.63 ± 0.44	0.59 ± 0.33	0.23 ± 0.23	0	0	0
t (% A vs % B)	31.63	16.40	4.28	3.22	1	1
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.005	NS	NS

4. DISCUSION

Los resultados obtenidos reafirman la existencia de una sustancia que, a modo de marca repelente, es dejada por las abejas en las flores recientemente inspeccionadas, en el momento de abandonarlas. Así, esta sustancia es usada no sólo para distinguir entre flores no productivas y flores con recompensa de néctar (Núñez 1967), sino que también es empleada en un contexto más amplio, es decir, durante la recolección de néctar en un grupo de flores donde todas las flores involucradas presentan una oferta continua de néctar. En este último caso, como se demostró, la marca en cuestión permite a la recolectora evitar las flores recientemente vaciadas, que aún no han tenido el suficiente tiempo para volver a llenarse.

La naturaleza "negativa" o repelente de esta sustancia empleada durante la recolección de néctar fue evidenciada mediante el uso del extractor de aire, dispositivo experimental que permitió arrastrar la marca olfativa (o parte de ella) de las flores artificiales. En ese sentido, lo que realmente resulta relevante en un dispositivo de este tipo es que sea capaz de alterar "la esfera expansiva de feromona que se difunde a partir del punto de liberación" ya que "variaciones aparentemente pequeñas en la concentración son de por sí decisivas para una respuesta de comportamiento" (Wilson & Bossert 1963). Al encender el extractor de aire, aumentó significativamente el número de inspecciones (Tablas 9 & 10), es decir el grado de "aceptación" de las flores artificiales. En el caso en que la marca olfativa hubiese sido "positiva", es decir de naturaleza atractiva, las abejas deberían haber rechazado las flores al faltar la clave

olfativa (extractor encendido). Este hecho no sólo no fue encontrado en los experimentos realizados sino que en realidad se observó el efecto contrario, resaltando así la naturaleza negativa de la marca química liberada por las abejas.

Los resultados obtenidos también permiten descartar la hipótesis de que los rechazos resultan de la aplicación de una marca positiva graduada, esto es, las abejas rechazarían aquellas flores donde hubiera menos marca positiva. El análisis temporal del comportamiento de las abejas muestra que mientras más tardan en volver a una flor dada, más tienden a aceptarla. Si la marca fuese positiva y se volatilizase en el tiempo, debería haberse observado el resultado inverso.

Las abejas aumentan entonces su eficiencia recolectora al evitar volver, por un período corto, a las flores recién visitadas hasta que el flujo secretor haya restituido una recompensa suficiente de néctar y la volatilización haya atenuado el efecto de la marca repelente. Nuestros resultados indican que en el Evento 4 (seis flores visitadas), y con el extractor de aire apagado, la marca ya ha desaparecido. Considerando una Tasa de Recolección de 8 flores/minuto (Tablas 9 & 10), la duración efectiva de la marca olfativa puede estimarse como inferior a 45 s. Si se toma en cuenta el bajo flujo de solución azucarada ofrecido en nuestras flores artificiales, la rápida volatilización de la sustancia de marcado negativo permite la discriminación de aquellas flores que, temporariamente, no proveen recompensa. Es muy probable que la marca negativa sea en realidad una sustancia relativamente volátil pero la naturaleza y la glándula de origen de tal sustancia son, por ahora, desconocidas. Sobre este punto en particular, volveremos en el Capítulo 8 (Conclusión).

En base a observaciones de campo, otros autores (Corbet et al. 1984) han estimado diferentes duraciones efectivas para una marca olfativa de efecto similar al aquí propuesto. En el trabajo de Corbet et al (1984) se propone concretamente una duración de 1 a 2 minutos para marcas negativas depositadas por abejas *A. mellifera* en *Epilobium angustifolium* y en *Epilobium fleischeri*. Una explicación posible podría atribuir estas discrepancias a cambios en los niveles de motivación de las recolectoras en relación con el flujo de solución azucarada obtenido en las fuentes de alimento (Núñez 1974, Balderrama et al. 1991) y/o con el número de flores disponibles.

Aun cuando demostramos que las abejas que vaciaron de solución azucarada una flor artificial proceden luego a marcarla de modo de evitar posteriores visitas inmediatas, otras señales feromonales, como los "footprints" citados en la Introducción (Butler et al. 1969), son seguramente usadas para señalar positivamente a las flores artificiales. Estas feromonas son de larga duración (Butler et al. 1969, Ferguson & Free 1979, Schmitt & Bertsch 1990) mientras que, como se demostró, la marca negativa es de muy corta duración. Así, el mensaje final, resultante de la interacción de los dos tipos de sustancias depositadas en las flores, dependería del balance entre las marcas atractiva y negativa. Inicialmente y seguidamente a la inspección y vaciamiento de una flor, la sustancia negativa promoverá su rápido rechazo. Posteriormente, a medida que esta sustancia se volatiliza, la señal atractiva de mayor persistencia pasará a tener una influencia cada vez mayor y la flor pasará así a ser nuevamente atractiva para las abejas. Entretanto, el flujo de néctar habrá restituido la recompensa de néctar en la flor.

Esta modulación de una señal en base a dos sustancias de signo opuesto no es novedosa. Hoy se sabe que las feromonas de los insectos están constituidas en general por varias sustancias que no son necesariamente del mismo signo en términos del desencadenamiento de una respuesta comportamental. El caso de la feromona sexual de la mariposa del gusano de la seda *Bombyx mori* es un buen ejemplo de esta situación (Kaissling 1979): dos sustancias, Bombykol y Bombykal, interactúan tal que el Bombykol desencadena la respuesta de acercamiento del macho hacia la hembra mientras que el Bombykal no sólo es inefectivo sino que bloquea la respuesta desencadenada por el Bombykol. Sin embargo, la proporción de Bombykol:Bombykal liberada por la hembra es de 10:1 y su valor adaptativo consiste en el efecto desaturante ejercido por el inhibidor Bombykal a cortas distancias, permitiendo así un ajuste fino del comportamiento de orientación cerca de la fuente de emisión. En nuestro caso, más allá de las similitudes relacionadas con la interacción de dos sustancias, una positiva y una negativa, es aventurado aún de hablar de una feromona de tipo dual, máxime cuando no se conoce ni la naturaleza química ni el origen glandular de las sustancias involucradas.

El reconocimiento de las flores recientemente visitadas permite a las abejas reducir el número de flores inspeccionadas necesario para alcanzar la carga de buche referida a la situación experimental de flujo y distancia ensayados (Núñez 1982). De este modo, la estrategia desplegada por una abeja recolectora le permite ahorrar la energía y el tiempo requeridos por la introducción completa de su cuerpo en el tubo de acceso de la flor y por el abandono de la misma en retroceso. Si se considera que el costo mayor de los movimientos recolectores estaría en los despegues al abandonar cada flor visitada (Balderrama et. al

1991), y si a esto se agrega el costo en tiempo de un abandono "marcha atrás", el valor adaptativo de la estrategia de marcado negativo aparece claro en términos de una optimización energética individual.

Nuestros resultados sugieren además que otro componente, los patrones de movimientos, dentro de los cuales el retorno inmediato a la flor recientemente visitada ocurre con muy baja frecuencia (Evento 0, Tabla 11), también contribuye a la eficiencia recolectora. Es sabido que las abejas ajustan estos movimientos de modo de disminuir la distancia de vuelo interfloral y la direccionalidad, introduciendo giros continuos, cuando se mueven en áreas ricas en néctar (Pyke 1978, Heinrich 1979, Waddington 1980, Schmid-Hempel 1986). Estas conductas les permiten realizar una búsqueda concentrada dentro de un área dada. Vemos además que sus patrones de movimiento están programados de modo tal que raramente retornan a una flor recientemente vaciada. Este hecho implica también un notable ahorro energético. En el caso en que el retorno se produzca pese a todo, la acción de la marca negativa se hace sentir. Es de notar que una memoria de las posiciones florales (Manning 1956) no puede explicar los movimientos de recolección observados en nuestro dispositivo debido a la rotación irregular del disco con flores, tal como se explicó en los Materiales y Métodos.

Así, si bien demostramos la existencia y empleo de una sustancia de marcado negativo en el contexto de la recolección de néctar en flores recompensadas, también vemos que los patrones de movimiento se programan en función de aumentar la eficiencia recolectora. Ambos factores confluyen así para hacer de la abeja una maquinaria altamente eficiente de recolección de néctar.

CAPITULO 5

El papel de la Marca negativa en la comunicación química intraespecífica

1. INTRODUCCION

En el capítulo anterior se demostró que la marca negativa es empleada dentro de una estrategia individual asociada con la recolección de néctar. Dado que una abeja reconoce y rechaza flores artificiales sin recompensa o recientemente visitadas por ella misma en base al efecto repelente de esta sustancia, la marca negativa es, en principio, una señal de uso individual. Por ende, hemos sido particularmente cuidadosos, a lo largo de las páginas anteriores, en no caracterizar a la sustancia involucrada como "feromona". Efectivamente, de acuerdo con su definición (Karlsson & Lüscher 1959), este término implica comunicación intraespecífica, es decir la participación de dos individuos de la misma especie en un proceso en el que el acto o señal emitido por uno de ellos aumenta la probabilidad de desencadenar una respuesta dada en el otro que sea benéfica para uno o para los dos participantes (Markl 1985).

De este modo, el empleo o no del término "feromona" es algo más que una cuestión semántica ya que plantea la pregunta acerca del reconocimiento interindividual de la marca negativa. Por ende nos propusimos estudiar el posible reconocimiento de la marca negativa de una abeja por otra abeja de la misma colonia. Los

resultados referidos en este capítulo intentan responder a la pregunta arriba planteada.

2. MATERIALES Y METODOS

Se usaron abejas *Apis mellifera ligustica* de una colmena situada a 50 m del laboratorio. Como en los capítulos anteriores, se usó el simulador de flujo de néctar ya descrito.

2.1. Procedimiento experimental:

De acuerdo al método de entrenamiento también descrito, pares de abejas fueron entrenados a trabajar regularmente en el dispositivo. Cada miembro del par fue identificado mediante un punto de distinto color en el tórax.

Durante el preentrenamiento, se ofreció en el dispositivo 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ de solución azucarada 50% (p/p) como flujo total. Luego de dos visitas de preentrenamiento, se suprimió el flujo de solución azucarada en seis de las doce flores. Al mismo tiempo, se varió la velocidad de inyección de la solución azucarada de modo que el flujo total pasó a ser 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Así, el flujo total resultante en el dispositivo fue nuevamente 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ al haber sólo seis flores recompensadas. La disposición de las flores recompensadas y no recompensadas fue establecida según una serie de números aleatorios de modo de asegurar una distribución azarosa de las posiciones de ambos tipos de flores en el simulador.

Pares sucesivos de abejas fueron estudiados en el dispositivo.

Las mediciones empezaban cuando el segundo miembro del par llegaba al simulador y terminaba cuando uno de los miembros del par abandonaba el dispositivo. De este modo, las mediciones fueron

realizadas sólo durante periodos en los que dos abejas recolectaban solución azucarada al mismo tiempo en el aparato. El tiempo efectivo de medición varió considerablemente de par en par y dentro de un mismo par de abejas ya que las abejas podían llegar y/o partir desfasadas. Es de notar, sin embargo, que en muchos casos llegaron "en fase" (al mismo tiempo) al alimentador.

Para la medición, definimos dos categorías de secuencias temporales de recolección de néctar: **Evento 0**, definido como el retorno inmediato de una abeja a una flor que ella misma acaba de abandonar, y **Evento 0 Cruzado**, definido como la visita de una abeja a una flor que acaba de ser abandonada por la otra abeja del par.

Medimos entonces el número de estas dos categorías en las cuales se manifestaran **Inspecciones** (descensos en los cuales la abeja se introducía plenamente en el tubo de acceso de la flor) y **Rechazos** (descensos en los cuales la abeja introducía apenas las antenas en el tubo de acceso para luego abandonar presurosamente la flor).

En la siguiente visita, y con el mismo par de abejas, se midieron los mismos parámetros pero luego de haber invertido la distribución de las flores recompensadas y no recompensadas y de haber encendido el extractor de aire.

Veinte pares de abejas fueron medidos de esta manera. Como resultado, 210 **Eventos 0** y 402 **Eventos 0 Cruzados** fueron analizados.

Para evitar un adiestramiento de las abejas a las posiciones florales, el disco con las flores fue además rotado irregularmente.

3. RESULTADOS

La Tabla 12, referida a los Eventos 0, muestra que, cuando el extractor de aire estuvo apagado, las abejas rechazaron las flores que ellas mismas acababan de abandonar en 77% de los casos. Por otro lado, cuando se encendió el extractor de aire, las abejas aceptaron las flores que ellas mismas acababan de abandonar en 99% de los casos. Los rechazos disminuyeron significativamente mientras que las inspecciones aumentaron significativamente toda vez que el extractor de aire fue encendido. La interacción entre filas y columnas fue altamente significativa según un "Test de G de Independencia de 2 x 2" (Sokal & Rohlf 1981), es decir, el comportamiento observable en la situación de Evento 0 dependió de si el extractor de aire estaba encendido o apagado ($G_{adj}=146.70$; $gl:1$; $p<0.001$).

La Tabla 13 muestra que las abejas reconocieron la marca de la compañera ya que en 65% de los Eventos 0 Cruzados mostraron rechazos hacia las flores que acababa de abandonar la otra abeja del par. Al encender el extractor de aire, los rechazos desaparecieron y las abejas aceptaron las flores que acaba de abandonar el otro miembro del par en 98% de los casos. Aquí nuevamente, la interacción entre filas y columnas fue altamente significativa ($G_{adj}=212.79$; $gl:1$; $p<0.001$).

Finalmente, analizamos si la proporción de rechazos fue mayor en los Eventos 0 que en los Eventos 0 Cruzados, es decir, si las abejas rechazaron con mayor fuerza sus propias marcas antes que las marcas de otros miembros de su misma colonia. Para esto, se empleó un Test de Comparación de Proporciones (Zar 1984). Los resultados se presentan en la Tabla 13. En este caso, debimos rechazar la hipótesis nula de que la proporción de rechazos, en el

caso en que las abejas visitaban una flor que acababa de ser abandonada por otra abeja, fuese mayor que la observable en el caso en que las abejas visitaban la flor que ellas mismas acababan de abandonar ($Z=2.23$; $p<0.025$, una cola). Como control, el mismo tipo de análisis fue empleado para comparar el comportamiento de las abejas hacia sus propias marcas y hacia las marcas de las otras abejas con el extractor de aire encendido. En este último caso (Tabla 14) no hubo diferencias significativas ($Z=0.25$; NS, dos colas)

Tabla 12 Número de Eventos 0 en las dos categorías (con Rechazo y con Inspección) en las dos situaciones experimentales (extractor de aire apagado o prendido); $G_{adj}=146.7$; $df:1$; $P<0.001$

	Con Rechazo	Con Inspección	Σ
Extractor apagado	95	28	123
Extractor encendido	1	86	87
Σ	96	114	

Tabla 13 Número de Eventos 0 Cruzados en las dos categorías (con Rechazo y con Inspección) en las dos situaciones experimentales (extractor de aire apagado o prendido); $G_{adj}=212.8$; $df:1$; $P<0.001$

	Con Rechazo	Con Inspección	Σ
Extractor apagado	141	76	217
Extractor encendido	3	182	185
Σ	144	258	

Tabla 13 Análisis de las situaciones de Evento 0 (Ev. 0) y Evento 0 Cruzado (Cr. Ev. 0) considerando proporciones, con el extractor de aire apagado.

	Con Rechazo	Con Inspección	Total	Prop.Rech.	Prop.Insp.
Ev. 0	95	28	123	$p_1=0.772$	$q_1=0.228$
Cr.Ev. 0	141	76	217	$p_2=0.650$	$q_2=0.350$
Total	236	104	340	$p=0.694$	$q=0.306$

$Z=2.23$
 $P<0.025$ (una cola)

Tabla 14 Análisis de las situaciones de Evento 0 (Ev. 0) y Evento 0 Cruzado (Cr. Ev. 0) considerando proporciones, con el extractor de aire encendido.

	Con Rechazo	Con Inspección	Total	Prop.Rech.	Prop.Insp.
Ev. 0	1	86	87	$p_1=0.012$	$q_1=0.988$
Cr.Ev. 0	3	182	185	$p_2=0.016$	$q_2=0.984$
Total	4	268	272	$p=0.015$	$q=0.985$

$Z=0.25$
 NS (dos colas)

4. DISCUSION

A partir de estos resultados mostramos nuevamente que las abejas emplean la marca negativa en el contexto de la recolección de néctar de modo de evitar la inspección plena de flores que ellas mismas acaban de abandonar. En ese sentido, la marca negativa es una señal de "uso propio".

Otros ejemplos de marcas olfativas individuales han sido recientemente informados. Señales de estas características, asociadas también con la orientación durante la recolección de alimento, han sido encontradas en las hormigas obreras de *Pachycondyla tesserinoda* (Jessen & Maschwitz 1986) y de *Leptothorax affinis* (Maschwitz et al. 1986). En estos casos, las hormigas se benefician del reconocimiento de sus propias marcas de sendero ya que sino deberían desentrañar la confusión de rastros que ocurre cerca del nido y sus alrededores. De este modo evitan además adentrarse en rastros desconocidos que las podrían llevar a áreas donde podrían perderse más fácilmente.

En el caso de la marca negativa de las abejas, considerando que una abeja realiza normalmente, durante una visita, más de cien inspecciones florales sobre un número reducido de flores disponibles (ver capítulos anteriores), el empleo de esta sustancia resulta particularmente útil para el ahorro de tiempo y de energía en la actividad recolectora tal como ya se discutió anteriormente.

Dado que ésa no fue nuestra pregunta original, no distinguimos entre posibles variaciones en la estrategia de marcado negativo dependiendo de si se trataba de una flor sin recompensa de solución azucarada o de una flor recompensada. El dispositivo presentaba ambos tipos florales sólo para facilitar

una mejor observación de esta estrategia suponiendo que los rechazos serían más fácilmente detectables en una situación en que hay flores agotadas intercaladas entre flores recompensadas y en que, por ende, las abejas deberían desplegar sus estrategias disponibles para no inspeccionar las flores equivocadas.

Demostramos también que las abejas reconocen realmente y responden consecuentemente a la marca negativa de otra abeja de la misma colonia. De acuerdo a esto, sería entonces correcto el empleo del término "feromona negativa" en la relación a la marca estudiada. Sin embargo, en la Tabla 13 podemos ver que el nivel de respuesta varió significativamente de acuerdo la manifestación de un Evento 0 o de un Evento 0 Cruzado. Es decir, las abejas respondieron más fuertemente a sus propias marcas que a las de sus compañeras. En el primer caso (Evento 0), la proporción Inspecciones/Rechazos fue de 1:3.39 mientras en el segundo caso (Evento 0 Cruzado), esta proporción fue de 1:1.85. Así, aun cuando se observó una tendencia significativa hacia el rechazo de las flores marcadas por la otra abeja del par, este efecto no fue tan fuerte ya que la primera proporción fue significativamente mayor que la segunda. En este caso, si bien el intervalo de tiempo para los dos tipos de evento no fue medido, se consideraron sólo los Evento 0 Cruzados que ocurrieron en forma suficientemente rápida como para ser comparables con los Eventos 0 y como para descartar la volatilización rápida de la marca de la compañera. Podría ocurrir entonces que la funcionalidad original de la marca negativa sea la orientación propia en un grupo de flores, no estando la sustancia, liberada por un determinado individuo, particularmente dirigida a un coespecífico de la misma colonia. El uso de esta clave olfativa por parte de otra abeja sería

entonces un comportamiento oportunista más que un verdadero proceso de comunicación.

En la situación experimental propuesta, surge la pregunta acerca de cómo la marca negativa de un individuo afecta la eficiencia recolectora de otro individuo. Dado que la marca tiene una duración muy corta (ver Capítulo 3), esta eficiencia aumentaría efectivamente si las abejas llegasen juntas (o en grupos) al grupo de flores. Si bien este último punto no ha sido aún cuantificado, este hecho fue observado por Kevan y por Núñez (comunicaciones personales).

La recolección "en grupos" abre perspectivas de estudio más que interesantes. Si las abejas llegasen realmente juntas a un grupo de flores tendrían la ventaja energética de encontrar néctar acumulado cuya obtención no insumiría gasto energético. De otro modo, para obtener una cantidad equivalente de néctar, los insectos pasarían más tiempo trabajando de flor en flor con el consecuente gasto metabólico que esto implica. Al permanecer juntas en la colmena, las abejas no sólo reducirían su consumo energético (que pasa a ser 1/50 de los costos metabólicos de los vuelos de recolección [Núñez et al 1970, Rothe & Nachtigall 1989]) sino que dispondrían además de la entrada de información nueva respecto de fuentes alimentarias rentables. Paralelamente, el néctar se va acumulando en las flores, hecho que representaría una ventaja energética notable como ya se explicó.

Este punto merece, como se ve, un estudio aparte del tema de esta tesis.

CAPITULO 6

Un contexto natural para la estrategia de marcado negativo: el cardo silvestre *Carduus acanthoides*

1. INTRODUCCION

Una vez probada la estrategia de marcado negativo evidenciada en nuestro dispositivo experimental, intentamos buscar un contexto natural en el que fuese empleada por las abejas recolectoras. El modelo elegido para tal fin fue el cardo silvestre *Carduus acanthoides*. Concretamente, nos preguntamos si durante la recolección de néctar de *A. m. ligustica* en inflorescencias de *C. acanthoides*, podíamos realizar observaciones consistentes con la hipótesis del marcado negativo.

C. acanthoides (Compositae) es una maleza que crece en los campos durante los meses de verano (Nuñez 1977, Giurfa & Nuñez 1991). Presenta inflorescencias que, al estar maduras, se presentan como capítulos con 100 a 150 flores individuales (110.43 ± 4.75 flores; $x \pm e.s.$; $n=14$). Estas están dispuestas en el capítulo en forma abigarrada de modo que la inflorescencia de *C. acanthoides* constituye un posible contexto natural para el empleo de la sustancia de marcado negativo, máxime si se considera que las abejas que recolectan néctar en estas inflorescencias caminan asiduamente sobre ellas inspeccionando las flores.

Como ya se ha dicho, la información olfativa guiaría el comportamiento recolector a distancias cortas de la fuente de alimento (Frisch 1967); así las abejas podrían discriminar las flores ya inspeccionadas de *C. acanthoides* en base a una marca negativa depositada en cada flor revisada, como sucedía en el dispositivo experimental (ver Capítulo II). De ocurrir realmente así, esta estrategia resultaría en un aumento de la eficiencia recolectora en este contexto natural.

2. MATERIALES Y METODOS

Las observaciones fueron realizadas en un parche natural de 3 m² de *C. acanthoides*, distante 70 m del apiario de la Sociedad Argentina de Apicultores (S.A.D.A.), González Catán, provincia de Buenos Aires.

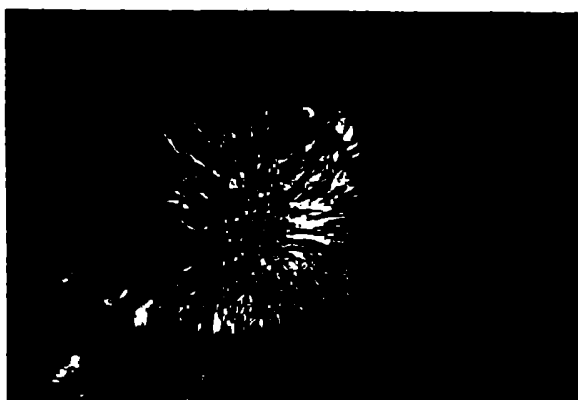
Inflorescencias inmaduras de *C. acanthoides* fueron protegidas de posibles visitas de insectos con sendos velos de tul. Los velos en cuestión fueron retirados al día siguiente, en el momento de máxima acumulación de néctar (alrededor de las 15.00 hs; véase Giurfa & Núñez 1991), permitiéndose así las visitas de abejas a los capítulos recién descubiertos. Esta parte del experimento resulta sumamente engorrosa ya que se puede esperar durante lapsos considerables de tiempo hasta la llegada de la primera abeja al capítulo descubierto.

Una vez que la abeja experimental descendió al capítulo, se registraron las trayectorias de inspecciones, el número de inspecciones florales y los tiempos de llegada y de partida de la abeja. Inmediatamente, el capítulo fue separado, llevado al laboratorio y analizado en función de determinar la presencia o

ausencia de néctar en cada una de sus flores. Este análisis se realizó aislando la porción de la flor donde se halla acumulado el néctar (Figura 9); esta porción fue puesta sobre un papel de filtro y ligeramente aplastada al rodar sobre ella una varilla de vidrio de 2 mm de diámetro. El néctar expelido se pudo apreciar claramente en el papel de filtro, constamente renovado.

Controles previos fueron realizados con el objetivo de asegurarse de que la ausencia de néctar en las flores de los capítulos recubiertos se debió exclusivamente al comportamiento posterior de recolección de néctar de las abejas.

A)



B)

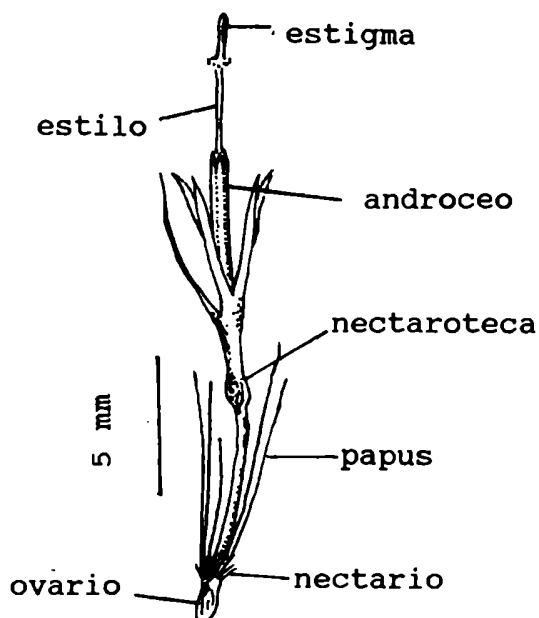


Figura 9. (a) Abeja en inflorescencia de *Carduus acanthoides*. (b) Flor de *Carduus acanthoides*.

3. RESULTADOS

Los resultados presentados en la Tabla 15 muestran que, en los controles cubiertos, todas las flores presentaron néctar en el momento de la exposición a las visitas de los insectos.

La Figura 10 es una representación de las trayectorias de siete abejas distintas en siete capítulos diferentes. Se indican también el Tiempo de Visita (TV: tiempo transcurrido desde la llegada de la abeja a la inflorescencia hasta su partida) y la frecuencia de inspecciones (número de flores revisadas por minuto). El número de inspecciones (I) fue medido en cada caso. Los puntos de las trayectorias indican las inspecciones florales sucesivas en el capítulo, sin discriminar si la misma flor es revisada una, dos o más veces. Esta última discriminación fue posible en el laboratorio, determinando la presencia o ausencia de néctar en cada flor de acuerdo al método ya explicado (V. número de flores vacías; NV: número de flores no vacías; T: número total de flores: $V + NV$).

No se observaron patrones individuales ni comunes en las trayectorias de las abejas. Estas realizaron en sus recorridos giros continuos en contra y a favor del giro de las agujas de un reloj, sin una estrategia temporal de inspecciones definida. Es importante destacar que, dado el diámetro relativamente pequeño de las inflorescencias (2.4 ± 0.07 cm; media \pm e.s.; $n=12$), con un ligero pivotaje sobre su propio cuerpo, una abeja puede alejarse considerablemente de la última flor inspeccionada. Así, las trayectorias de las abejas no estuvieron tampoco organizadas de modo de seguir secuencias de flores adyacentes.

En la Tabla 16 se muestra la relación existente entre el número medido de inspecciones realizadas por las abejas y el número medido de flores vacías. Esta relación es claramente 1:1,

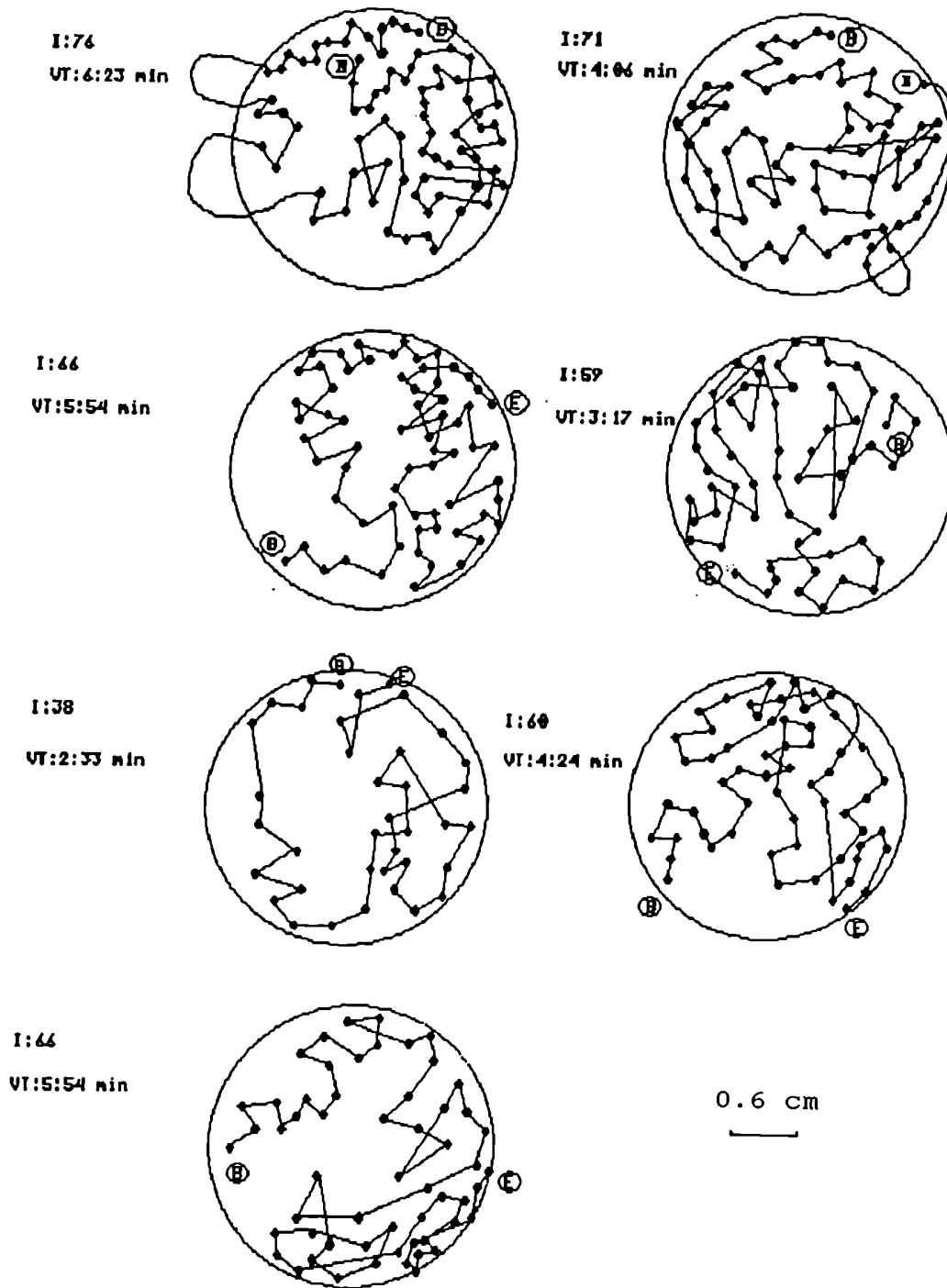


Figura 10. Trayectorias de inspecciones de 7 abejas en 7 inflorescencias de *Carduus acanthoides*: I: número de inspecciones; VT: tiempo de visita; B: inicio de la trayectoria; E: final de la trayectoria.

evidenciando una alta eficiencia recolectora. Esta proporción no sería consistente con una estrategia de inspecciones florales aleatorias en la cual una misma flor podría ser revisada más de una vez, máxime si las trayectorias de los insectos cubren la mayor parte del capítulo como realmente ocurrió.

Así, se puede contrastar la hipótesis de que la relación 1:1 es producto de una estrategia aleatoria de inspecciones donde todas las flores tendrían igual chance de ser inspeccionadas y donde las inspecciones serían independientes entre sí, con la hipótesis de que la estrategia de inspecciones no es aleatoria al no existir una independencia real entre dos inspecciones seguidas a una misma flor y al no tener por ende todas las flores la misma probabilidad en el tiempo de ser inspeccionadas.

Para esto, determinamos la bondad de ajuste de la distribución de Poisson a los datos de nuestras siete abejas. Los resultados se presentan en la Tabla 17 donde los datos son el número de veces en que una flor es visitada durante la trayectoria de una abeja (X). Se presentan los datos observados, inferidos de la Tabla 16 y los datos esperados de acuerdo a la distribución de Poisson. Nótese que para la abeja n^o 4, dos casos posibles son considerados. En las siete abejas medidas se debió rechazar la hipótesis nula de la estrategia aleatoria de inspecciones: el número de veces en que una flor es visitada durante una trayectoria de inspecciones no es un suceso distribuído azarosamente en el tiempo. Del mismo modo, la relación 1:1 observada no fue pues producto de una distribución azarosa de las inspecciones en el tiempo.

TABLA 15: Inflorescencias controles previamente cubiertas.

Inflorescencia n ^o	N ^o de flores	N ^o de flores con néctar
1	119	119
2	135	135
3	96	96
4	109	109
5	89	89
6	126	126
7	143	143

TABLA 16: Comparación entre el número de inspecciones observadas (I) y el número de flores vaciadas (V) determinado en el laboratorio. T: número total de flores de la inflorescencia.

Abeja N ^o	T	I	D
1	119	76	75
2	127	71	70
3	98	66	65
4	105	59	57
5	89	38	38
6	99	60	59
7	92	57	56

Tabla 17: Contraste de la hipótesis de una distribución azarosa en el tiempo del "Número de veces en que una flor es visitada" (X). T: número total de flores en la inflorescencia. Las frecuencias observadas, inferidas de la Tabla 16, son comparadas con las frecuencias esperadas siguiendo una distribución de Poisson (valores entre paréntesis), por medio de un Test de χ^2 . Para la abeja n^o 4 se consideran dos casos posibles.

Abeja n ^o	X=0	X=1	X=2	X=3	T	χ^2	P
1	44 (62.83)	74 (40.13)	1 (12.82)	0 (7.38)	119	52.51	<0.001
2	57 (72.61)	69 (40.60)	1 (11.34)	0 (8.92)	127	41.57	<0.001
3	33 (49.97)	64 (33.65)	1 (11.33)	0 (5.80)	98	48.36	<0.001
4	48 (61.01)	55 (33.12)	2 (8.99)	0 (7.59)	105	30.25	<0.001
	48 (59.86)	56 (33.64)	0 (9.45)	1 (7.34)	105	32.14	<0.001
5	51 (58.07)	38 (24.79)	0 (5.29)	0 (5.29)	89	18.48	<0.001
6	40 (54.00)	58 (32.73)	1 (9.92)	0 (6.44)	99	37.60	<0.001
7	36 (49.51)	55 (30.67)	1 (9.50)	0 (5.86)	92	36.45	<0.001

4. DISCUSION

Los resultados referidos a la explotación de capítulos de *C. acanthoides* por *A. m. ligustica* sugieren que, durante la recolección de néctar, es usada una clave para el reconocimiento de las flores ya inspeccionadas. En el contexto natural de una compuesta, cuyas inflorescencias presentan un elevado número de flores dispuestas abigarradamente, una clave de esta naturaleza facilitaría la discriminación y permitiría un aumento de la eficiencia recolectora.

Mostramos que el número de inspecciones florales coincidió con el número de flores vaciadas en estrategias de inspección sin patrones definidos que abarcaron la mayor parte del capítulo. En este tipo de estrategias, y con una relación (número de inspecciones/flores disponibles) elevada, una abeja podría revisar dos o más veces la misma flor. Esto queda expresado en las frecuencias esperadas, de acuerdo a una distribución de Poisson, del número de veces en que una flor es visitada durante una trayectoria dada (véase Tabla 17, valores entre paréntesis). Así, una menor eficiencia recolectora debería haber sido obtenida y difícilmente podría explicarse la relación 1:1 (100% de eficiencia) encontrada que, como se demostró, no fue producto del azar.

En sus trayectorias, las abejas no podían, en principio, distinguir las flores previamente inspeccionadas pero de hecho lo hicieron. En los capítulos de *C. acanthoides*, y con trayectorias que implican idas y venidas continuas sin un recorrido prefijado, las abejas no podrían distinguir visualmente entre flores con y sin néctar, considerando, sobre todo, la morfología de la flor

(corolas tubulares alargadas con el néctar en profundidad) y de la inflorescencia en sí (Véase la Figura 9).

En esta situación, la información olfativa permitiría un análisis más rápido y eficiente. Por ello se ha manifestado que la información olfativa es la responsable de guiar, a cortas distancias, la recolección de néctar en las abejas (Frisch 1967). Así, los resultados obtenidos podrían interpretarse en función de la evidencia experimental obtenida acerca de la existencia de una sustancia de marcado negativo depositada por las abejas en flores agotadas (Núñez 1967) y en flores recientemente visitadas aún no vueltas a llenar con néctar. De este modo, la falta de independencia entre dos visitas a la misma flor y el hecho de que no todas las flores tengan, en todo momento, la misma probabilidad de ser visitadas podría explicarse a partir de la presencia de la sustancia de marcado negativo en las flores revisadas. Desde este marco, puede entenderse la alta eficiencia de inspecciones florales en una situación en que la relación (número de inspecciones/flores disponibles) fue elevada.

Otro elemento del comportamiento recolector de las abejas, esta vez referido a los patrones motores, debe además ser tenido en cuenta. Se demostró previamente (Capítulo 4) que el retorno inmediato a la última flor visitada tenía una muy baja probabilidad de manifestación. Así, este elemento podría además contribuir a los resultados observados. Sin embargo, considerando las trayectorias intrincadas de las abejas en las inflorescencias (Figura 10), este elemento motor no podría explicar por sí solo los resultados hallados ya que comúnmente los insectos volvieron sobre zonas revisadas anteriormente donde la probabilidad de inspeccionar una flor ya vaciada era grande.

Considerando la gran densidad de flores presente en los capítulos de *C. acanthoides* y la naturaleza de los recorridos de las abejas, la confluencia de ambos factores (la estrategia de marcado negativo y los patrones de movimiento recolectores) resulta en un aumento considerable de la eficiencia recolectora. Una abeja que emplea tales estrategias trabaja ciertamente en forma más eficiente que un hipotético recolector que se mueve azarosamente (Kato 1988).

En el caso de las flores de *C. acanthoides*, la duración del efecto de la marca negativa no puede ser estimado ya que resulta imposible individualizar una sola de las tantas flores disponibles y seguir al mismo tiempo el recorrido de una abeja sin perturbarla, con el objetivo de analizar posibles reinspecciones y sus consecuencias en el comportamiento recolector de la abeja. Considerando que el efecto de la marca en cuestión desaparece con el tiempo, es de esperar que la eficiencia recolectora disminuya con el tiempo de inspección y/o con el número de flores disponibles. Sin embargo, aun cuando las inflorescencias de cardo presentaron un gran número de flores (110.43 ± 4.75 flores; media \pm e.s.; $n=14$), la eficiencia recolectora fue prácticamente del 100 % para todas las abejas estudiadas. Podría ser entonces posible que el nivel motivacional de los individuos para responder a la marca negativa fuese mayor en esta situación natural. Así, esto resultaría en una mayor duración efectiva para la sustancia negativa cuyo efecto podría alcanzar inclusive el tiempo promedio de visita a una inflorescencia (4.38 ± 0.51 min; media \pm e.s; $n=7$). La discusión planteada en este punto establece en todo caso nuevas preguntas que podrán ser respondidas con experimentos futuros: a saber, el estudio de la relación existente entre la

estrategia de marcado negativo y el número de flores disponibles en un dispositivo experimental.

Durante nuestro trabajo de campo, pudimos también registrar a una abeja que visitó un capítulo que presentaba 141 flores previamente recubiertas con un velo de tul, realizando entonces 43 inspecciones durante 4:53 min. Luego abandonó el capítulo y se dirigió a inflorescencias adyacentes. Luego de 4:02 min, regresó al capítulo bajo estudio, realizando entonces 14 inspecciones durante 1:54 min. Posteriormente, abandonó nuevamente el capítulo, se dirigió a una inflorescencia vecina y, luego de 4:13 min, regresó nuevamente al capítulo observado. Esta vez realizó 14 inspecciones durante 1:49 min para luego alejarse definitivamente. El número total de inspecciones fue 71 mientras que el número de flores vaciadas (determinado en el laboratorio) fue 57. En este caso, la eficiencia recolectora fue 80.28 %, es decir, considerablemente más baja que la obtenida para las siete abejas medidas en su primera y única visita a los capítulos descubiertos (Tabla 16). Lamentablemente, pese a una espera paciente, no pudimos repetir una observación en la que una misma abeja retornara, en cortos lapsos de tiempo, a una misma inflorescencia (véase Materiales y Métodos - este capítulo).

En este caso, la menor eficiencia recolectora obtenida puede también explicarse por los resultados referidos a la duración del efecto de la marca negativa. Luego de la primera visita (43 inspecciones), se puede asumir una eficiencia de prácticamente 100 %, digamos un resultado de 42 flores vaciadas (como en el caso de las abejas 1, 2, 3, 6 y 7; Tabla 16). Después de una ausencia de 4 minutos, la marca negativa ya no estaría actuando al iniciarse la segunda visita. Esta vez, la abeja encontrará 99 flores con néctar

(70.21 %) y 42 flores vacías (29.79 %). Así, en sus 14 inspecciones subsiguientes, encontrará 10 flores con néctar (que serán vaciadas) y 4 flores vacías. Como resultante, el capítulo presentará, al iniciarse la tercera visita, 89 flores con néctar (63.12 %) y 52 flores vacías (36.88 %). Luego de una nueva ausencia de 4 minutos, la marca negativa dejaría de actuar. Así, en las 14 nuevas inspecciones, la abeja encontrará 9 flores con néctar (que serán vaciadas) y 5 flores vacías. Como resultado final, la abeja habrá realizado 71 inspecciones efectivas y vaciado 61 flores. La eficiencia es, en este caso, 85.92 %, un valor semejante al obtenido realmente. Con un cálculo semejante, si se asumen eficiencias de partida del 100 % (43 flores revisadas - 43 flores vaciadas; ver abeja 5, Tabla 16) y del 95.34 % (43 flores revisadas - 41 flores vaciadas; ver abeja 4; Tabla 16), se obtendrán, como resultados finales, 61.5 flores vaciadas (86.58 % de eficiencia recolectora) y 59.9 flores vaciadas (84.32 % de eficiencia recolectora) respectivamente. Estos valores coinciden también con los valores realmente medidos.

Si bien este caso estudiado no puede ser tomado como un resultado concluyente dada la falta de repeticiones de este tipo de observación, permite en cambio descartar, en estas inflorescencias, el uso de otras claves olfativas como herramientas para la discriminación de flores vaciadas. Si en los capítulos de *C. acanthoides* la abeja reconociese las flores con néctar por el olor del néctar en sí (Heinrich 1979, Marden 1984) o por gradientes intraflorales de humedad (Corbet 1979), debería haber rechazado las flores vacías encontradas en su segunda y tercera visita y haber alcanzado así un 100 % de eficiencia recolectora, un resultado que no coincide con los realmente obtenidos.

En conclusión, los resultados referidos a la explotación de capítulos de *C. acanthoides* por *A. mellifera* son consistentes con la existencia de una sustancia de marcado negativo, depositada por las abejas en flores recientemente visitadas. Este ejemplo se viene a agregar a otros (Corbet et al. 1984, Wetherwax 1986) también basados en observaciones de campo similares, realizadas con abejas *A. mellifera*, pero que sólo adquieren significado con la demostración experimental de la existencia de la sustancia de marcado negativo (Véase Capítulo 4). El contexto natural de una compuesta sería pues, por su elevado número de flores semejantes, un marco propicio para el empleo de una estrategia de orientación recolectora guiada por la sustancia de marcado negativo.

Tercera Parte

CAPITULO 7

La interacción entre la marca negativa y la saturación espectral

1. INTRODUCCION

Hasta aquí hemos estudiado estrategias relacionadas con el uso de claves espectrales durante la recolección de néctar por un lado, y estrategias relacionadas con una orientación de tipo olfativa mediante una sustancia señalizadora de acción repelente, por el otro. Respecto de este último punto cabe preguntarse si esta sustancia es empleada en todo momento, aun en presencia de otras claves sensoriales que puedan contribuir a su vez a la orientación de una abeja recolectora dentro de un grupo de flores. Nótese que en las situaciones experimentales en las que se estudió el marcado negativo, se ofreció a los insectos un entorno homogéneo, esto es, todas las flores eran idénticas en forma y color y la información posicional no podía ser usada, como ya se explicó. ¿Qué ocurre con el comportamiento recolector cuando se debe discriminar entre flores recompensadas y no recompensadas que difieren ahora en otras claves sensoriales como ser, por ejemplo, la saturación espectral? Concretamente, ¿existe algún tipo de relación entre la información provista por las claves espectrales y el empleo o no de la marca negativa?

Para estudiar este aspecto, propusimos a las abejas una situación en la que dos grupos de flores artificiales amarillas,

uno recompensado con flujo de solución azucarada y otro sin recompensa alguna, se iban diferenciando progresivamente en su saturación, es decir, en su contenido de color blanco. Analizamos, en este contexto, posibles variaciones de la estrategia de marcado negativo.

2. MATERIALES Y METODOS

Se usaron abejas *Apis mellifera ligustica* de una colmena situada a 50 m del laboratorio. Como en los capítulos anteriores, se usó el simulador de flujo de néctar ya descrito.

2.1. Procedimiento experimental:

De acuerdo al método de entrenamiento también descrito, las abejas fueron entrenadas a trabajar regularmente en el dispositivo e identificadas mediante un punto de distinto color en el tórax.

Durante el preentrenamiento, se ofreció en el dispositivo 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ de solución azucarada 50% (p/p) como flujo total en las doce flores. Luego de tres visitas de preentrenamiento, se suprimió el flujo de solución azucarada en seis de las doce flores. Al mismo tiempo, se varió la velocidad de inyección de la solución azucarada de modo que el flujo total pasó a ser 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Así, el flujo total resultante en el dispositivo fue nuevamente 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ al haber sólo seis flores recompensadas. La disposición de las flores recompensadas y no recompensadas fue establecida según una serie de números aleatorios de modo de asegurar una distribución azarosa de las posiciones de ambos tipos de flores en el simulador.

Las mediciones empezaban luego de la última visita de preentrenamiento y se realizaban, con el mismo individuo, durante cinco visitas consecutivas de acuerdo al siguiente protocolo experimental.

Visita n° 1: Seis (6) flores recompensadas (Grupo I) y seis flores no recompensadas (Grupo II), todas con el color A (máxima saturación).

Visita n° 2: Seis (6) flores recompensadas (Grupo II) presentando el color A y seis flores no recompensadas (Grupo I) presentando el color B (menor saturación). La diferencia perceptual entre A y B es reducida.

Visita n° 3: Seis (6) flores recompensadas (Grupo I) presentando el color A y seis flores no recompensadas (Grupo II) presentando el color C (menor saturación). La diferencia perceptual entre A y C es mayor.

Visita n° 4: Seis (6) flores recompensadas (Grupo II) presentando el color A y seis flores no recompensadas (Grupo I) presentando el color D (menor saturación). La diferencia perceptual entre A y D es aún mayor.

Visita n° 5: Seis (6) flores recompensadas (Grupo I) presentando el color A y seis flores no recompensadas (Grupo II) presentando el color B nuevamente (menor saturación).

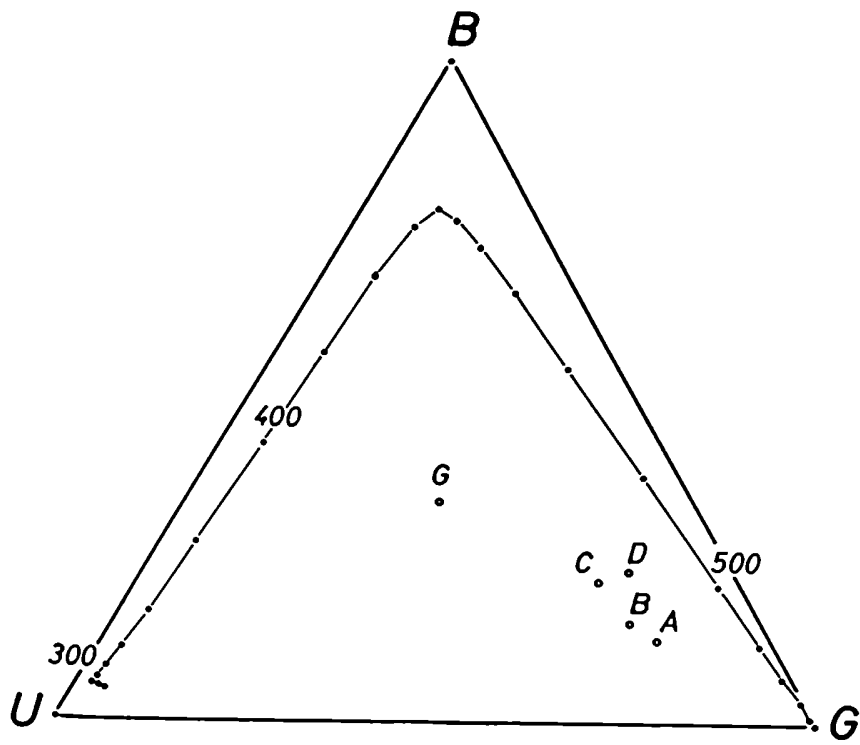
Así, el color A es ofrecido, en visitas consecutivas, siempre recompensado frente a distintas saturaciones del mismo color asignadas al grupo de flores que no recibía recompensa. En la

Visita n° 1 tanto el grupo recompensado como el no recompensado presentan, a modo de control, la misma saturación (Color A). En la Visita n° 5 se vuelve, también a modo de control, a la situación de la Visita n° 2. De visita en visita se invertía el grupo de flores que recibía recompensa respecto del que no la recibía. Además, dentro de una misma visita, el disco acrílico en el que se insertan las flores era girado irregularmente a intervalos de tiempo también irregulares, de modo de eliminar un posible uso de información posicional.

En cada visita se medían el número de Elecciones totales, discriminando el número de Inspecciones (descensos en los cuales la abeja se introdujo totalmente en el tubo de acceso de las flores artificiales) y el número de Rechazos (descensos en los cuales la abeja introdujo sólo las antenas en el tubo de acceso para luego abandonar inmediatamente la flor). Con estos datos, se establecieron el % de Elecciones sobre el Grupo recompensado (N° de Elecciones sobre el Grupo recompensado/Total de Elecciones realizadas) y el % de Rechazos (N° de Rechazos/Total de Elecciones realizadas) por visita.

Los colores usados fueron distintas saturaciones de Amarillo y se presentan en la Figura 11. La Figura 11 a) muestra la ubicación de los colores usados en el Triángulo de Colores de la abeja doméstica y la 11 b) muestra su ubicación en el eje de coordenadas A y B, relacionadas con las distancias perceptuales reales (Véase páginas 17 y 18). El color A (más externo en el Triángulo de Colores) es el de mayor saturación; el color D es el que más se diferencia perceptualmente del color A.

A)



B)

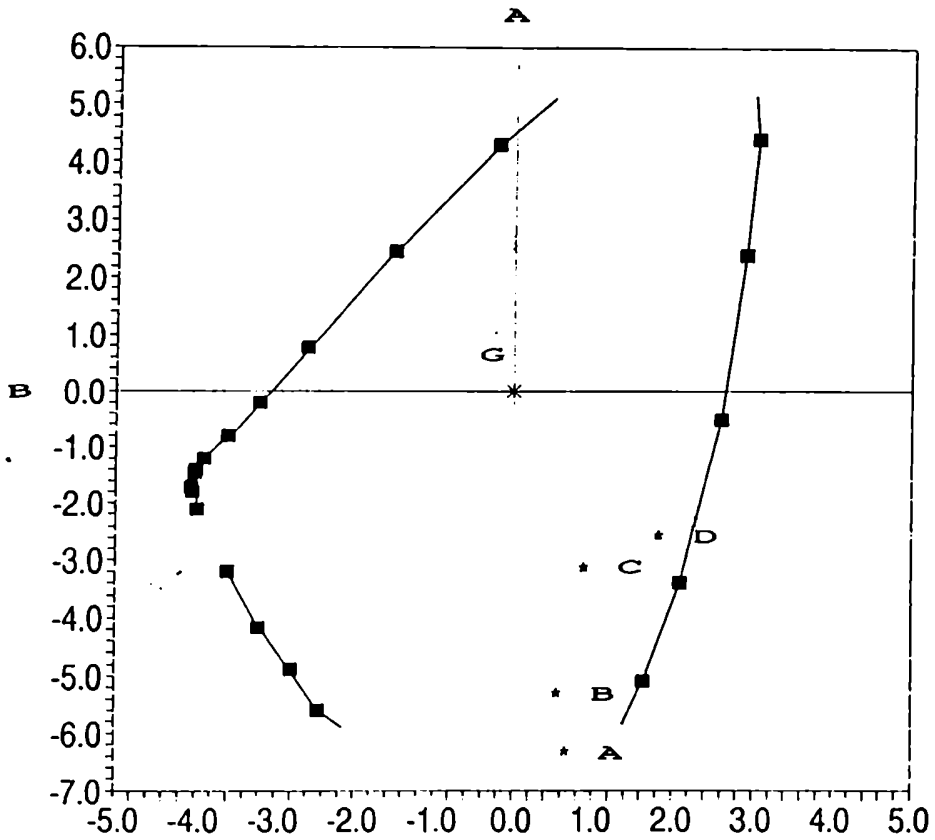


Figura 11. (a) Diagrama de cromaticidad de la abeja con los loci de los cuatro estímulos usados A, B, C y D (G: fondo gris). (b) Espacio antagonista de colores incluyendo los loci de los cuatro estímulos espectrales usados A, B, C y D (G: fondo gris). Los ejes A y B corresponden a los dos procesos espectrales antagonistas UV/Azul-Verde y Azul/UV-Verde respectivamente.

Los parámetros espectrales de los estímulos usados fueron gentilmente medidos por el Prof. Dr. Randolf Menzel (Berlín, Alemania).

Se midieron 20 abejas de acuerdo al protocolo experimental descrito.

2.2 Estadística

Dado que en cada caso un mismo individuo es medido bajo distintos tratamientos en el tiempo, se usó un *Análisis de Varianza para Medidas Repetidas* (Winer 1971). Para la comparación entre medias dentro de una misma curva se usó el *Test de Newman-Keuls* (Zar 1984), modificado para Medidas Repetidas.

2. RESULTADOS

La Figura 12 muestra que hubo una variación significativa en la performance de elección del grupo recompensado a lo largo de las distintas visitas ($F=83.05$; $gl:4, 76$; $n=20$; $P<0.0001$). Cuando la información de color era la misma para los dos grupos de flores (Visita 1: color A), no hubo asimetrías en la elección pese a que sólo un grupo de flores tuviese recompensa. Puede observarse además que, a medida que aumenta la distancia perceptual entre el color recompensado (color A) y el color alternativo no recompensado, la elección del grupo recompensado se hace más precisa hasta llegar al pico visible en la Visita 4 (máxima distancia perceptual entre A y D). Esta mejoría en la performance de elección del grupo recompensado no fue un mero efecto de apren-

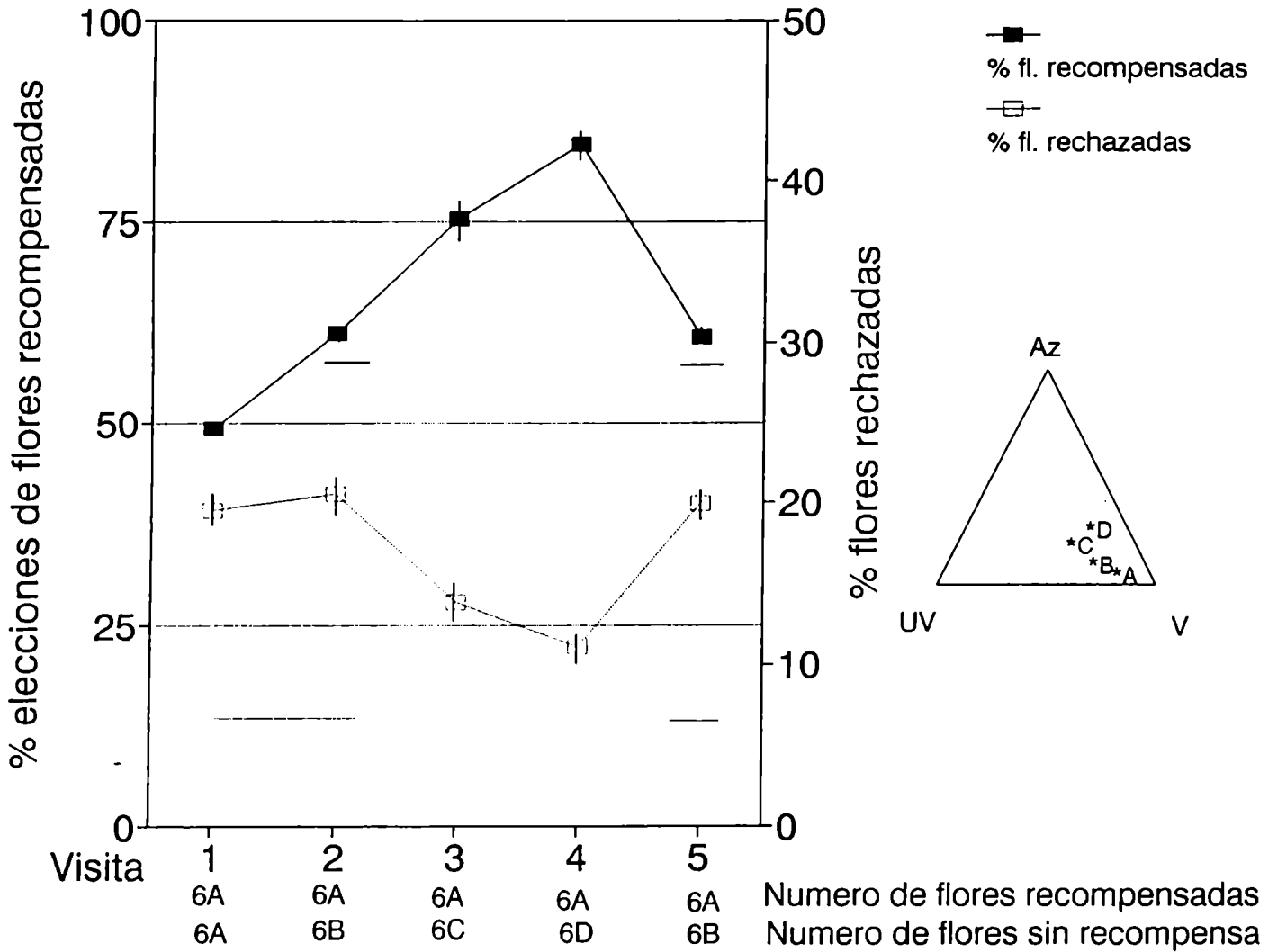


Figura 12. Variación de la elección de flores recompensadas y del rechazo de flores en función de la variación en distancia perceptual de los cuatro estímulos usados A, B, C y D. Se presentan medias \pm E.S. Las líneas horizontales en el mismo plano conectan medias que no difieren significativamente entre sí (Test de Newman-Keuls, $P < 0.05$)

dizaje, como se demuestra en el descenso evidenciado en la Visita 5, donde la distancia perceptual entre los colores empleados A y B se redujo nuevamente. Los niveles del porcentaje de elecciones del grupo recompensado de la Visita 5 no difirieron significativamente de los niveles alcanzados en la Visita 2 (Diferencia entre Medias = 0.513; V.C.=5.606; NS). Así, mientras más difieren los estímulos espectrales usados en su saturación, más eficiente es la performance de elección del grupo recompensado, señalado con el color A (máxima saturación).

También hubo una variación significativa del porcentaje de flores rechazadas a lo largo de las distintas visitas ($F=28.526$; $gl:4, 76$; $n=20$; $P<0.0001$). En forma inversa a la curva anterior, el porcentaje de flores rechazadas fue disminuyendo con el incremento en la distancia perceptual de los estímulos espectrales usados hasta llegar a un mínimo en la Visita 4. Al disminuir nuevamente la distancia perceptual entre los colores usados (Visita 5), el porcentaje de flores rechazadas aumentó hasta niveles que no difirieron significativamente de los de la Visita 2 (Diferencia entre Medias = 0.592; V.C.=2.941; NS). Por otro lado, tampoco hubo diferencias significativas entre los niveles de rechazos de la Visita 1 y los de la Visita 2 (Diferencia entre Medias = 0.968; V.C.=2.23; NS) pese a que sí se observaron diferencias en la elección del grupo recompensado entre una visita y otra (Diferencia entre Medias = 11.818; V.C.=4.251; $P<0.05$).

La Figura 13 muestra que, si bien los rechazos disminuyen con el aumento de la distancia perceptual, se van haciendo cada vez más sobre el grupo no recompensado, i.e. sobre el grupo con el color alternativo a A ($F=16.923$; $gl:4, 76$; $n=20$; $P<0.0001$). En otras palabras, si bien con la máxima diferencia perceptual (Visi-

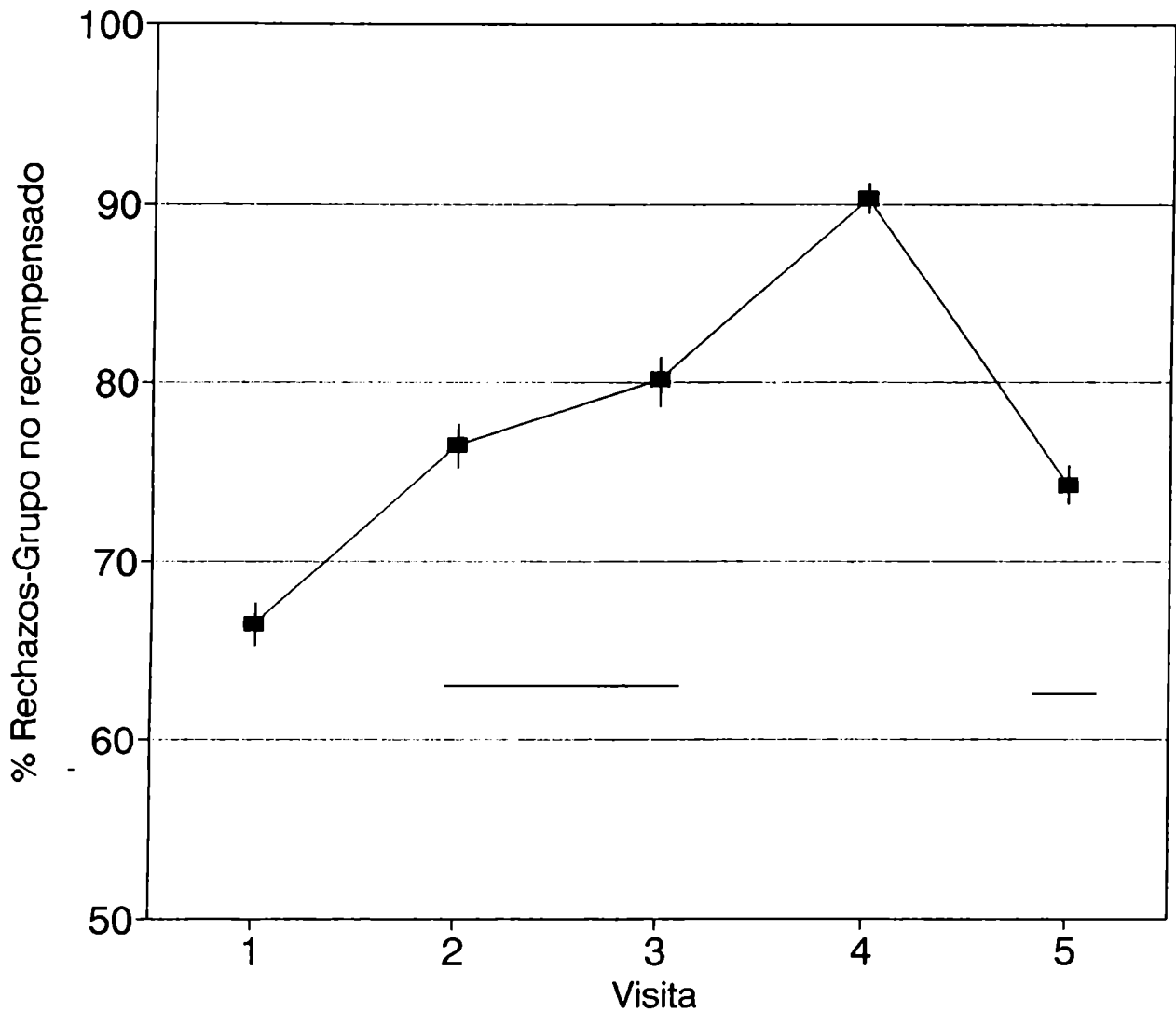


Figura 13. Variación del porcentaje de rechazos sobre el grupo no recompensado de flores en función de la variación en distancia perceptual de los cuatro estímulos usados A, B, C y D. Se presentan medias \pm E.S. Las líneas horizontales en el mismo plano conectan medias que no difieren significativamente entre sí (Test de Newman-Keuls, $P < 0.05$).

ta 4: A vs D), la cantidad de rechazos es mínima, éstos se distribuyen esencialmente sobre el grupo no recompensado.

3. DISCUSION

Los resultados obtenidos demuestran, en primer lugar, que las abejas discriminan efectivamente saturaciones de un mismo color, i.e, que la dimensión perceptual "Saturación" es realmente tenida en cuenta por los insectos en el contexto de la recolección de néctar. Este punto es importante ya que la discriminación de distintas saturaciones de un mismo color en abejas (y en insectos con visión del color en general) ha sido escasamente estudiada (Lieke, comunicación personal) e inclusive denegada (Bobeth 1979). Kipp y Mason (1982), por su parte, reconocieron la existencia de discriminación en esta dimensión perceptual aunque sugirieron que sería inferior a la discriminación de tonos, es decir de longitudes de onda. Tal afirmación parece aventurada en tanto y en cuanto involucra una comparación lineal entre dos dimensiones perceptuales distintas.

En la situación experimental propuesta, las diferencias en la discriminación visual se debieron a variaciones en la saturación y no en el brillo ya que la escala de saturación (creciente o decreciente) no mostró correlación con la escala de brillos medida para los estímulos usados. Así, la mayor diferencia en este plano se dio entre los colores A y C. Si el animal se hubiese guiado por la variable brillo, los picos de respuesta deberían haberse dado en la visita 3 (A vs C) y no en la visita 4 (A vs D) como realmente ocurrió.

Las consecuencias biológicas de la discriminación de saturaciones podrían verse, por ejemplo, a nivel del comportamiento polinizador de las abejas. Diferencias leves en la saturación podrían afectar seriamente la elección de dos genotipos de una misma especie de planta, especialmente si sus recompensas son diferentes. Tal parece ser el caso de distintos genotipos de alfalfa (*Medicago sativa* L.), reconocidos perfectamente por las abejas que muestran marcadas preferencias por algunos de ellos (Kauffeld & Sorensen 1980). De esta manera, Clement (1965) explica el que no se pueda garantizar la polinización azarosa entre genotipos de plantas estrechamente relacionados, en los cuales las diferencias de olor no serían un factor importante, aun cuando este último factor no haya sido debidamente cuantificado.

Por otro lado, se demuestra que la estrategia de marcado negativo está modulada por la disponibilidad de señales espectrales que puedan proveer la información necesaria para discriminar un grupo de flores recompensado de otro grupo sin recompensa. Así, a medida que se incrementa la distancia perceptual entre los estímulos usados, los rechazos disminuyen significativamente, es decir, la incidencia del marcado negativo pasaría a ser menor. Dicho de otro modo, las señales visuales pasan a tener prioridad sobre las olfativas. Esta prioridad se puede apreciar, además, en la **Figura 12**, en las dos primeras visitas: allí se observa que los rechazos no variaron significativamente de una visita a otra mientras que ocurrió lo contrario con la elección del grupo recompensado. Esto es, no parece haber variaciones en la estrategia de marcado en este salto perceptual pero sí mejora la elección del grupo recompensado

(color A) que se diferencia ahora visualmente del no recompensado (color B).

Que las abejas rechazen cada vez menos flores a medida que más van al grupo con recompensa (Figura 12) no significa necesariamente que se abandone la estrategia del marcado negativo. De hecho, se observa que los rechazos se distribuyen básicamente sobre el grupo no recompensado (Figura 13) y que éstos aumentan porcentualmente a medida que mejor se diferencian los dos grupos de flores. Esto es, en la visita 4 (máxima distancia perceptual: A vs D), pocas flores fueron rechazadas pero estos rechazos ocurrieron las pocas veces que las abejas descendieron en flores del grupo no recompensado. Este resultado plantea la pregunta acerca de un marcado negativo diferencial en una situación de contraste como la propuesta (flores con recompensa vs flores sin recompensa) tal que las flores sin recompensa se marcarían más que las otras.

En todo caso, se puede apreciar cómo varía la actividad de marcado, medida a través del número de rechazos dentro de una visita, de acuerdo a la posibilidad de diferenciar o no los grupos de flores con y sin recompensa en base a señales visuales, relacionadas con la dimensión espectral de la saturación, en este caso. Se demuestra así que la abeja recolectora es sumamente "oportunista" en el uso de claves sensoriales que le permitan hacer eficiente su comportamiento recolector.

CAPITULO 8

Conclusión

Si bien no pudimos encontrar existencia de preferencias espontáneas innatas por determinados estímulos espectrales, se demostró que las abejas pueden emplear una estrategia en la cual el color puede ser usado como clave para saltar de un grupo de flores con un color a otro grupo de flores con otro color, estrategia que parece relacionada con la probabilidad de encontrar recompensa en un mismo color (Capítulo 2)

Por otro lado, demostramos que las capacidades de aprendizaje y memorización de estímulos espectrales en la abeja doméstica son tan desarrolladas que la obtención de alimento en una fuente involucra el aprendizaje rápido de las señales de color asociadas a él; así, de faltar estas señales, pueden ser fácilmente generalizables a otras señales disponibles e influenciar así cualquier elección de estímulos espectrales (Capítulo 3). Se observa así cómo el color puede constituir una herramienta útil para la optimización de la recolección de néctar.

También contribuyen en ese mismo sentido una sustancia de marcado negativo liberada por las abejas en el momento de abandonar las flores recientemente visitadas y los propios patrones de movimiento del animal, en los cuales el retorno inmediato a la última flor visitada se halla inhibido (Capítulo 4). La sustancia de marcado negativo sería una sustancia de uso individual, para facilitar la orientación de una dada recolectora dentro de un grupo de flores, aun cuando no se puede descartar

totalmente su uso por otras abejas (Capítulo 5). Una sustancia como la descrita es particularmente útil en el contexto de una Compuesta como el cardo silvestre *Carduus acanthoides*, en el cual la evidencia comportamental obtenida, referida a la recolección de néctar, es consistente con la hipótesis de una señalización olfativa de tipo repelente de las flores recientemente visitadas (Capítulo 6).

Finalmente, se demuestra que existe una interacción entre las señales espectrales y la estrategia de marcado negativo tal que las señales visuales parecen tener prioridad sobre este tipo de señal olfativa. La incidencia del marcado negativo sería menor cuando la discriminación de un grupo de flores con recompensa de otro sin recompensa puede hacerse en base a señales espectrales de distinta saturación (Capítulo 7)

Los resultados obtenidos plantean, a su vez, nuevas preguntas. Varias de ellas han sido sugeridas a lo largo de esta tesis como ser, por ejemplo, la variación del marcado negativo frente al número de flores disponibles en un grupo de flores, la propia modulación de esta estrategia frente a distintas situaciones de recompensa de néctar o la posibilidad de que las recolectoras trabajen en "equipos". Un punto tal vez más evidente aún es el de una posible identificación de la sustancia química involucrada. Si bien para este fin hace falta otro tipo de ensayos, cuya complejidad está, por ahora, fuera de nuestro alcance, resulta interesante partir de una hipótesis nula en la que se sugiera que la sustancia en cuestión es la feromona de alarma, 2-heptanona, liberada ante pilladoras de otras colmenas y ante otros potenciales enemigos (Shearer & Boch 1965, Boch & Shearer 1967) (ver página 9). Si así fuese, se explicaría la

aparente incongruencia citada en la página 9 respecto de los niveles de 2-Heptanona de guardianas y recolectoras. Coincidiría además con la observación común respecto de feromonas cuyo significado cambia de acuerdo al contexto en el que son liberadas (Hölldobler & Carlin 1987).

José A. Núñez
José A. Núñez

~~MC H~~
M GURFA

CAPITULO 9

Bibliografía

- Backhaus W & Menzel R (1987) Color distance derived from a receptor model of color vision in the honeybee. *Biol Cybernet* 55:321-331.
- Backhaus W., Menzel R. and Kreissl S. (1987a) Multidimensional Scaling of Color Similarity in Bees. *Biol. Cybern.* 56, 293-304.
- Backhaus W., Werner A. and Menzel R. (1987b) Colour Vision in Honeybees: Metric, Dimensions, Constancy and Ecological Aspects. In *Neurobiology and Behaviour of Honeybees* (edited by R. Menzel and A. Mercer). Springer, Berlin.
- Balderrama NM, Almeida de B LO, Nuñez JA (1991) Metabolic rate during foraging in the honey bee. *J Comp Physiol* (en revisión).
- Blum M (1982) Pheromonal bases of insect sociality: communications, conundrums and caveats. En: *Les Médiateurs Chimiques* (ed: INRA), Versailles.
- Blum M (1988) Eclectic chemisociality of the honeybee: a wealth of behaviors, pheromones and exocrine glands. *J Chem Ecol* 14:2099-2107.
- Bobeth H (1979) Dressurversuche zum Farbensehen der Bienen: die Sättigung von Spektralfarben. Tesis Doctoral, Universität Freiburg.

- Boch R & Shearer DA (1962) Identification of geraniol as the active component in the Nasonoff pheromone of the honeybee. *Nature* 194:704-706.
- Boch R & Shearer DA (1963) Production of geraniol by honey bees of various ages *J Ins Physiol* 9:431-434.
- Boch R & Shearer DA (1964) Identification of nerolic and geranic acids in the Nasonoff pheromone of the honey bee. *Nature* 202:320-321.
- Boch R & Shearer DA (1967) 2-Heptanone and 10-Hydroxy-trans-dec-2-enoic Acid in the mandibular glands of worker honeybees of different ages. *Z vergl Physiol* 54:1-11, 1967.
- Bodenheimer FS (1958) *Animal Ecology today*. W Junk & den Haag (eds) *Monographiae Biologicae* VI. 276 pp.
- Bogdany FJ (1978) Linking of learning signals in honey bee orientation. *Behav Ecol Sociobiol* 3:323-336.
- Brandt R, Backhaus W, Dittrich M, Janetzki C & Menzel R. (1989) Colour vision in bees: opponent coding and choice behaviour. In: *Dynamics and plasticity in neuronal systems*, N Elsner & W Singer (eds), Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Butler C.G. (1951) The importance of perfume on the discovery of food by the worker honeybee *Apis mellifera* L. *Proc Royal Soc B* 138, 403-413.
- Butler C.G. (1966) Mandibular gland pheromone of worker honeybees. *Nature* 212:530.
- Butler CG & Callam DH (1969) Pheromones of the honey bee - the secretion of the Nasonoff gland of the worker. *J Ins Physiol* 15:237-244.

- Butler CG, Fletcher DJC & Watler D (1969) Nest entrance marking with pheromones by the honeybee *Apis mellifera* L. and by a wasp *Vespula vulgaris* L. *Anim Behav* 17:142-147.
- Butler CG, Fletcher DJC & Watler D (1970) Hive entrance finding by honeybee by honeybee (*Apis mellifera*) foragers. *Anim Behav* 18:78-91.
- Cameron S (1981) Chemical signals in bumble bee foraging. *Behav Ecol Sociobiol* 9:257-260.
- Chauvin R (1962) Sur l'épagine et sur les glandes tarsales d'Arnhart. *Insectes Sociaux* 9:1-5.
- Clement BA (1965) Flower color, a factor in attractiveness of alfalfa clones for honey bees. *Crop Science* 5:267-268.
- Corbet SA, Willmer PG, Beamant JW, Unwin DM & Prys-Jones OE (1979) Post-secretory determinants of sugar concentration in nectar. *Plant Cell Environment* 2:293-308.
- Corbet SA, Kerslake CJC, Brown D & Morland NE (1984) Can bees select nectar-rich flowers in a patch? *J Apic Res* 23: 234-242.
- Darwin Ch. (1877) The effects of cross- and self-fertilization in the vegetable kingdom. 1st edn. Murray, London.
- Daumer K. (1956) Reizmetrische Untersuchungen des Farbensehens der Bienen. *Z vergl Physiol* 38, 413-478.
- Draper N & Smith H (1966) *Applied Regression Analysis*. Wiley, New York.
- Faegri K & van der Pijl L (1967) *The principles of Pollination Ecology*. Pergamon Press, Oxford.
- Ferguson AW & Free JB (1979) Production of a forage-marking pheromone by the honeybee. *J Apic Res* 18: 128-135.
- Fischer W (1957) Untersuchungen über die Riechscharfe der Honigbiene. *Z vergl Physiol* 39:634-659.

- Frankie GW & Vinson SW (1977) Scent marking of passion flowers in Texas by females of *Xylocopa virginica texana* (Hymenoptera: Anthophoridae). *J Kans Ent Soc* 50:613-625.
- Free JB (1968) The conditions under which foraging honeybees expose their Nasonov gland. *J Apic Res* 7:139-145.
- Free JB (1987) *Pheromones of Social Bees*. Comstock, Ithaca.
- Free JB & Butler CG (1955) An analysis of the factors involved in the formation of a cluster of honeybees (*Apis mellifera*). *Behaviour* 7:304-316.
- Free JB & Racey PA (1966) The pollination of *Fresia refracta* in glasshouses. *J Apic Res* 5:177-182.
- Free JB & Williams IH (1970) Exposure of Nasonov gland by honeybees (*Apis mellifera*) collecting water. *Behaviour* 37:286-290.
- Free JB & Williams IH (1972) Hoarding by honeybees (*Apis mellifera* L). *Anim Behav* 20:327-334.
- Free JB & Williams I (1972) The role of the Nasonov gland pheromone in crop communication by honeybees. *Behaviour* 41: 314-318.
- Free JB & Williams I (1979) Communication by pheromones and other means in *Apis florea* colonies. *J Apic Res* 22:86-90.
- Free JB, Williams I, Pickett JA, Ferguson AW & Martin AP (1982) Attractiveness of (Z)-11-eicosen-1-ol to foraging honeybees. *J Apic Res* 21: 151-156.
- Frisch K v (1914) Der Farbensinn und Formensinn der Biene. *Zool Jahrb Abt Allg Zool Physiol* 35:1-188.
- Frisch K v (1919) Über den Geruchsinn der Biene und seine blütenbiologische Bedeutung. *Zool Jahrb Abt Allg Zool Physiol* 38:1-238.

- Frisch K v (1923) Über die "Sprache" der Bienen, eine Tierpsychologische Untersuchung. Zool Jahrb Abt Allg Zool Physiol 40:1-186.
- Frisch K v (1967) The dance language and orientation of bees. Oxford University Press, London.
- Frisch K v & Rösch GA (1924) Neue Versuche über die Bedeutung von Duftorgan und Pollenduft für die Verständigung im Bienenvolk. Z vergl Physiol 4:1-21.
- Giurfa M & Núñez JA (1991) Foraging of honeybees in *Carduus acanthoides*: pattern and efficiency as related to nectar availability. Oecologia (en revisión)
- Gribakin FG (1969) Cellular basis of colour vision in the honeybee Nature 233:639-641.
- Hamdorf K (1979) The physiology of invertebrate visual pigments. En: Autrum H (ed) Invertebrate Photoreceptors. Springer, Berlin, Heidelberg New York (Handbook of Sensory Physiology vol VII/6A: 145-224).
- Harrison JM (1986) Caste-specific changes in honeybee flight capacity Physiol Zool. 59:175-187.
- Heinrich B (1975) Bee flowers: a hypothesis on flower variety and blooming times. Evolution 29:325-334.
- Heinrich B (1976) The foraging specialization of individual bumblebees. Ecol. Monogr. 46, 105-128.
- Heinrich B (1979) Resource heterogeneity and patterns of movement in foraging bumblebees. Oecologia 40:235-245.
- Helmholtz H v (1896) Handbuch der physiologischen Optik, 2. Aufl. Voß, Hamburg.
- Helversen O. von (1972) Zur spektralen Unterschiedsempfindlichkeit der Honigbiene. J. Comp. Physiol. 80, 439-472.

- Hertel H (1980) Chromatic properties of identified interneurons in the optic lobes of the bee. *J Comp Physiol* 137:215-231.
- Hertz M (1934) Eine Bienendressur auf Wasser. *Z vergl Physiol* 21:463-467.
- Hölldobler B & Carlin NF (1987) Anonymity and specificity in the chemical communication signals of social insects. *J Comp Physiol* 161:567-581.
- Jacobs W (1924) Das Duftorgan von *Apis mellifera* und ähnliche Hautdrüsenorgane sozialer und solitärer Apiden. *Z Morph Ökol* 3:1-80.
- Jessen K & Maschwitz U (1986) Orientation and recruitment behavior in the ponerine ant *Pachychondyla tesserinoda* (Emery): laying of individual-specific trails during tandem running. *Behav Ecol Sociobiol* 19: 151-155.
- Kaissling KE (1979) Recognition of pheromones by moths, especially in Saturniids and *Bombyx mori*. En: *Chemical Ecology: Odour Communication in Insects* (ed: FJ Ritter), Elsevier, Amsterdam.
- Karlson P & Lüscher M (1959) "Pheromones": a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183: 55-56.
- Kato M (1988) Bumblebee visits to *Impatiens* spp: pattern and efficiency. *Oecologia* 76:364-370.
- Kauffeld, NM & Sorensen EL (1980) Foraging behavior of honey bees on two-clone alfalfa combinations differing in bee attractiveness. *J Econ Entomol* 73:434-435.
- Kevan PG & Baker HG (1983) Insects as flower visitors and pollinators. *Ann Rev Entomol* 28:407-453.
- Kien J & Menzel R (1977) Chromatic properties of interneurons in the optic lobes of the bee.II. Narrow band and colour opponents neurons. *J Comp Physiol* 113:35-53.

- Kipp LR & Mason CE (1982) Blue saturation discrimination by honeybees and its potential influence on cross pollination. *Crop Science* 22:752-755.
- Kirk P (1950) *Quantitative ultramicroanalysis*. Wiley, New York.
- Kolmes SA (1985) An ergonomic study of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *J Kans Entomol Soc* 58:413-421.
- Kuwabara M & Takeda K (1956) On the hygroreceptor of the honeybee *Apis mellifera*. *Physiol and Ecol* 7:1-6.
- Lecomte J (1956) Ueber die Bildung von Strassen durch Sammelbienen deren Stock um 180° gedreht wurde. *Z Bienenforsch* 3:128-133
- Lindauer M (1948) Über die Einwirkung von Duft-und Geschmackstoffen sowie andere Faktoren auf die Tänze der Bienen. *Z vergl Physiol* 31:348-412
- Lindauer M (1952) Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z vergl Physiol* 34:299-345.
- Lindauer M & Kerr WE (1958) Die gegenseitige Verständigung bei den stachelosen Bienen. *Z vergl Physiol* 41:405-434.
- Manning A (1956) Some aspects of the foraging behaviour of bumblebees. *Behaviour* 9:164-201.
- Marden JH (1984) Remote perception of floral nectar by bumblebees. *Oecologia* 64:232-240.
- Markl H (1985) Manipulation, modulation, information, cognition: some of the riddles of the communication. In *Experimental Behavioral Ecology* (edited by B. Hoelldobler & M. Lindauer). *Fortsch. Zool.* Vol. 31, 163-194, Fischer, Stuttgart.
- Maschwitz U, Lenz S & Buschinger A (1986) Individual specific trails in the ant *Leptothorax affinis* (Formicidae: Myrmicinae). *Experientia* 42: 1173-1174.

- McIndoo NE (1914) The scent producing organ of the honey bee. Proc Soc Nat Sci Phil 66:542-55.
- McIndoo NE (1914) The scent-producing organ of the honey bee. Proc Soc Nat Sci and Phil 66:542-555.
- Menzel R (1967) Das Erlernen von Spektralfarben durch die Honigbiene. Z. vergl. Physiol. 56, 22-62.5
- Menzel R (1968) Das Gedächtnis der Honigbiene für Spektralfarben. I-. Kurzeitiges und langzeitiges Behalten. Z. vergl. Physiol. 60, 82-102.
- Menzel R (1969) Das Gedächtnis der Honigbiene für Spektralfarben. II-. Umlernen und Mehrfachlernen. Z vergl Physiol 63:290-309.
- Menzel R (1979) Spectral sensitivity and color vision in invertebrates. En: Autrum H (ed) Invertebrate Photoreceptors. Springer, Berlin, Heidelberg New York (Handbook of Sensory Physiology vol VII/6A: 503-580).
- Menzel R. (1985) Learning in honeybees in an ecological and behavioral context. En *Experimental Behavioral Ecology* (edited by B. Hoelldobler & M. Lindauer). *Fortsch. Zool.* Vol. 31, 55-74, Fischer, Stuttgart.
- Menzel R. & Backhaus W. (1989) Color Vision Honey Bees: Phenomena and Physiological Mechanisms. In *Facets of Vision* (edited by D. Stavenga and R. Hardie), 281-297. Springer, Berlin.
- Menzel R. & Blakers M (1976) Colour receptors in the bee eye-morphology and spectral sensitivity. J Comp Physiol 108:11-33.
- Menzel R. & Greggers U. (1985) Natural phototaxis and its relationship to colour vision in honeybees. J. Comp. Physiol., 157, 311-321.

- Menzel R. & Lieke E (1983) Antagonistic color effects in spatial vision of the honey bees *J Comp Physiol* 151:441-448.
- Menzel R & Snyder AW (1974) Polarized light detection in the bee *Apis mellifera*. *J Comp Physiol* 88: 247-270.
- Michener CD (1969) Comparative social behaviour of bees. *Ann Rev Entomol* 14: 299-342
- Morse RA & Boch R (1971) Pheromone concert in swarming honeybees (Hymenoptera: Apidae) *Annals of Entomol Soc America* 64:1414-1417.
- Núñez JA (1967) Sammelbienen markieren versiegte Futterquellen durch Duft. *Naturwissenschaften* 54: 322-323.
- Núñez JA, Nesse A & Dimant de Fischbarg B (1970) Metabolismo de actividad y de reposo en abejas recolectoras. *Physis* XXX, 80, 155-166.
- Núñez JA (1971) A simulator for learning studies in the bee *Apis mellifera* L. *Acta Cient Venez* 22: 101-106.
- Núñez JA (1974) Metabolism and activity of the worker bee. En *Proc. 24º Congreso Apimondia Buenos Aires* (Harnaj V. & Schwindt-Escalante O. eds.), pp 298-299.
- Núñez JA (1977) Nectar flow by melliferous flora and gathering flow by *Apis mellifera ligustica*. *J Insect Physiol* 23:265-275.
- 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 Research* 21: 139-150.
- Oettingen-Spielberg Th. zu (1949) Über das Wesen der Suchbiene. *Z vergl Physiol* 31, 454-489.
- Ottoson D & Zeki S (1985) Central and peripheral mechanisms of colour vision. MacMillan press LTD, London.

- Pickett JA, Williams IH, Martin AP & Smith MC (1980) Nasonov pheromone of the honeybee *Apis mellifera* L (Hymenoptera: Apidae) Part I. Chemical characterisation. *J Chem Ecol* 6:425-434.
- Pickett JA, Williams IH, Smith MC & Martin AP (1981) The Nasonov pheromone of the honeybee *Apis mellifera* L (Hymenoptera: Apidae) Part III. Regulation of pheromone composition and production. *J Chem Ecol* 7:543-554.
- Pickett JA, Williams IH & Martin AP (1982) (Z)-11-eicosen-1-ol, an important new pheromonal component from the sting of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) *J Chem Ecol* 8:163-175.
- Pyke GH (1978) Optimal foraging: movement patterns of bumblebees between inflorescences. *Theor Pop Biol* 13:72-98
- Renner M (1960) Das Duftorgan der Honigbiene und die Physiologische Bedeutung ihres Lockstoffes. *Z vergl Physiol* 43:411-468.
- Ribbands CR (1949) The foraging method of individual honey bees. *J Anim Ecol* 18:47-66.
- Ribbands CR (1952) Division of labour in the honeybee community. *Proc Roy Soc B* 140:32-42.
- Ribbands CR (1954) Communication between honeybees. 1. The response of crop-attached bees to the scent of their crop. *Proc Roy Entomol Soc, Lond.* 29:141-144.
- Ribbands CR (1955) The scent perception of the honeybee. *Proc Roy Soc B* 143:367-379.
- Ribbands CR & Speirs N (1953) The adaptability of the homecoming honeybee. *Brit J Anim Behav* 1:59-66.

- Rösch GA (1925) Untersuchungen über die Arbeitsteilung im Bienenstaat, I. Teil: Die tätigkeiten im normalen Bienenstaate und ihre Beziehungen zum Alter der Arbeitsbienen. *Z vergl Physiol* 2:571-631.
- Rösch GA (1927) Über die Bautätigkeit im Bienenvolk und das Alter der Baubienen. *Z vergl Physiol* 6:264-298.
- Rose R. & Menzel R. (1981) Luminance dependence of pigment colour discrimination in Bees. *J. Comp. Physiol* 141, 379-388.
- Rothe U & Nachtigall W (1989) Flight of the honey bee IV. Respiratory quotients and metabolic rates during sitting, walking and flying. *J Comp Physiol* 158: 739-749.
- Sakagami SF (1953) Untersuchungen über die Arbeitsteilung in einem Zwergvolk der Honigbiene: Beiträge zur Biologie des Bienenvolkes, *Apis mellifera* L. I *Jap J Zool* 11:117-185.
- Schmitt U & Bertsch A (1990) Do foraging bumblebees scent-mark food sources and does it matter? *Oecologia* 82:137-144.
- Schmid-Hempel P (1986) The influence of reward sequence on flight directionality in bees. *Anim Behav* 34:831-837.
- Schrödinger E (1920a) Grundlinien einer Theorie der Farbenmetrik im Tagessehen. *Ann Physik* 63:397-456.
- Schrödinger E (1920b) Grundlinien einer Theorie der Farbenmetrik im Tagessehen: der Farbenmetrik II. Teil: Höhere Farbenmetrik (eigentliche Metrik der Farbe). *Ann Physik* 63:481-520.
- Schwarz R (1955) Über die Riechschärfe der Honigbiene. *Z vergl Physiol* 37:180-210.
- Seeley TD (1982) Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behav Ecol Sociobiol* 5:391-415.

- Seeley TD (1985) Honeybee Ecology. Princeton University Press, Princeton.
- Shearer DA & Boch R (1965) 2-Heptanone in the mandibular gland secretion of the honey-bee. *Nature* 206:530.
- Shearer DA & Boch R (1966) Citral in the Nasonoff pheromone of the honey bee. *J Ins Physiol* 12:1513-1521.
- Simpson J (1961) The salivary glands of *Apis mellifera* and their significance in caste determination. *Atti IV Congresso UIEIS*, X:173-188, Pavia.
- Simpson J (1966) Repellency of the mandibular gland scent of worker honeybees. *Nature* 209:531-532.
- Simpson J, Riedel IBM & Wilding N (1968) Invertase in the hypopharyngeal glands of the honeybee. *J Apic Res* 10:109-113.
- Sladen FWL (1901) A scent organ in the bee. *Brit Bee Journal* 29:142-153.
- Sladen FWL (1902) A scent producing organ in the abdomen of the worker of *Apis mellifera* *Entomol Month Magazine* 38:208-211.
- Sladen FWL (1905) Queen rearing in England. Houlson, London.
- Smith MV (1974) Relationship of age to brood rearing activities of worker honeybees, *Apis mellifera* L. *Proc Ent Soc Ont* 105:128-137.
- Snodgrass RE (1956) *Anatomy of the Honeybee*. Constable, London.
- Sokal R. and Rohlf F.J. (1981) *Biometry*. Freeman, New York.
- Thorp RN, Briggs DL, Estes JR & Erikson EH (1975) Nectar fluorescence under ultraviolet irradiation. *Science* 189:476-478.

- Vareschi E (1971) Duftunterscheidung bei der Honigbiene - Einzelzell Ableitungen und Verhaltensreaktionen. Z vergl Physiol 75:143-173.
- Velthuis HHW & van Es J (1964) Some functional aspects of the mandibular glands of the queen honeybee. J Apic Res 3:11-16.
- Villa JD & Weiss MR (1990) Observations on the use of visual and olfactory cues by *Trigona* spp foragers. Apidologie 21:541-545.
- Vogel S (1983) Ecophysiology of Zoophilic Pollination. In: Lange O, Nobel P, Osmond C, Ziegler H (eds) Physiological plant ecology III, tome 12 C of Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 559-624.
- Waddington K (1980) Flight patterns of foraging bees relative to density of artificial flowers and distribution of nectar. Oecologia 44:199-204.
- Weaver N, Weaver EC & Law J (1964) The attractiveness of citral to foraging honeybees. Prog Report Texas A & M University/Texas Agric Exp Station 1-6.
- Wenner AM, Wells PH & Johnson DL (1969) Honeybee recruitment to food sources: olfaction or language? Science 164:84-86.
- Wetherwax PB (1986) Why do honeybees reject certain flowers? Oecologia 69:567-570.
- Wilson EO (1971) The Insect Societies. Belknap Press, Cambridge, Massachusetts.
- Wilson EO & Bossert (1963) Chemical Communication among Animals. Recent Progress in Hormone Research 19:673-716.
- Winer BJ (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill Book Co., New York.

- Winston ML (1987) The Biology of the Honey Bee. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Winston ML & Punnett EN (1982) Factors determining temporal division of labor in bees. Can J Zool 60: 2947-2952.
- Young T (1802) On the theory of light and colours. Philos Trans R Soc London Ser B 92:12-48.
- Zar JH (1984) Biostatistical Analysis (2nd edition). Prentice Hall Inc, New Jersey.