

Tesis Doctoral

Aprendizaje olfativo temprano en la abeja (*Apis mellifera*) y su rol en la toma de decisiones relacionadas con la obtención de recursos

Arenas, Andrés

2009

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:

Arenas, Andrés. (2009). Aprendizaje olfativo temprano en la abeja (*Apis mellifera*) y su rol en la toma de decisiones relacionadas con la obtención de recursos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Arenas, Andrés. "Aprendizaje olfativo temprano en la abeja (*Apis mellifera*) y su rol en la toma de decisiones relacionadas con la obtención de recursos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

APRENDIZAJE OLFATIVO TEMPRANO EN LA ABEJA (*Apis mellifera*) Y SU ROL EN LA TOMA DE DECISIONES RELACIONADAS CON LA OBTENCION DE RECURSOS

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Andrés Arenas

Director: Dr. Walter M. Farina

Grupo de Estudios de Insectos Sociales
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental
Buenos Aires, 2009

Aprendizaje olfativo temprano en la abeja (*Apis mellifera*) y su rol en la toma de decisiones relacionadas con la obtención de recursos

Resumen

Tempranamente en la vida de un animal las experiencias pueden moldear de forma dramática su comportamiento adulto. Utilizando a la abeja melífera nos propusimos entender la influencia de las experiencias olfativas precoces durante el estadio adulto sobre los comportamientos en individuos que hayan alcanzado edades en donde las actividades de recolección de recursos son frecuentes. Para ello evaluamos la retención de memorias olfativas establecidas en obreras de distintas edades observando que los niveles con los que se evocaban dichas memorias eran diferentes: abejas que recibían alimento aromatizado entre los 5 y 8 días de vida recordaban mejor a estos olores los 17 días que las que los aprendían a edades intermedias (9-12 días de edad). Sin embargo, la retención de aquellas abejas condicionadas entre los 9-12 días de edad podían ser mejorada si los individuos recibían experiencias olfativas tempranas ya sea a los 1-4 ó 5-8 días de edad. Estos resultados sugieren que: i) la retención de memorias olfativas tempranas no dependen directamente del intervalo adquisición-evaluación, sino de la edad en que ocurría la experiencia y ii) estas experiencias son fundamentales para el desarrollo de la memorización a largo término en abejas de edades intermedias. Esto podría explicarse a través de cambios en los patrones de actividad neuronal que observamos en el lóbulo antenal de abejas maduras que aprendieron precozmente un olor. Después de mostrar que las memorias olfativas que se adquieren en las primeras etapas de la vida adulta de un insecto pueden guiar el comportamiento varios días después del aprendizaje, y que estos recuerdos pueden vincularse a la modificación de la actividad neuronal en el cerebro, la abeja ofrece una nueva perspectiva para estudiar la ontogenia del aprendizaje y la memoria y sus consecuencias sobre la biología social.

Palabras claves: *Apis mellifera*, Aprendizaje asociativo, memorias de largo término experiencias tempranas, sistema olfativo.

Early olfactory learning in the Honeybee (*Apis mellifera*) and its role in making decision process related to foraging

Abstract

Early in the life of an animal, experiences can dramatically shape their adult behavior. Using the honeybee, we addressed the influence of olfactory experiences during early stage on adult, when worker bees initiate foraging tasks. Thus, we evaluated the retention of olfactory memories in pre-foragers of different ages, noting that the levels of retention were different among groups. Bees that received scented-food at 5-8 days of age showed higher retention than 9-12-days-old-conditioned bees when tested on day 17. However, memory retention at 9-12 days of age could be improved if individuals receiving an early olfactory experiences either at 1-4 or 5-8 days of age. These results suggest that: i) the retention of early olfactory memories could not be easily explained by the interval between acquisition and testing, but the age at which occurred the experience and ii) these experiences are essential for the development of long-term memory in middle-aged bees. These outcomes could be explained by changes in glomerular activity patterns detected in the antennal lobe of the mature bee that precociously learned an odor (5-8 days of age). After showing that olfactory memories acquired in the early stages of adult life of an insect may bias behavior after several days after learning, the bee offers a new perspective to study the ontogeny of learning and memory and its impact on social biology.

Keywords: *Apis mellifera*, associative learning, long-term memory, early olfactory experiences, olfactory system.

Agradecimientos:

Muchas personas me ayudaron durante los últimos años he hicieron de este proyecto algo muy interesante y enriquecedor para mí. A Walter por confiar en mí, por guiarme y dejarme expresar y por estar siempre dispuesto a discutir el mejor camino para probar nuestras ideas. A las chicas (Agus, Vane, Sofi, Gabi, Pau, Sol, Yael y Roxy) y a la minoría (Andrés M, Tito Grüter, Gonza y Fran) por mostrarme que en un grupo (al igual que en las abejas) la contribución de sus miembros es mucho más que la de cada uno por separado. A Fer, Max y Fabiene que me bancaron y ayudaron con la mejor onda en Toulouse. También a Martín G., Jean-Christoph S., Jean-Marc D. y Nina D. que me abrieron las puerta de su laboratorio para aprender.

Por último a toda mi flia. (más de 20) que nunca priorizaron otros intereses que no fuesen los que realmente me importan. A mis amigos, que aunque sin entender del todo de que se trataba este proyecto, supieron acompañarme y valorar la importancia de lo que hacemos los biólogos. Por último quería darle infinitas gracias a Agus por iluminarme día a día.

Índice

1	Introducción General	11
1.1	APRENDIZAJE ASOCIATIVO	11
1.1.1	<i>Condicionamiento Simple</i>	12
1.1.2	<i>Condicionamiento olfativo en insectos</i>	13
1.1.2.1	<i>Respuesta de Extensión de Probóscide (REP)</i>	14
1.2	APRENDIZAJE NO ASOCIATIVO	15
1.3	EL OLFATO DE LOS INSECTOS	16
1.3.1	<i>El sistema olfativo en insectos</i>	
1.3.2	<i>Maduración del sistema olfativo en insectos</i>	20
1.4	LA ABEJA <i>Apis mellifera</i>	22
1.4.1	<i>Organización de la colonia</i>	22
1.4.2	<i>Recolección de recursos en la abeja</i>	24
1.4.3	<i>Memorias en la abeja</i>	25
1.5	OBJETIVOS	27

2	Los olores florales aprendidos dentro de la colmena afectan las preferencias recolectoras a largo plazo	30
2.1	INTRODUCCIÓN	30
2.2	MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.2.1	<i>Animales experimentales y lugar de estudio</i>	31
2.2.2	<i>Estimulación olfativa</i>	32
2.2.3	<i>Entrenamiento</i>	32
2.2.4	<i>Evaluación</i>	33
2.2.4.1	<i>“Olor vs olor”: Preferencias en un dispositivo con dos alimentadores aromatizados.</i>	34
2.2.4.2	<i>“Olor vs no-olor”: Preferencias en un dispositivo con un alimentador aromatizado y otro sin aromatizar.</i>	35
2.2.5	<i>Estadísticas</i>	35
2.3	RESULTADOS	36
2.3.1	<i>“Olor vs olor”: Preferencias en un dispositivo de dos alimentadores aromatizados.</i>	37
2.3.2	<i>“Olor vs no-olor”: Preferencias en un dispositivo con un alimentador aromatizado y otro sin aromatizar.</i>	37
2.4	DISCUSIÓN	39

3	La edad y el medio ambiente de cría interactúan en la retención de memorias olfativas tempranas	42
3.1	INTRODUCCIÓN	42
3.2	MATERIAL Y MÉTODOS	44
3.2.1	<i>Sitio de estudio y animales experimentales</i>	44
3.2.2	<i>Condicionamiento olfativo y evaluación</i>	45
3.2.3	<i>Procedimiento experimental</i>	46
3.2.3.1	<i>Condicionamiento clásico en abejas de laboratorio</i>	46
3.2.3.2	<i>Oferta de alimento aromatizado en abejas de laboratorio</i>	47
3.2.3.3	<i>Múltiples experiencias olfativas en abejas de laboratorio</i>	50
3.2.3.4	<i>Oferta de alimento aromatizado en abejas de vuelo libre</i>	50
3.2.4	<i>Estadísticas</i>	52
3.3	RESULTADOS	53
3.3.1	<i>Condicionamiento clásico en abejas de laboratorio</i>	53
3.3.2	<i>Oferta de alimento aromatizado en abejas de laboratorio</i>	56
3.3.3	<i>Oferta de alimento aromatizado en abejas criadas dentro de colmenas</i>	58
3.3.4	<i>Retención en abejas que recibieron múltiples experiencias olfativas en laboratorio</i>	59
3.3.5	<i>Retención en abejas de vuelo libre</i>	60

3.4	DISCUSIÓN	62
	<i>3.4.1 Las experiencias con olores en un ambiente controlado</i>	
	<i>3.4.2 Olores experimentados dentro de la colmena</i>	65
4	Las experiencias olfativas tempranas modifican la actividad neuronal en el lóbulo antenal de abejas adultas	68
4.1	INTRODUCCIÓN	68
4.2	MATERIAL Y MÉTODOS	70
	<i>4.2.1 Animales</i>	70
	<i>4.2.2 Experiencias olfativas tempranas</i>	70
	<i>4.2.3 Respuestas comportamentales</i>	71
	<i>4.2.4 Registros Opto-fisiológicos</i>	72
	<i>4.2.4.1 Preparación y tinción de los cerebros</i>	72
	<i>4.2.4.2 Registros ópticos</i>	73
	<i>4.2.4.3 Identificación de glomérulos</i>	74
	<i>4.2.4.4 Procesamiento de los datos</i>	75
4.3	RESULTADOS	77
	<i>4.3.1 Respuestas comportamentales</i>	77
	<i>4.3.2 Respuestas Opto-fisiológicas</i>	78

4.3.2.1	<i>Las respuestas a los olores de la abeja melífera AL</i>	78
4.4	DISCUSIÓN	87
5	El aprendizaje asociativo a edades tempranas mejora la retención de memorias de largo término	92
5.1	INTRODUCCIÓN	92
5.2	MATERIAL Y MÉTODOS	93
5.2.1	<i>Sitio de estudio y los animales</i>	93
5.2.2	<i>Procedimiento experimental</i>	94
5.2.2.1	<i>Abejas condicionadas con Alimento aromatizado</i>	94
5.2.2.2	<i>Abejas estimuladas con solución antes de ser condicionadas olfativamente</i>	94
5.2.2.3	<i>Abejas expuestas a un compuesto volátil antes de ser condicionadas</i>	95
5.2.3	<i>Evaluación en el REP</i>	96
5.2.4	<i>Estadísticas</i>	96
5.3	RESULTADOS	97
5.3.1	<i>Abejas condicionadas con Alimento aromatizado</i>	97
5.3.2	<i>Abejas estimuladas con dos solución aromatzadas</i>	97
5.3.3	<i>Abejas expuestas a un compuesto volátil antes de ser condicionadas</i>	98

5.4	DISCUSIÓN	100
6	Discusión General	103
6.1	APRENDIZAJE OLFATIVO EN ABEJAS JOVENES	103
6.2	LAS EXPERIENCIAS TEMPRANAS Y LA MADURACIÓN DEL SISTEMA OLFATIVO	104
6.3	LAS EXPERIENCIAS TEMPRANAS MEJORAN LA RETENCIÓN DE MEMORIAS	106
6.4	¿PERIODO CRÍTICO EN LA ABEJA?	107
6.5	EL ROL DE LA IDENTIDAD DEL OLOR EN LAS EXPERIENCIAS OLFATIVAS	109
6.6	IMPLICANCIAS	112
7	Referencias	116

1

Introducción General

1.1 APRENDIZAJE ASOCIATIVO

El entorno perceptual de los animales presenta una matriz compleja de estímulos de la que deben aprender cuáles (o cuales de sus acciones) pueden ser útiles para sobrevivir. El aprendizaje asociativo es una capacidad que se encuentra en casi todos los animales, y que les permite extraer reglas y estructuras para anticiparse a los eventos relevantes del mundo en que viven. Consiste en establecer relaciones predictivas entre los eventos que coexisten en el medio ambiente de modo de reducir la incertidumbre del animal, a la vez que modifica su comportamiento por las experiencias previas (Giurfa, 2007).

Si bien en la complejidad de los ambientes naturales los animales requieren la integración de diferentes modalidades sensoriales para formar memorias que les permitan predecir eventos relevantes (Mackintosh, 1994), bajo condiciones experimentales de laboratorio los animales pueden ser condicionados a responder ante una estimulación mucho más reducida y controlada. En un condicionamiento simple por ejemplo, el individuo aprende la contingencia entre un estímulo neutro o condicionado (EC) que en un principio carece de significado, y un estímulo incondicionado (EI) que genera una respuesta refleja en el individuo experimental. El vínculo que se genera al asociar ambos estímulos durante el condicionamiento le permite al animal anticipar su respuesta refleja con la sola presentación del EC.

1.1.1 Condicionamiento simple

El condicionamiento simple es un tipo de aprendizaje asociativo en el que se reconocen dos grandes formas: (1) el condicionamiento clásico o pavloviano, en donde los animales aprenden a asociar un estímulo neutro o condicionado (EC, por ejemplo: un color o un sonido) con el estímulo incondicionado (EI, por ejemplo el alimento), y (2) el condicionamiento instrumental u operante (Skinner, 1938) en donde el individuo aprende a asociar su propio comportamiento con un refuerzo (por ejemplo, caminar hacia una fuente y obtener alimento).

En 1927, Ivan Pavlov fue el primero en estudiar las propiedades del condicionamiento simple bajo condiciones controladas de laboratorio (Fig. 1.1). Utilizando al perro como individuo experimental, demostró que la presentación repetida del sonido de una campana seguido de alimento (que generaba una respuesta de salivación en animal) era capaz de desencadenar la salivación ante la sola presentación del sonido y en ausencia de alimento.

Fig. 1.1 Iván Petróvich Pávlov, fisiólogo ruso (1849- 1936), durante sus estudios sobre el condicionando clásico.



En el ejemplo clásico de condicionamiento operante, Skinner (1938) mostró que una rata aprendía a accionar una palanca para obtener alimento. A través de los sucesivos eventos de entrenamiento el individuo era capaz de aprender que su respuesta motora antecedió a la obtención de alimento donde también era necesario que el estímulo reforzador sea contingente con la respuesta del sujeto.

Tanto el condicionamiento clásico como el instrumental permiten entonces generar una predicción, es decir le otorgan al estímulo condicionado [EC (en el primer caso)] o la respuesta operante [RO (en el segundo)] cierto valor predictivo conforme se establece el vínculo entre los ellos. Este vínculo a la vez puede variar fuertemente dependiendo, entre otras cosas de la intensidad, el intervalo entre presentaciones, o de la relevancia o relación que existe en la naturaleza entre los estímulos que pretenden ser asociados (Rescorla, 1985; Balsam, 1985; Bhagavan y Smith, 1997).

1.1.2 Condicionamiento olfativo en insectos

Desde hace varias décadas se sabe que el aprendizaje asociativo es una capacidad importante de muchos insectos. Esto quedó demostrado en una amplia gama de grupos incluyendo polinizadores (Gould, 1993; Menzel et al., 1993, Lewis, 1993;), mántidos (Bowdish y Bultman, 1993), hormigas (Beckers et al., 1994), moscas (Prokopy et al., 1993; 1994), himenopteros parasitoides (Turlings et al., 1993), insectos herbívoros que se alimentan de hojas (Jermy, 1986; Papaj y Prokopy, 1989; Bernays y Chapman, 1994) entre otros. Al igual que los vertebrados superiores, los insectos pueden modificar sus respuestas comportamentales innatas a partir de la formación de asociaciones entre estímulos en distintas modalidades sensoriales como la visual (mosca: Gong et al. 1998; abejas: Zhang et al. 1999, avispa parasitoides: Lucchetta et al., 2008) o la táctil (abejas: Erber, 1998).

Sin embargo, ya que los olores juegan un papel esencial en muchas actividades de la vida de un insecto (por ej. para elegir fuentes de alimentos o localizar sitios de oviposición), es en la modalidad olfativa en donde encontramos más evidencia de que los insectos pueden aprender en las situaciones más diversas. Por ejemplo, se ha demostrado que *Drosophila melanogaster* puede ser condicionada aversivamente al asociar un olor neutro con una descarga eléctrica. Raubenheimer y Tucker (1997) encontraron que *Locusta migratoria*

puede aprender a reconocer las claves olfativas que indiquen la presencia de alimento rico en proteínas o hidratos de carbono. También se vio que algunas avispas parasitoides son capaces de formar asociaciones entre los compuestos volátiles de las plantas huésped y los lugares de refugio y oviposición que ellas proporcionan (Kerguelen y Carde, 1996; Zanen y Carde, 1991).

1.1.2.1 Respuesta de Extensión de Probóscide (REP)

En los insectos succionadores el aprendizaje olfativo se ha centrado en el condicionamiento de la respuesta de extensión de probóscide (REP) inducida con éxito en una gran variedad de especies [en abejorros *bombus terrestres*: Laloi et al., 1999; en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*: Chabaud et al., 2006; en la polilla *Manduca sexta*: Daly y Smith, 2000 y en la abeja sin aguijón *Melipona quadrifasciata*: Mc Cabe et al., 2007 (Fig. 1.2)]. Sin embargo, es en la abeja de la miel (*Apis mellifera*) donde este protocolo ha sido utilizado exhaustivamente en experimentos de fisiología del comportamiento [por ejemplo para explorar las propiedades del aprendizaje asociativo de olores como los intervalos e intensidades en los que se presentan los estímulos (Bhagavan y Smith, 1997), los fenómenos de bloqueo (Smith y Cobey, 1994; Couvillon et al., 1997; Smith, 1997), generalización y discriminación entre olores (Smith y Menzel, 1989), etc.].

Basta con tocar las antenas del insecto con solución azucarada para provocar la protrusión de las partes bucales que conforman la probóscide y activar la conducta de alimentación. En el condicionamiento de REP el estímulo condicionado (EC) se presenta como volátil sobre las antenas del individuo, a la vez que se tocan las antenas con solución azucarada (EI). La contingencia creada entre el azúcar y el estímulo neutro (generalmente olores pero también colores o texturas) le permite al animal anticiparse a la recompensa

extendiendo la probóscide frente al olor (Takeda, 1961; Bitterman et al., 1983).

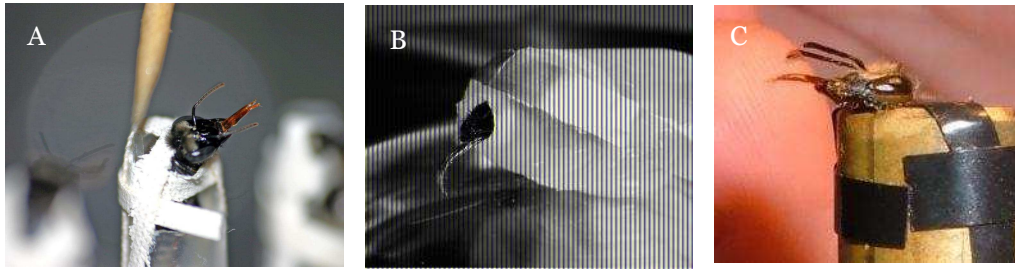


Fig. 1.2 Fotos de distintos amarres utilizados para condicionar la respuesta de extensión de probóscide en distintos insectos. A) Tubos plásticos utilizados en abejas sin aguijón *Melipona quadrifasciata*, B) Cápsulas plásticas usadas en abejorros *Bombus impatiens* y C) amarres metálicos en *Apis mellifera*.

1.2 APRENDIZAJE NO ASOCIATIVO

A diferencia de los procesos de aprendizaje asociativo, en los no asociativos el individuo aprende acerca de las características de un único estímulo, que al cabo de ser presentado sucesivas veces genera cambios en la conducta del animal (Squirre y Kandel, 1999). Estos cambios no se deben a la contingencia entre dos estímulos sino al efecto aislado de uno solo de ellos (Moore, 2001). Entre los procesos de aprendizaje no asociativo encontramos los procesos de habituación y de sensibilización.

La sensibilización es generalmente considerada como un aumento inespecífico de una respuesta causada por la presentación previa de un estímulo fuerte (Dudai, 1989; Kandel et al., 1992). La magnitud de la sensibilización depende de la fuerza del estímulo sensibilizante (Groves et al., 1969; Davis, 1974; Marcus et al., 1988). La misma es generalmente de corto término (Dethier et al., 1965; Krasne y Glanzmann, 1986) sin embargo, la exposición repetida o un aumento en la fuerza del estímulo puede conducir a una sensibilización de largo término (Pinsker et al., 1973; Walters, 1987). Por el contrario

en la habituación, el individuo exhibe una disminución paulatina en su respuesta comportamental tras la sucesiva presentación del mismo estímulo. Mientras que la habituación es estímulo-específica, la sensibilización afecta a un rango más amplio de respuestas (Carew, 2000).

1.3 EL OLFATO DE LOS INSECTOS

Los sentidos permiten la interacción de los animales con el entorno y su propósito fundamental es el de obtener información acerca del medio circundante para poder sobrevivir. El olfato u olfacción es el sentido encargado de detectar y procesar los olores. Al igual que el gusto, el olfato es un sentido químico el cual responde a la estimulación de partículas volátiles odoríferas desprendidas de los cuerpos que hacen contacto con los receptores olfativos. En los insectos los olores desempeñan un papel importante en muchas actividades de su vida. En particular, muchos insectos se basan en claves olfativas para explorar los recursos que ofrece el medio ambiente y también para elegir fuentes de alimentos o localizar sitios de puesta de huevos. Dada la relevancia de los olores para este grupo, el sistema olfativo de los insectos está muy desarrollado y presenta una complejidad semejante a la que se observa en los mamíferos (Hildebrand y Shepherd, 1997).

1.3.1 El sistema olfativo en insectos

En los insectos, los receptores olfativos se encuentran dentro de cavidades o pelos sensoriales: las sensilias olfativas (Goodman, 2003). Las sensilias olfativas se encuentran en las antenas aunque también pueden estar en distintas partes de la boca, patas etc. (Snodgrass, 1984; Chapman, 1998). Entre las sensilias antenales vinculadas con la olfacción podemos mencionar las placoideas, las chaeticas, las basicónicas y las tricoideas

entre otras. En todos los casos las sensilias alojan neuronas receptoras olfativas (NRO) ubicadas en un baño de hemolinfa, cuyas dendritas están protegidas en mucopolisacáridos secretados por células accesorias. Generalmente presentan poros que interrumpen la continuidad de la cutícula y permiten el paso de las moléculas a través de ella. Cada tipo de sensilia sin embargo, presenta características particulares incluso observando variaciones importantes entre especies, por ejemplo en el número de neuronas sensoriales; en las sensilias basicónicas el número de neuronas puede ir desde una única neurona como en *Necrophorus* hasta 35 como en *Locusta* (Kaissling, 1974).

En los insectos, la estimulación de los receptores olfativos presenta respuestas moduladas por su afinidad con el compuesto. La afinidad de la unión molécula-receptor depende de su complementariedad, pudiendo diferenciarse receptores especialistas (aquellos que muestran una alta complementariedad con la molécula estimulante) de los generalistas que muestran menor afinidad pero son capaces de ser activados por un rango más amplio de estímulos (Schneider y Steinbrecht, 1968).

En todos los sistemas olfativos existe un proceso de transducción que convierte la señal de un olor en actividad eléctrica. Hay muchas pruebas que sugieren que cuando la molécula odorante pasa a través de los poros de las sensilias (por ej. en una sensilia tricoidea) es capturada por una proteína de unión (en inglés “olfactory binding protein”) la cual se reduce y transporta la molécula estimulante hasta los receptores ubicados en la membrana de la dendrita (Lerner et al., 1990; van den Berg y Ziegelberger, 1991). Esto causa la excitación de la NRO y la oxidación de la proteína. Finalmente la molécula liberada a la linfa es degradada por esterasas (Ziegelberger, 1995). La estimulación del receptor olfativo transmembrana, resulta a la vez en la activación de una proteína G y la generación de segundos mensajeros por la acción de la adenilato ciclasa que activan canales iónicos generando una señal eléctrica (Hildebrand y Shepherd, 1997). Este

esquema general parece estar ampliamente conservado entre los animales.

Los impulsos nerviosos así generados son conducidos a través del nervio antenal hasta el lóbulo antenal (Fig. 1.3), análogo del bulbo olfativo en mamíferos. Tanto el bulbo olfativo como el lóbulo antenal son centros de integración olfativa y están organizados en subunidades funcionales llamadas glomérulos que resultan de la convergencia de NRO y de otros tipos de neuronas como las de proyección o interneuronas (Hildebrand y Shepherd, 1997). Dependiendo del número de neuronas aferentes (NRO), interneuronas y neuronas de proyección, podemos encontrar un número de glomérulos variable en distintas especies de insectos (en *Periplaneta americana*: 125 glomérulos; en *Manduca sexta*: 60 glomérulos; en *Drosophila*: 40 y en *Locusta migratoria*: 1000 glomérulos). En particular la abeja presenta un total de 160 glomérulos que reciben señales de aproximadamente 60000 axones quimio-sensoriales, los que se conectan aproximadamente con unas 4000 interneuronas responsables de relacionar a los glomérulos entre sí y unas 800 neuronas de proyección (neuronas eferentes) que conducen la información a centros de procesamiento superior: los cuerpos pedunculados o protocerebro lateral. Allí converge información proveniente de distintas modalidades sensoriales incluyendo la olfativa, visual y táctil.

La presentación de un olor evoca patrones de actividad glomerular específicos a través de los cuales los animales codificarían la información olfativa de su entorno (Joerges et al., 1997, Friedrich y Korsching, 1997, Galizia et al., 1998; 1999a, Sachse et al., 1999; Rubin y Katz, 1999; Uchida et al., 2000; Carlsson et al., 2002; Sachse y Galizia, 2002). Durante los últimos años se ha avanzado mucho en “descifrar” este código olfativo utilizando a la abeja melífera como modelo de estudio en invertebrados. En este insecto como en tantos otros, los glomérulos son relativamente pequeños en número y suficientemente consistentes en el tamaño, forma y posición que pueden ser identificados

con cierta facilidad. En este modelo Galizia y colaboradores (1999) midieron las respuestas neuronales generadas por una amplia gama de olores. Utilizando colorantes sensibles a la concentración de calcio intracelular observaron que cada estímulo suscitaba un patrón de actividad característico que se conservaba muy bien entre individuos de la especie. Estos resultados apoyan la idea de que el LA es el primer centro de relevamiento de información de olores en donde las señales olfativas del ambiente se codifican en complejos patrones de actividad glomerular. La información parcialmente procesada alcanzaría luego centros de procesamiento superior en donde se integraría con información proveniente de otras modalidades sensoriales.

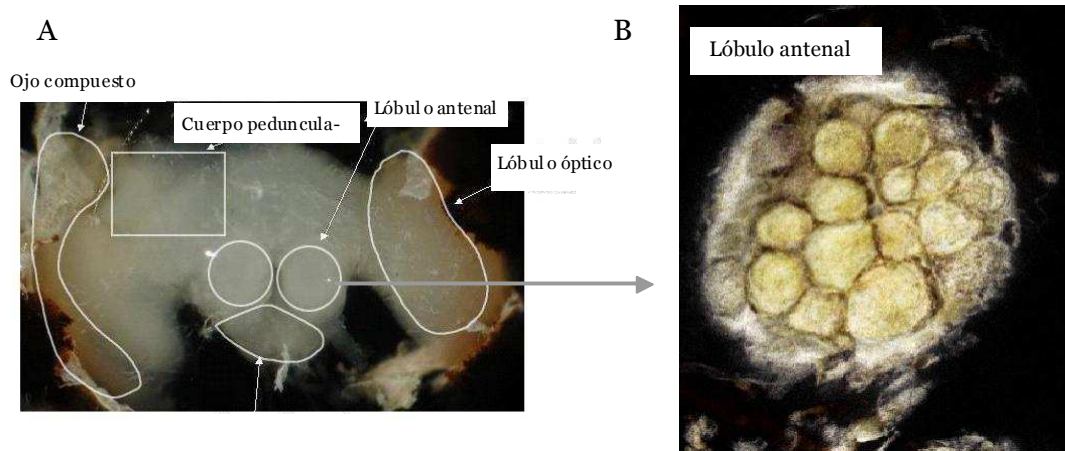


Fig. 1.3 A) Imagen de la anatomía del cerebro de una abeja adulta en donde se pueden observar los lóbulos antenales y otras estructuras. B) Imagen de la anatomía del lóbulo antenal izquierdo de una abeja adulta en donde se pueden observar varios de los glomérulos de la superficie.

Los cuerpos pedunculados son neuropilos pares del protocerebro que reciben información sensorial procesada desde regiones olfativas y visuales del cerebro, y entradas mecanosensoriales de la cabeza y antenas en una región de dendritas llamada el calyx. A

través de experimentos en los que se realizaron ablaciones o lesiones (Erber et al., 1980; Mizunami et al., 1993; De Belle y Heisenberg, 1994; Hammer y Menzel, 1995), los cuerpos pedunculados se han vinculado con el aprendizaje olfativo y en la formación de memorias de olores (Davis, 1993; Davis et al., 1995).

1.3.2 Maduración del sistema olfativo en insectos

Los insectos holometábolos sufren metamorfosis, en la cual la transición de larva a adulto ocurre durante un estadio pupal intermedio. En insectos como la mosca de la fruta, *Drosophila* o la abeja de la miel *Apis mellifera*, la larva es vermiforme con pocos rasgos externos. En su cerebro, la neurogénesis continúa activamente incluso después del estado embrionario permitiendo la formación de las estructuras sensoriales del individuo adulto durante el periodo de larva y pupa. Ejemplos de esto lo son las antenas y los ojos compuestos así como sus neuropilos asociados (por ej. Masson y Arnold, 1984; Masson y Mustaparta, 1990; Gascuel y Masson, 1991; Devaud y Masson, 1999). Otras regiones del cerebro como los cuerpos pedunculados también atraviesan cambios morfológicos drásticos durante el desarrollo del insecto (Menzel et al., 1994).

En la abeja, durante el desarrollo de la pupa, las neuronas olfativas de las antenas comienzan a diferenciarse elaborando dendritas en las sensilias inmaduras mientras sus axones comienzan a hacer blanco con neuronas ipsilaterales del LA. Si bien en los primeros estadios este neuropilo se presenta homogéneo, las primeras estructuras esféricas (los preglomérulos) se comienzan a observar en el estadio pupal 3 (Masson y Arnold, 1984). Estas subunidades van aumentando progresivamente en número conforme avanzan los estadios (Gascuel y Masson, 1991) alcanzando la apariencia del adulto en el estadio 7 [los glomérulos presentan una corteza y un núcleo central en un corte transversal (Gascuel y Masson, 1991)]. Curiosamente, en aquellos experimentos en donde se

ablacionaron las antenas durante el primer estadio pupal se observó que el LA permanece aglomerular (sin compartimentación) por el resto del desarrollo e incluso en el animal adulto (Malun et al., 1994).

Mientras que en algunos grupos de insectos las antenas se desarrollan durante el periodo larval, en muchos otros lo hacen durante la metamorfosis (Snodgrass, 1956). En ambos casos se desarrollan a partir de los discos imaginales. Los registros electrofisiológicos intracelulares realizados en la abeja pusieron de manifiesto que ni las NRO ni las neuronas de proyección presentan actividad eléctrica hasta alcanzados los estadios de pupa 6 ó 7 (Masson y Mustaparta, 1990; Devaud y Masson, 1999; Schröter y Malun, 2000). A pesar de que las antenas serían funcionalmente inactivas durante la pupa, jugarían un rol central en la organización del LA. En la polilla (*Manduca sexta*) la influencia de las antenas quedó bien ejemplificada al observar que una antena masculina en desarrollo trasplantada en una hembra huésped inducía la formación de los complejos macroglomerulares exclusivos de los machos (Rössler et al., 1999).

Si bien los circuitos del adulto se establecen durante la metamorfosis, existe evidencia de que podrían seguir siendo modificados incluso después de la eclosión del imago (Strambi et al., 1999). Cuando las antenas de un individuo adulto se evaluaron en un electro-antenograma, estas no alcanzaron los niveles de respuesta máximos sino hasta los 4 días de vida adulta. Esta idea también está avalada por el descubrimiento de que incluso abejas muy jóvenes (1 ó 2 días de edad) pueden evocar patrones de actividad glomerular, que aunque con intensidad menor y un número más bajo de glomérulos reclutados son específicos para cada olor (Wang et al., 2005).

En los insectos sociales como la abeja *Apis mellifera* o la hormiga carpintera *Camponotus floridanus* se han detectado cambios en el volumen del cerebro que correlacionan fuertemente con cambios en comportamiento asociados a la edad (Brandon

y Coss, 1982; Withers et al., 1993, 1995; Durst et al., 1994; Winnington et al. 1996; Fahrbach et al., 1998; Farris et al., 2001; Sigg et al., 1997; Brown et al., 2004, Gronenberg et al., 1996). En este sentido, varios autores postulan que el desarrollo de las habilidades para recolectar como lo son la navegación, la localización de una fuente en el espacio y posterior comunicación de esta información a otros miembros de la colonia, necesitan de un rango variable de entradas sensoriales que permitan la correcta maduración del sistema olfativo (Winnington et al. 1996, Maleszka et al. 2001, Farris et al. 2001). Sin embargo, aún se desconoce si las modificaciones en los circuitos del adulto están relacionadas con las primeras experiencias del animal. Más aun, está poco claro en la mayoría de los casos cómo y cuándo se adquieren las habilidades de aprender y retener memorias.

1.4 LA ABEJA *Apis mellifera*

La impresionante habilidad de la abeja melífera para regular sus funciones de acuerdo a los eventos que ocurren dentro o fuera del nido le permitió adaptarse en casi todos los ambientes del planeta (Michener, 2007). Dentro del nido, la enorme variedad de tareas e interacciones entre sus miembros ofrece una posibilidad única para estudiar los comportamientos que gobiernan a la sociedad de abejas. Además, su importancia como productor de miel, polen, propóleos, ceras, etc. y su enorme valor como agente polinizador la convierte en un modelo con relevancia económica.

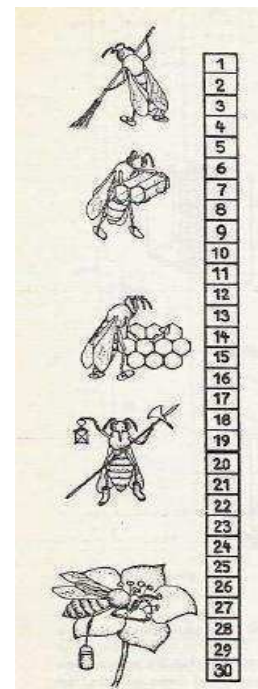
1.4.1 Organización de la colonia

Las abejas melíferas son insectos eusociales, es decir presentan división reproductiva del trabajo, cooperación en el cuidado de cría y presentan solapamiento de generaciones capaces de contribuir en la labor social. A nivel individual podemos

encontrar 3 tipos de miembros en la colonia: las obreras, los zánganos y la reina, cada uno con su propia especialización y lugar dentro de la sociedad (Wilson, 1971). La reina, provista de enormes ovarios, es el único individuo de la colonia capaz de poner huevos fecundados, una tarea poco variada pero esencial para la supervivencia y reproducción de la sociedad. La reina además de poder poner miles de huevos por día, es la principal responsable de mantener la cohesión de la colonia a través de sus potentes feromonas. Los zánganos representan el otro miembro sexual de la colmena cuya única función es aparearse con la reina, después de lo cual muere.

Las obreras por el contrario, realizan una serie de actividades que se organizan en torno a la edad (Fig. 1.4). Por este fenómeno llamado polietismo etario, los individuos de la casta obrera progresan en una secuencia de tareas programadas según avanzan en edad (Lindauer, 1952; Seeley, 1982; Winston, 1987).

Fig. 1.4. División de tareas en la abeja obrera según Lindauer (1952). Alrededor de los 17 días de vida las obreras comienzan con las tareas fuera del nido que por su complejidad requieren muy buenas habilidades cognitivas.



En esta división de tareas, las más jóvenes se encargan del cuidado de la cría y la reina y de la limpieza del nido, los de edad intermedia reciben y procesan el alimento que entra en la colmena y finalmente comienzan a realizar tareas en el exterior: recolectar recursos y defender el nido (Rösch, 1925; Lindauer, 1952). En condiciones naturales, el polietismo permite a la colonia realizar diversas tareas en forma simultánea y coordinada sin la necesidad de que existan jerarquías operativas (Winston, 1971).

1.4.2 Recolección de recursos en la abeja

El éxito de la abeja al adaptarse a casi todos los ambientes del planeta se debe en gran medida a sus estrategias de recolección. El polen y el néctar son las principales fuentes de energía para ella. El néctar lo es de hidratos de carbono, mientras que el polen de proteínas aunque también puede contener lípidos, vitaminas y minerales, etc. (Winston, 1987). Estos recursos se recolectan en su gran mayoría desde las flores y son almacenados en el interior de la colonia para ser utilizados durante el otoño e invierno cuando las flores ya no están disponibles o lo están en una proporción muy baja.

La búsqueda y recolección de alimento en una colonia de abejas es un proceso muy bien coordinado que requiere la transferencia de información entre sus miembros para que resulte eficiente. En este sentido, las claves olfativas juegan un rol muy importante durante la recolección de recursos como el néctar. Durante los vuelos de recolección, las abejas aprenden las claves olfativas de las flores que visitan lo que les permite orientarse y encontrar el recurso en los sucesivos ciclos de recolección. Sin embargo, esta información no es utilizada exclusivamente por las recolectoras que conocen la floración sino también por sus compañeras de nido que pueden percibir esos olores dentro de la colmena. Cuando las recolectoras regresan a la colonia y descargan el alimento recolectado sus compañeras de nido pueden aprender el olor presente en el néctar que se transfieren por contactos boca a boca o trofalaxias (Farina et al., 2005).

Por otro lado, si las recolectoras regresan de una fuente de alimento rica en néctar o polen, suelen desplegar entre sus compañeras un comportamiento estereotipado “la danza de reclutamiento”. La danza es una señal multimodal que: (i) atrae abejas del entorno que puedan recibir otros tipos de información, (ii) informa sobre la presencia de fuentes de alimento abundantes; (iii) activa memorias espaciales en seguidoras de danza, (iv) facilita la adquisición de información sobre olores florales; e (v) indica la localización

de la fuente de alimento en términos de dirección relativa al sol y distancia desde la colmena (Grüter y Farina, 2009).

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

A escala social, cuando el néctar aromatizado se distribuye dentro del nido, los olores que están diluidos en él pueden ser aprendidos no solo por abejas maduras sino también por abejas jóvenes que, aun envueltas en otras tareas, reciben el néctar aromatizado (Grüter et al., 2006). Estas memorias que se establecerían de forma asociativa, podrían modificar las preferencias recolectoras de abejas jóvenes cuando comiencen a realizar tareas en el exterior.

1.4.3 Las memorias en la abeja

En la abeja melífera un condicionamiento simple establece una traza mnésica bifásica con un primer componente no asociativo y luego otro asociativo que incluye la consolidación de la memoria (Menzel, 1999). Eventos de aprendizaje como este inician una secuencia de procesos que lleva a la formación de memorias de largo término (MLT): una traza mnésica fuerte y estable que perdura por varios días luego del aprendizaje y que es dependiente de síntesis de proteína (Menzel, 1999). Se cree que las memorias deben pasar

por varias fases transcientes, antes de consolidarse como MLT y permanecer accesibles para ser consultadas en el futuro. En la abeja, las distintas fases de la memoria se han estudiado exhaustivamente en el paradigma de REP (Menzel, 1999).

Tras un único evento de condicionamiento (CS/US) se observó que las memorias así formadas no persisten más que por algunos minutos y son sensibles a los tratamientos amnésicos (Menzel et al., 1974; Erber et al., 1980). Por el contrario la efectividad del condicionamiento para inducir MLT, aumentaba cuando los estímulos se presentan repetidas veces y si bien los niveles de respuesta encontradas son bajos para aquellas memorias establecidas con intervalos de tiempo cercanos a 3 minutos, aumentan considerablemente con intervalos mayores (Gerber et al., 1998).

En la abeja, se cree que las distintas fases de esta memoria están definidas según la secuencia de eventos durante su ciclo recolector (Menzel, 1999). La recolección de néctar es un comportamiento que presenta una estructura secuencial en donde distintos eventos de aprendizaje pueden estar separados por un rango de intervalos que van desde pocos segundos hasta semanas (Menzel, 1999). Cuando una abeja llega a un parche foral puede visita muchas flores similares mientras establece asociaciones entre sus características y la recompensa. En esta situación, en donde varios eventos de aprendizaje puedan ocurrir dentro de un mismo parche floral y donde los intervalos entre eventos son breves, se cree que la abeja establece memorias de corto término (también llamada memoria de trabajo), que le permitirían mantener una memoria activa durante el tiempo que permanece en el parche. Al agotar los recursos de un parche, la abeja puede viajar a otros en donde según las condiciones, las memorias establecidas anteriormente pueden ser reforzadas o alteradas. En este caso los intervalos entre eventos de aprendizaje serán mayores (entre parches) lo que se cree que da lugar a la formación de memorias de mediano plazo o corto plazo tardías. Estas memorias le permitirían a la abeja tomar decisiones entre lo similar o

diferente (Menzel, 1999) por ejemplo, al decidir si es conveniente permanecer en un parche distinto al previamente visitado o buscar otro similar. Por último, los eventos asociativos entre sucesivos ciclos de recolección (que pueden extenderse por horas o incluso días) darían lugar a MLT, una fase que en la abeja perdura por más de 72 h luego del aprendizaje.

1.5 OBJETIVOS

Debido al enorme repertorio de comportamientos que presentan los insectos sociales a lo largo de su vida adulta, éstos representan un modelo ideal para analizar el efecto de estímulos sensoriales a edades tempranas en su comportamiento posterior. Utilizando a la abeja de la miel como modelo experimental, nos propusimos como objetivo general entender la influencia de las experiencias tempranas ocurridas durante los primeros días del estadio adulta sobre las conductas ulteriores, involucrando incluso sus efectos a largo término. Consideramos experiencias tempranas a aquellas adquiridas a edad pre-forrajera, es decir mientras las obreras realizan tareas dentro del nido. Por otra parte estudiaremos sus efectos a muy largo término los cuales incluyen edades en las que las actividades fuera del nido son altamente probables. Para ello utilizamos abejas de 17 días de edad o más, que luego de sufrir distintos cambios anatómicos y fisiológicos en el sistema nervioso pero también en tejidos no neuronales, están preparadas para comenzar a realizar tareas de recolección en el campo (Robinson, 1992; Robinson y Vargo, 1997; Bloch et al., 2002).

Como primer objetivo particular nos propusimos estudiar cómo los olores florales aprendidos dentro la colmena pueden afectar las decisiones de las recolectoras (capítulo 2). En particular nos interesó saber si las experiencias olfativas previas adquiridas dentro de la colmena en un contexto apetitivo (cuando el olor se encuentra asociado directamente

al alimento y no al medio ambiente de la colmena) pueden sesgar las preferencias recolectoras en el campo mucho días después de la adquisición. Las preferencias recolectoras sesgadas por las experiencias ocurridas muchos días antes nos permitirían pensar de que no solo las recolectoras pero también las abejas pre-recolectoras son capaces de retener estas claves incluso antes de iniciar las actividad de forrajeo.

En el tercer capítulo nuestro objetivo fue determinar desde qué edad las abejas son capaces de establecer memorias olfativas susceptibles de ser recuperadas varios días después, cuando los individuos alcanzan la edad recolectora. Para ello nos planteamos evaluar bajo condiciones controladas de laboratorio la recuperación de memorias olfativas establecidas a diferentes momentos de la vida pre-forrajera de la abeja. Una vez más, abejas condicionadas olfativamente a edades tempranas: (1-4; 5-8; 9-12 ó 13-16 días de edad) fueron evaluadas a los 17 días de vida. Diferencias en la retención de las memorias olfativas de largo término establecidas en distintos momento de la vida de una abeja joven nos permitirían saber si existen periodos tempranos en donde la formación/retención de información de olores es más estable y resistente a la extinción que a otras. Teniendo en cuenta que en los insectos sociales el medio ambiente y las interacciones sociales que tienen lugar en la colmena son un factor esencial que puede modular las capacidades de adquirir y retener olores (Ichikawa y Sasaki, 2003), también analizamos el efecto de la interacción “edad de los individuos-ambiente social en el que se desarrollaron” sobre la retención de MLT adquiridas a distintas edades pre-forrajeras.

Como vimos anteriormente (1.2.1 y 1.2.2) muchos grupos de neuronas y neuropilos están bien descritos en el sistema olfativo de la abeja y permanecen relativamente accesibles durante el condicionamiento clásico. Esto permite relacionar distintos sustratos neuronales con eventos que ocurren durante el proceso de adquisición o de consolidación de las memorias. Aunque se ha demostrado que el condicionamiento olfativo puede alterar los patrones de actividad glomerular de los olores condicionados en el LA de abejas

forrajeras (Faber et al., 1999; Sandoz et al., 2003), hasta el momento se desconocía si estos patrones podían ser modificados a largo plazo después de un condicionamiento temprano (durante los primeros días de la vida adulta). Entonces, en el capítulo 4 nos propusimos investigar si los eventos de aprendizaje olfativo que tienen lugar durante la primera semana de vida son capaces de modificar funcionalmente la actividad cerebral de abejas maduras, por ejemplo, haciéndolo más respondedoras a los olores previamente experimentados o incluso a otros olores novedosos.

Finalmente nos preguntamos si las experiencias adquiridas a edades tempranas en el contexto apetitivo o incluso aquellas no asociadas a recompensa (exposición de olores en el ambiente) podrían afectar la retención de nuevos eventos de aprendizaje ocurridos a edades intermedias, un fenómeno aún no abordado en los insectos pero sí en vertebrados superiores e incluso sugerido en humanos (Neal, 1972; Bialystok, 2001). En otras palabras, nos planteamos estudiar el efecto de las experiencias tempranas sobre la retención de memorias que se establecieron a distintas edades después de haber sido estimuladas con olores asociados o no a recompensa. Una vez más estas memorias se evaluarán en abejas de 17 días de edad.

2

Los olores florales aprendidos dentro de la colmena afectan las preferencias recolectoras a largo plazo

2.1 INTRODUCCIÓN

Como vimos a lo largo de la introducción, los insectos dependen en gran medida de las claves olfativas para explorar su entorno durante la búsqueda de alimento. Estos procesos implican toma de decisiones que en muchos casos son flexibles y pueden ser influenciadas por las experiencias previas del animal (Ribbands, 1955; von Frisch, 1967; Giurfa et al., 1995). La importancia de una experiencia particular para modificar los comportamientos de recolección depende del contexto en el que se adquiere, determinando la fuerza y la durabilidad de la respuesta comportamental (Sandoz et al., 2000; Gerber et al., 1996).

En el contexto social de la colmena, los olores del néctar circulante pueden ser utilizados para reclutar a compañeras de nido hacia fuentes de alimento en el campo (von Frisch, 1967). Dada la capacidad de asociar olores con el alimento durante las interacciones sociales y sus consecuencias en la toma de decisiones durante la recolección (vea 1.4.2), planteamos la posibilidad de que una experiencia apetitiva dentro de la colmena (alimento aromatizado) pueda proporcionar suficiente información para guiar a las forrajeras en la búsqueda de alimentos hacia nuevos parches florales.

En trabajos anteriores, la eficiencia de utilizar solución azucarada aromatizada para sesgar la elección hacia un tipo floral sobre otros mostraron resultados muy variables (von Frisch, 1967; Free, 1969). Por lo tanto, realizamos un estudio cuantitativo en el que

analizamos el efecto de los olores del alimento sobre la búsqueda de recursos en el exterior.

En este capítulo mostramos que la toma de decisiones de las recolectoras pueden verse afectadas por las experiencias olfativas temprana dentro de la colmena. Para ello realizamos distintas series experimentales que nos permitieron concluir que luego de ofrecer solución de azúcar aromatizada dentro de las colmenas, las abejas sesgan sus preferencias recolectoras cuando se las evalúa en un dispositivo de elección dicotómica con dos olores (olor conocido vs. olor novedoso) o al cuantificar sus elecciones entre una fuente de alimento con el olor de la solución ofrecida y otra sin olor.

2.2 MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1 Animales experimentales y lugar de estudio

Para este experimento utilizamos tres colonias de abejas europeas *Apis mellifera* (C1, C2 y C3) ubicadas en el apiario del campo experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (34 ° 32'S, 58 ° 26'W). Las colmenas C1 y C2 fueron utilizadas en los experimentos en donde ofrecimos solución de azúcar aromatizada y evaluamos las respuestas en la situación “olor vs. olor”. La colmena C3 se utilizó para el experimento donde ofrecimos solución azucarada aromatizada y evaluamos las respuestas en una situación “olor vs. sin olor”.

Las colonias experimentales (C1, C2 y C3) se redujeron a colmenas de cuatro panales (alrededor de 10000 individuos), las que se mantuvieron con reservas de miel limitada para facilitar la aceptación del alimento artificial. Los experimentos se llevaron a cabo en jaulas de vuelo lo que impedía la interferencia de abejas de otras colonias durante los períodos de evaluación de nuestro experimento. Cada jaula de vuelo consistía en una estructura de madera rectangular (6 x 3 x 2 m) con un mosquitero de polietileno que

colgaba dentro (Fig. 2.1A), y contenía una colonia experimental fijada en uno de sus lados. Excepto durante los periodos de evaluación, las jaulas el vuelo permanecieron abiertas y las abejas pudieron recolectar libremente en el campo.

2.2.2 Estimulación olfativa

Para establecer una experiencia olfativa recompensa ofrecimos solución aromatizada dentro de cada colmena. Esto nos permitió condicionar a las abejas de forma simple y masiva. El alimento aromatizado se obtuvo mezclando 50 µl del olor puro por litro solución de sacarosa de 1.8 M que se ofreció en un alimentador de colmena (1,5 l; Fig. 2.1B) por un período de cuatro días consecutivos. Después de este tiempo, el alimentador (ya vacío) y junto con todos los panales de la colmena fueron reemplazados para evitar la contaminación con alimento artificial aromatizado durante los periodos de evaluación. Mientras que las colmenas C2 y C3 fueron estimuladas con solución de azúcar aromatizada con fenylacetaldehido (PHE), la colmena C1 lo fue con solución aromatizada con Linalool (LIO). Ambos olores son compuestos florales naturales (Knudsen et al., 1993 obtenidos de Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), (Tabla 2.1).

2.2.3 Entrenamiento

Los experimentos se llevaron a cabo en dos fases: una de entrenamiento y una de evaluación. Durante el entrenamiento, las abejas se adiestraron a recolectar en un alimentador artificial *ad libitum* (alimentador de entrenamiento) a seis metros de la

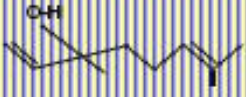
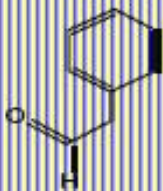
Grupo Funciona	Compuesto	estructura	Largo cadena C	Presión de vapor
Terpeno	Linaloo		10	
Aldehído	Fenilacetaldehído		8	

Tabla. 2.1. Grupos funcionales, estructuras químicas, longitud de la cadena de carbono y las presiones de vapor de los olores usados en el experimento. Los compuestos son olores florales (según Knudsen et al., 1993).

entrada de la colmena (dentro de la jaula de vuelo). Este alimentador, que contenía solución de azúcar 1.8 M sin aromatizar, se presentó por 30 minutos, cuatro veces por día, todos los días durante el período experimental. El mismo estaba ubicado en el medio de una plataforma de madera (1.6 metros de largo) orientada de forma perpendicular a la entrada de la colmena. Las abejas familiarizadas con las características del alimentador de entrenamiento (forma, tamaño, color y ubicación) fueron utilizadas para cuantificar las preferencias en la fase de evaluación.

2.2.4 Evaluación

En la fase de evaluación, el alimentador de entrenamiento fue retirado y reemplazado por dos alimentadores similares que se colocaron en los extremos de la plataforma (a 1.3 m uno del otro) y equidistantes de la colmena (fig.2.1B). Las abejas recolectoras que se aproximaban al centro de la plataforma de madera (en búsqueda de la

fuente de alimento ausente) fueron contadas según el alimentador de evaluación en el que elegían aterrizar. A medida que las abejas experimentales aterrizaban eran capturadas y eliminadas para evitar pseudorélicas. Los alimentadores de evaluación se presentaban cuatro veces por día durante 10 min, inmediatamente después de que el alimentador de entrenamiento era retirado. Los alimentadores de entrenamiento y de evaluación consistían en platos de acrílico (6.5 cm de alto, 4 cm de diámetro) invertidos sobre una placa del mismo material (10 mm de espesor, 5.5 cm de diámetro y con 16 ranuras, 1 x 1 x 10 mm; Fig. 2.1D), que ofrecía 1.8 M de solución de sacarosa sin aromatizar para facilitar la captura. Los alimentadores de evaluación se aromatizaron mediante placas de Petri de vidrio (1 cm de alto, 15 cm de diámetro) que contenían un círculo de papel de filtro (5.5 cm de diámetro) embebido con el olor (50 μ l de olor puro) colocado debajo de cada alimentador. La duración de la fase de evaluación y el protocolo utilizado para evaluar las preferencias recolectoras varió dependiendo del protocolo de evaluación usado en cada experimento ("olor vs olor" u "olor vs sin olor").

1.2.4.1 "Olor vs olor": Preferencias en un dispositivo con dos alimentadores aromatizados.

Este procedimiento se utilizó en el experimento 1. La evaluación se llevó a cabo entre las 3 y las 8 horas después de retirar los alimentadores (día 0) y posteriormente en los días 4, 8 y 11. Durante estos días registramos las preferencias hacia las fuentes de alimento aromatizadas con el olor ofrecido en el interior de la colmena (LIO en C1 y PHE en C2) o con un segundo olor que suponemos desconocido (PHE en C1 y LIO en C2, de ahora en adelante: olor novedoso). Como se puede apreciar el olor utilizado para perfumar la solución de azúcar de C1 fue el utilizado como el olor novedoso en C2. De este modo, pudimos comparar con seguridad los efectos de las experiencias olfativas sin necesidad de utilizar colonias no tratadas como unidades de control. Más aun, para minimizar las

variables ambientales ambas colmenas (C1 y C2) fueron evaluadas casi simultáneamente (2 días de diferencia).

2.2.4.2 “Olor vs no-olor”: Preferencias en un dispositivo con un alimentador aromatizado y otro sin aromatizar.

Utilizamos este procedimiento para evaluar las preferencias de recolección en la serie experimental 2. En este caso registramos las preferencias de forrajeo hacia un alimentador caracterizado por el olor previamente experimentado o por un alimentador sin fragancia. Acá las preferencias se analizaron a lo largo del tiempo: antes, durante y después de ofrecer el alimento aromatizado. Por otro lado, también registramos las preferencias de forrajeo en una situación control: cuando el alimentador presentaba un olor novedoso (LIO) contra un alimentador sin aromatizar. Ambos ensayos se realizaron de forma intercalada. Así, en un solo día de evaluación obtuvimos resultados para la situación PHE vs. alimentador sin aromatizar y LIO vs. alimentador sin aromatizar. Los ensayos se realizaron a intervalos regulares durante el experimento: 2 y 1 días antes, 2 y 4 días durante y 6 y 8 días después de la experiencia olfativa. A continuación, los registros obtenidos dentro de cada período se agruparon.

2.2.5 Estadísticas

En el experimento 1 las preferencias entre olores se analizaron con una prueba G de bondad de ajuste para observar si las proporciones entre los aterrizajes a LIO y PHE (Sokal y Rohlf, 1995) se desviaban significativamente de las frecuencias esperadas por azar (50% para cada alimentador). Por otra parte, las respuestas en el experimento 2, se analizaron mediante el uso del procedimiento de evaluación simultáneo de homogeneidad y bondad

de ajuste. Dado que en este experimento realizamos todas las comparaciones posibles entre los tiempos de evaluación (antes, durante y después), $\chi^2_{\alpha[(a-1)(b-1)]}$ como valor crítico.



Fig. 2.1 Las colmenas experimentales se montaron dentro de jaulas de vuelo (6 x 3 x 2 m) para impedir la interferencia de otras abejas durante los períodos de evaluación (A). Con el fin de establecer memorias olfativas asociadas a alimento, ofrecimos solución de azúcar aromatizada utilizando alimentadores de colmenas (B). Para cuantificar las preferencias recolectoras contamos la proporción de abejas que aterrizaron en un dispositivo de elección dicotómica (C). Este dispositivo se ubicó a 6 m de la colmena y consistía en dos alimentadores (D) los cuales estaban i) aromatizados con el olor utilizado para la estimulación (uno) y un olor novedoso (el otro) ó ii) aromatizados con el olor utilizado para la estimulación o un olor novedoso (uno) y sin aromatizar (el otro).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 “Olor vs olor”: Preferencias en un dispositivo de dos alimentadores aromatizados.

Después de ofrecer alimento aromatizado observamos preferencias por los olores utilizados durante la estimulación hasta el cuarto día en C1 y hasta 8 días después en C2; Fig. 2.2). Inmediatamente después de extraer las reservas de alimento aromatizado (<1 día), el número de aterrizajes en el alimentador aromatizado con el olor del alimento fue significativamente mayor que en el del olor novedoso (C1: $G = 7.835$, $P = 0.005$, $df = 1$, $N = 132$; C2: $G = 8.778$, $P = 0.003$, $df = 1$, $N = 104$; Prueba G de la bondad de ajuste; Fig. 2.2A).

Cuatro días después, las abejas continuaron prefiriendo los olores de la solución (C1: $G = 13.406$, $P < 0.001$, $df = 1$, $N = 65$; C2: $G = 19.289$, $P < 0.001$, $df = 1$, $N = 209$; Prueba-G de bondad de ajuste; Fig. 2.2A), respuesta que se extendió hasta el octavo día en la colonia tratada con LIO (C1: $G = 4.913$, $P = 0.026$, $df = 1$, $N = 184$; Prueba-G de bondad de ajuste; Fig. 2.2C) pero no con PHE (C2: $G = 0.758$, $P = 0.383$, $df = 1$, $N = 132$; G-Test de bondad de ajuste; Fig. 2.2C). En ningún caso se detectaron diferencias significativas para el intervalo de 11 días (C1: $G = 0.758$, $P = 0.493$, $df = 1$, $N = 173$; C2: $G = 0.758$, $P = 0.284$, $df = 1$, $N = 71$; G-Test de bondad de ajuste; Fig. 2.2D).

2.3.2 “Olor vs no-olor”: Preferencias en un dispositivo con un alimentador aromatizado y otro sin aromatizar.

En este experimento las preferencias recolectoras fueron analizadas en el tiempo: **antes**, **durante** y **después** de la estimulación. Una fuerte preferencia por la fuente de alimento sin fragancia se observó antes de la estimulación (Fig. 2.3) tanto para el olor de solución (PHE) como para el olor novedoso (LIO). En particular, dicho sesgo se mantuvo

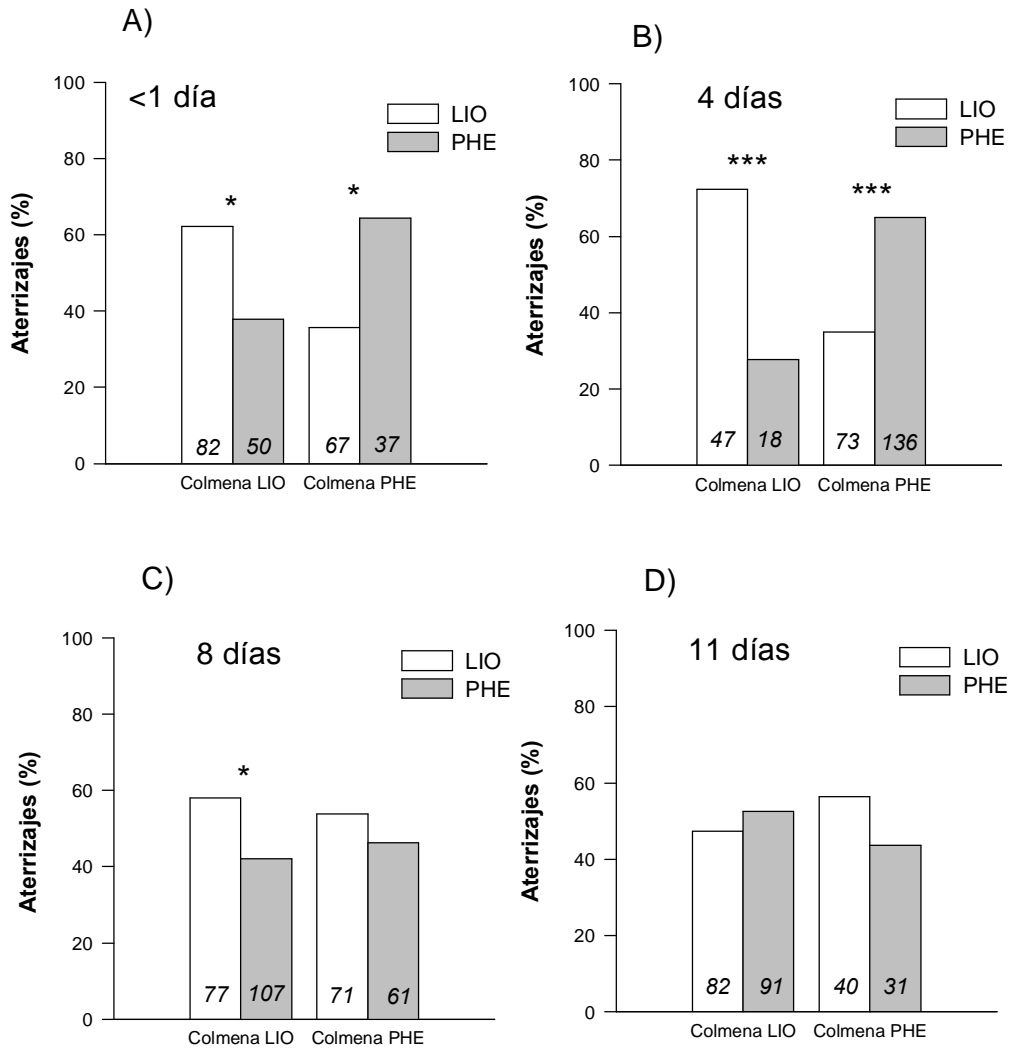


Fig. 2.2. Porcentajes de aterrizajes en cada uno de los alimentadores de evaluación a diferentes tiempos. A) Aterrizajes en 4 observaciones realizadas durante el primer día (<1 día), B) el cuarto día, C) el octavo día y D) el decimoprimer día. Los aterrizajes en los alimentadores aromatizados con LIO se presentan con barras blancas mientras que los de PHE con gris. El número de abejas que aterrizó en cada alimentador se muestra en la parte inferior de cada barra. Los asteriscos indican diferencias estadísticas en la prueba G de bondad de ajuste (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; ver los resultados para más detalles).

constante para el olor novedoso tanto antes, durante y después de la estimulación (Fig.2.3 B). Por el contrario la proporción de los aterrizajes hacia el olor de solución aumentó

gradualmente durante y después del tratamiento (Fig. 2.3). Para este caso encontramos diferencias estadísticas entre las respuestas obtenidas antes y después de la estimulación (H3: $G = 10.180$, $P = 0.006$, $df = 2$, $N = 222$; Prueba G de bondad de ajuste; Fig. 2.3A).

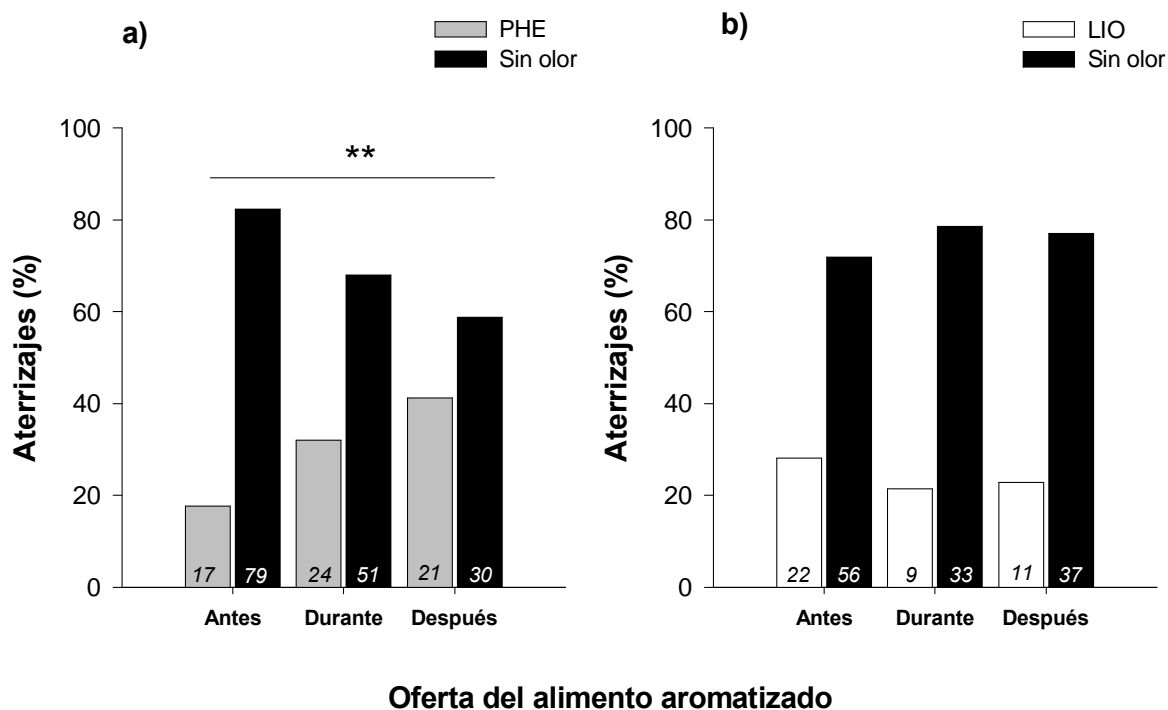


Fig. 2.3. Porcentajes de aterrizajes realizados por las abejas cuando la solución de azúcar aromatizada con PHE se ofreció dentro de la colmena, en cada uno de los alimentadores de evaluación para diferentes tiempos durante el experimento: antes (2 y 1 día antes de la experiencia olfativa), durante (2 y 4 días después de iniciar la experiencia y después de la experiencia (tres horas y 2 días después de eliminar el olor y sustituir todos los panales). A) Alimentador aromatizado con PHE vs alimentador sin aroma, B) Alimentador aromatizado con LIO (olor novedoso) vs alimentador sin aroma.

2.4 DISCUSIÓN

En este estudio mostramos que los aromas del alimento que circulan entre las compañeras de nido pueden modificar directamente los procesos de toma de decisiones. Consistentemente con trabajos anteriores (Farina et al., 2005; Grüter et al., 2006),

demostramos que las abejas pueden formar memorias olfativas dentro de la colmena durante la circulación de néctar aromatizado que pueden ser recuperadas más tarde fuera del nido y sesgar las preferencias recolectoras. La formación de estas memorias no depende de los mecanismos de reclutamiento que son comunes dentro de las colmenas (ver sección 1.4.2), ni tampoco de la presencia de reservas de alimento aromatizado que faciliten la recuperación de las memorias previamente adquiridas.

La estimulación con alimento aromatizado, ya sea ofrecida dentro o fuera de las colmenas, se ha utilizado para intentar dirigir a las abejas hacia determinados cultivos (von Frisch, 1967). En este sentido, sólo los resultados obtenidos por Free (1969) han mostrado una breve preferencia (30 min.) por recolectar en fuentes con el olor del alimento almacenado dentro del nido. Por el contrario, nuestros resultados mostraron una clara respuesta operante que se extiende por varios días después de la experiencia (cuatro días para PHE y ocho para LIO) incluso luego de eliminar las reservas de alimento que podrían contener este olor.

En el interior de la colmena, el aprendizaje asociativo entre el olor y la recompensa, podría haber ocurrido ya sea, durante la ingestión de la solución de azúcar desde el alimentador de colmena o durante los contactos boca a boca. Es importante mencionar en este punto que las memorias olfativas que se establecieron dentro de la colmena fueron retenidas por varios días a pesar de que las colonias tuvieron acceso a fuentes de alimento naturales (las jaulas de vuelo permanecieron abiertas durante casi todo el experimento). Esto implica que otras memorias olfativas, además de las establecidas de forma controlada, podrían haberse establecido durante el entrenamiento o incluso evaluación.

Debido a que las fragancias florales son especies específicas, la transferencia de información olfativa representa el componente más primitivo para la comunicación en abejas sociales. En abejorros, la recolectora exitosa ingresa a la colonia el olor de la fuente

recientemente descubierta pero no lo transfieren a sus compañeras de nido. por el contrario, lo descargan directamente en potes que más tarde son inspeccionados por otras recolectoras que adquieren información útil para encontrar la fuente de alimento. Esta forma de comunicación parece ser el origen evolutivo de la mayoría de los sistemas de comunicación compleja en los insectos sociales. De igual manera, los olores adquiridos dentro de las colmenas de *Apis mellifera* podrían ayudar a encontrar las fuentes de alimento más productivas en los alrededores, incluso cuando esta información no se encuentre acompañada de información espacial (1.4.3).

3

La edad y el medio ambiente interactúan en la retención de memorias olfativas tempranas

3.1 INTRODUCCIÓN

En las primeras etapas de la vida de un animal las experiencias pueden moldear de forma dramática y a veces irreversible su comportamiento adulto (Lorenz, 1935). Por otro lado, las experiencias cognitivas que ocurren a edades tempranas también parecen jugar un papel importante en la maduración de ciertos comportamientos en los mamíferos. En ratas se ha demostrado que varios factores como por ejemplo la manipulación pre-destete, la separación de la madre o los protocolos de evitación a edades tempranas pueden alterar los comportamientos ulteriores evaluados en diferentes paradigmas de aprendizaje (aprendizaje espacial: Cramer et al., 1988; Cornwell-Jones et al., 1988; Pryce y Feldon, 2003; aprendizaje de evitación: Cornwell-Jones et al., 1988; Gschanes et al., 1998; Schable et al., 2007; condicionamiento pavloviano apetitivo: Matthews y Robbins, 2003).

Aunque los insectos presenten un cerebro más simple que el de los mamíferos, también muestran respuestas conductuales plásticas frente a ciertas experiencias que ocurren a edades tempranas. Se observó que los comportamientos de insectos maduros se ven influidos por los estímulos que experimentan durante los primeros días de su vida adultas (Ichikawa y Sasaki, 2003). En los insectos sociales el medio ambiente que comparten con sus compañeros de nido representa un factor esencial para el desarrollo de las capacidades cognitivas (Ichikawa y Sasaki, 2003). En particular Ichikawa y Sasaki (2003) mostraron que abejas que habían permanecido aisladas de estímulos que

comúnmente se encuentran en la colmena tenían un efecto negativo sobre la retención de memorias olfativas. De esta forma demostraron que la ausencia de ciertas experiencias en un momento particular de la vida del insecto puede influenciar las respuestas comportamentales futuras. Por el contrario la presencia de ciertos estímulos a edades tempranas podría ser recordada varios días después, abriendo la posibilidad de que se formen memorias de largo plazo susceptibles de ser recordadas a edades maduras e incluso en un contexto diferente al cual se experimentó la primera vez.

En un determinado momento, la colmena está compuesta por obreras de distintas edades (ver sección 1.4.1) y con distintos grados de maduración del sistema olfativo (Ray y Ferneyhough, 1997). Es de esperar entonces que estos individuos presenten diferencias en la percepción sensorial y el procesamiento de estímulos ambientales, lo que sugiere que memorias olfativas adquiridas a distintas edades podrían no ser retenidas de igual forma. Utilizando el paradigma de REP determinamos si las experiencias olfativas adquiridas a diferentes edades tempranas de la vida adulta de la abeja (Pham-Delegue et al.; 1990; Bhagavan et al., 1994; Ray y Ferneyhough, 1997; 1999; Ben-Shahar et al., 2000; Laloï et al., 2001; Ichikawa y Sasaki, 2003) podían ser recuperadas varios días después, a edades en que las abejas comienzan a realizar tareas de recolección fuera del nido (Rösch, 1925; Lindauer, 1952; Seeley, 1982).

Además, estudiamos las posibles interacciones entre la edad en la cual las abejas experimentaron una estimulación olfativa y el contexto social en donde se desarrollaron: (a) cajas de abejas que se mantuvieron bajo condiciones controladas de laboratorio, (b) cajas que se mantuvieron dentro de colmenas comerciales, y (c) en condiciones de vuelo libre.

3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

Abejas jóvenes (*Apis mellifera* L) de la casta obrera fueron sometidas a diferentes procedimientos de condicionamiento, a fin de establecer experiencias olfativas recompensadas en un contexto apetitivo. Por un lado algunas abejas fueron condicionadas clásicamente bajo el paradigma de REP (Takeda, 1961; Bitterman et al., 1983), mientras que otras fueron condicionadas con un procedimiento alternativo: la oferta de solución de azúcar aromatizada.

3.2.1 Sitio de estudio y animales experimentales

Los experimentos se llevaron a cabo durante el verano de 2005 y 2006 en el campo experimental de la Facultad de Exactas y de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (34 ° 32'S, 58 ° 26'W). Las abejas que se utilizaron en los experimentos se obtuvieron a partir de panales de cría sellada colocados en una incubadora a 36 °C, 55% de HR y oscuridad (Fig. 3.1A y 3.1B). Obreras de 0 a 1 día de edad fueron recogidas en grupos de aprox. 150 individuos y confinadas en cajas de madera y plástico (10 cm x 10 cm x 10 cm) (Fig. 3.1C). Las mismas contaban con una malla perforada (mosquitero con orificios de aprox. 2 mm) que facilitaba intercambio con el medio que las rodeaba y permitía, en los casos en que las abejas se habían criado dentro de las colmenas (ver más abajo para más detalles), el intercambio de alimentos con individuos del exterior (Huang et al., 1998). Las abejas confinadas fueron alimentadas con solución de azúcar 1.8 M, agua y polen *ad-libitum*.

Con el objetivo de estudiar el papel de las experiencias tempranas a una edad en que las abejas normalmente pasan de realizar tareas en el interior del nido al exterior, las memorias establecidas precozmente fueron evaluadas a los 17 días (véase Rösch, 1925;

Lindauer, 1952; Seeley, 1982) edad hasta la cual se mantuvieron en una estufa (32 °C, 55% HR y oscuridad). Sólo en uno de los experimentos las jaulas de abejas se mantuvieron hasta alcanzar los 25 días.

En el experimento con abejas de vuelo libre (ver sección 3.2.3.4 para la explicación), los individuos recién emergidos fueron marcados con pintura e inmediatamente introducidos en las colonias en donde pasaron sus días hasta ser capturados para su evaluación varios días después.

3.2.2 Condicionamiento olfativo y evaluación

El aprendizaje olfativo se analizó en el paradigma de REP (Takeda, 1961; Bitterman et al., 1983; Fig. 3.1D). Para ello las abejas experimentales fueron anestesiadas a -4 ° C y amarradas con cinta aisladora en tubos de metal en donde solo podían mover sus piezas bucales y antenas. Antes de ser evaluadas, se las dejó descansar durante aproximadamente 2-3 horas en una estufa (32 ° C, 55% de humedad relativa y la oscuridad). Para realizar el condicionamiento y para evaluar las memorias olfativas, utilizamos un dispositivo electrónico que nos permitió controlar de forma precisa los tiempos entre estímulos, la duración de las presentaciones y sus volúmenes. Durante el condicionamiento o evaluación, este dispositivo entregaba un flujo constante de aire (50 ml/s) sobre la cabeza de la abeja por un tubo (1 cm de diámetro) situado a 2 cm de la abeja a través del cual se presentaba el olor. Para la estimulación colocamos 4 µl del olor puro sobre un papel de filtro (3 x 0.3 cm) que luego se dispuso dentro de una jeringa. A la vez este volátil se presentaba a través de un flujo de aire secundario (6.25 ml / s) que se inyectaba en el flujo de aire principal durante los periodos de estimulación. Un extractor de aire ubicado a 20 cm detrás de las abejas extraía los olores para evitar su acumulación en el ambiente. Cada ensayo duraba 40 segundos y estaban separados entre sí por periodos de 15 min. Antes de

la presentación del olor, las abejas permanecían durante 15 s en el flujo de aire para familiarizarse con el dispositivo, así también como para evaluar su respuesta ante la estimulación mecánica. Durante los condicionamientos clásicos, el EC se presentaba por 6 s y la recompensa (solución de azúcar 1.8 M) durante 3 s, 3 s después de la presentación del EC. En cada ensayo, se examinó la REP durante los 3 primeros segundos de la presentación del olor.

Sólo aquellas abejas que mostraron respuesta incondicionada (RI) al tocar las antenas con la solución de azúcar 1.8 M y que no respondieron al estímulo mecánico (flujo de aire) fueron estudiadas.

3.2.3 Procedimiento experimental

3.2.3.1 Condicionamiento clásico en abejas de laboratorio

Para establecer experiencias olfativas de forma controlada y en un contexto apetitivo, grupos de abejas pre-recolectoras fueron condicionadas clasicamente a distintas edades: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 ó 16 días. Para ello utilizamos Linalool (LIO) como EC durante tres ensayos de aprendizaje en el paradigma de REP (Fig. 3.2A; Véase más abajo para la descripción). Los individuos que fueron condicionados con éxito dentro de un mismo grupo etario (es decir que respondieron al EC, al menos cuando fue presentado al comienzo del tercer ensayo de condicionamiento) fueron desamarrados (sin ser anestesiados) y confinados nuevamente en jaulas (8 x 8 x 3 cm). Aquellas abejas que no fueron condicionadas con éxito se excluyeron del análisis. Las abejas condicionadas tempranamente fueron nuevamente amarradas a los 17 días de edad y evaluadas en el paradigma de REP frente a una única presentación de LIO (olor condicionado) y Fenilacetaldedo (PHE; como olor novedoso).

Con el fin de aumentar el tamaño de la muestra y reducir el número en comparación entre grupos de distintas edades, las respuestas de grupos consecutivos se agruparon (2/4, 6/8, 10/12, 14/16 días de edad). Luego, los niveles de respuesta se compararon entre los grupos resultantes y contra con el grupo control (grupo criado bajo las mismas condiciones experimentales que no fue condicionado).

3.2.3.2 Oferta de alimento aromatizado en abejas de laboratorio

La oferta de alimento aromatizado fue utilizada como un procedimiento alternativo para establecer asociaciones entre el olor y el alimento (Farina et al., 2005; 2007; Gil y De Marco, 2005; Grüter et al., 2006). Como vimos en el capítulo anterior este procedimiento garantiza la formación de memorias de largo término mientras reduce la manipulación sobre los individuos a ser condicionados (Farina et al., 2005, Gil y De Marco, 2005).

Para esto ofrecimos de forma ininterrumpida por un lapso de cuatro días alimento aromatizado en distintos períodos tempranos de la vida de la abeja: entre los 1-4, 5-8, 9-12 ó 13-16 días de edad (Fig. 3.2B). Para esto ofrecimos de forma ininterrumpida por un lapso de cuatro días alimento aromatizado en distintos períodos tempranos de la vida de la abeja: entre los 1-4, 5-8, 9-12 ó 13-16 días de edad (Fig. 3.2B). Estas ventanas temporales fueron elegidas arbitrariamente. No obstante, representan períodos bien definidos en los que los cambios anatómicos y funcionales en la abeja melífera interactúan con el desarrollo de las actividades sociales dentro de la colmena. Inmediatamente después de la emergencia, la abeja obrera apenas realiza tareas [al menos durante las 24-48 horas en la edad adulta (Rösch, 1925; Lindauer, 1952; Seeley, 1982)], mientras que su sistema olfativo se encuentra todavía en desarrollo. Una semana después de la emergencia, las obreras cuidan activamente a la cría y realizan tareas de mantenimiento y limpieza del nido, en ese momento, la maduración del sistema olfativo está finalizando. Abejas de mediana edad (es

decir, 9-12 días de vida) se desempeñan como procesadoras de alimento manipulando y almacenando el néctar en el interior de la colmena, mientras que la maduración de sus circuitos olfativos ya está completa (Masson et al., 1993; Winnington et al., 1996; Farris et al., 2001). Aquellas abejas de 13-16 días de edad también envueltas en tareas de procesamiento de néctar (principalmente trabajando en el área de descarga) también pueden ser vistas realizando sus primeros viajes de forrajeo.

A estas edades, el alimento sin aroma que estaba constantemente presente dentro de las jaulas fue sustituido por una solución aromatizada con LIO o con PHE. Para ello se diluyeron 50 µl de olor puro por litro de solución de azúcar (1.8 M) que representa la concentración de olor más baja detectada para obtener una respuesta comportamental conspicua; Gil y De Marco, 2005). Dicha solución se ofreció a través de tubos plásticos (10 ml de volumen) que presentaban un orificio en su extremo (1 mm de diámetro) por el cual las abejas ingerían el alimento aromatizado.

La recuperación de las memorias olfativas establecidas en los distintos grupos experimentales fue evaluada en el paradigma de REP cuando las abejas experimentales alcanzaron los 17 días de edad (Fig. 3.2 B). En un diseño cruzado, cuando un olor (LIO o PHE) era ofrecido en la solución como olor condicionado el otro (PHE o LIO) era evaluado como olor novedoso. Las REP obtenidas para los olores de la solución fueron comparadas entre grupos y contra el control.

Para descartar la posibilidad de que la variación en el comportamiento observado a distintas edades se deba a la longitud del intervalo entre el condicionamiento y la evaluación (y no a la edad en que ocurrió la experiencia olfativa), añadimos un nuevo experimento donde las abejas estimuladas entre los 13 y 16 días de edad se evaluaron a los 25 días de edad. En este caso utilizamos PHE para aromatizar la solución de azúcar. Las REP obtenidas se compararon contra las obtenidas en un grupo control de 25 días de edad.

De esta manera presentamos los niveles de retención de memorias establecidas a los 13-16 días de edad al ser evaluados con un intervalo de estimulación-evaluación corto (1-4 días) o largo (9-12 días).

Con el objetivo de determinar si la heterogeneidad del medio ambiente en donde se desarrollaron las abejas afectaba los niveles de REP a los 17 días de edad, distintos grupos experimentales fueron expuestos a diferentes condiciones ambientales: (a) experimental controlada, en donde las abejas enjauladas se mantuvieron en una estufa a 32 °C, 55 % HR y oscuridad hasta el día en que fueron evaluadas, y (b) de colmena, en donde las jaulas de abejas se introdujeron dentro de colonias hospedadoras. Estas colonias (aproximadamente 40.000 individuos) brindaban a los individuos experimentales un medio ambiente más natural en el cual desarrollarse (claves física, visual y señales químicas que probablemente estaban ausentes en condiciones de laboratorio).

En este experimento utilizamos 10 colonias hospedadoras. Cada una de ellas podía contener hasta tres jaulas alimentadas con el mismo olor. Las jaulas se ubicaron en el interior de la colmena entre dos cuadros que contenían cría, miel y polen. A pesar de que las abejas experimentales recibieron alimentación artificial dentro de las jaulas, también existe la posibilidad de que hayan intercambiado alimento con el exterior a través de la malla lateral de las jaulas. Cada jaula de abejas confinada en una colonia hasta el final de la oferta de alimento aromatizado fue luego trasladada a otra colmena hasta su evaluación. Esta práctica impidió la circulación de alimento aromatizado, que podría haber sido transferido desde las jaulas al nido, durante los periodos de no estimulación. En cada colonia hospedadora las jaulas fueron introducidas secuencialmente de tal manera que en un instante determinado grupos con distintos tratamientos podían ser estimulados al mismo tiempo con la misma solución de azúcar aromatizada, restringiendo así la presencia del aroma a un período de cuatro días. Los distintos grupos de edad fueron asignados al

azar entre las colonias hospedadoras.

3.2.3.3 Múltiples experiencias olfativas en abejas de laboratorio

Siguiendo un protocolo similar al utilizado en series anteriores nos propusimos analizar la retención de memorias formadas por experiencias precoces después de haber recibido varios olores en el alimento durante su vida. Cada grupo de abejas fue sometido a cuatro soluciones de azúcar aromatizadas con diferentes olores: LIO; PHE; nonanal (NONA), y 2-Octanal (2-OCTA). Con el fin de asegurarnos de que todos los olores sean ofrecidos en todas las ventanas temporales y así descartar un efecto entre identidad del olor y la edad, utilizamos una única secuencia aleatoria en la que ofrecimos los olores en los distintos tratamientos (LIO; PHE; NONA, y 2-OCTA). Sin embargo, mientras que algunos tratamientos comenzaban siendo alimentados con solución con LIO, otros con PHE, NONA o 2-OCTA (Fig. 3.2C). El grupo de abejas control fue alimentado con solución sin fragancia durante todo el período experimental.

La secuencia de olores utilizada para la estimulación también fue utilizada durante la evaluación. Para ello cada jaula de abejas se separó en cuatro subgrupos que fueron evaluados con cada variante. Haciendo esto, pudimos cuantificar el patrón de REP para cada olor experimentado por las abejas sin embargo y con fines prácticos solo reportamos las respuestas obtenidas frente a LIO y frente a PHE.

3.2.3.4 Oferta de alimento aromatizado en abejas de vuelo libre

Con el fin de analizar la formación de la memoria en una situación más natural, grupos de abejas jóvenes fueron sometidos a una experiencia olfativa particular ofrecida dentro de la colonia durante períodos específicos de su vida pre-recolectora. Dos colonias experimentales, colmena 1 (C1) y colmena 2 (C2), se redujeron a colmenas de cuatro

cuadros tipo Langstroth (alrededor de 10.000 individuos en cada una) con reservas de miel limitadas para facilitar la aceptación del alimento artificial (también ver sección 2.2.1). El alimento aromatizado se ofreció intercambiando un cuadro lateral de la colmena por un alimentador plástico con capacidad para 1.5 l. Mientras que C1 fue alimentada con solución aromatizada con LIO (50 ml de olor por litro de solución 1.8 M), el alimento de C2 se aromatizó con PHE. Con este procedimiento ofrecimos solución de azúcar aromatizada a todas las abejas de nuestras colonias experimentales durante cuatro días consecutivos. A la vez establecimos experiencias olfativas de forma controlada en dos grupos de abejas de edad conocida. Estos grupos (alrededor de 500 abejas recién emergidas) fueron marcados con pintura acrílica para poder ser identificadas posteriormente de acuerdo a su edad. Los mismos se introdujeron en cada colmena (C1 y C2) con un intervalo de ocho días de modo que ambos grupos estuvieron expuestos a una única estimulación olfativa pero a diferentes edades (Fig. 3.2D). Mientras que las abejas que experimentaron la solución de azúcar durante los 5-8 días de edad fueron marcadas con verde, las abejas estimuladas controladamente a los 13-16 días de edad se marcaron con rojo. Después de los cuatro días consecutivos de estimulación con el alimento aromatizado todos los cuadros de la colmena fueron retirados y sustituidos por otros pertenecientes a colmenas comerciales de nuestro apiario. Esto permitió eliminar los remanentes de alimento con olor que pudieran haber quedado almacenados dentro de la colmena luego de la estimulación.

Las abejas marcadas que entraban a las colmenas fueron capturados desde la entrada al alcanzar los 17 días de edad. Como consecuencia, ambos grupos de edad se evaluaron en momentos diferentes. El grupo que recibió alimento con olor a los 13-16 días de edad se evaluó inmediatamente después de eliminar las reservas de alimento artificial (E1) mientras que el grupo de 5-8 días, se evaluó nueve días más tarde (E9; Fig. 3.2D). Ya que nuestro objetivo era mostrar que los niveles de retención de memorias tempranas no dependen del tiempo sino de la edad, los niveles de REP fueron comparados entre abejas

de edad conocida y abejas de edad desconocida capturadas y evaluadas en E1 y E9 (Fig. 3.2D). En estas abejas la experiencia olfativa artificial podría haber ocurrido en cualquier momento de su vida pre-recolectora e incluso recolectora.

Como en los experimentos anteriores, la retención de las memorias olfativas fue evaluada bajo el paradigma de REP con LIO como olor condicionado en C1 y PHE en C2. Del mismo modo, PHE fue utilizado como olor novedoso en C1 y LIO en C2.

3.2.4 Estadísticas

Dado que el objetivo del estudio fue comparar las respuestas comportamentales entre los distintos grupos etáricos, aplicamos una prueba de G sobre las proporciones de REP (Sokal y Rohlf 1995). Las proporciones de REP obtenidas para el olor condicionado exclusivamente, (sin incluir aquellas respuestas al olor novedosos ni a ambos olores), fueron analizadas con un procedimiento de evaluación simultánea en donde pudimos evaluar todos los pares de comparaciones posibles. Para ello utilizamos $\chi^2_{a[(a-1)(b-1)]}$ como valor crítico constante para todas las comparaciones, en donde a es igual a 2 y b es el número de tratamientos implicados en cada experimento. Siempre que fue posible, las respuestas obtenidas para ambos olores condicionados se agruparon después de comprobar que no existían diferencias estadísticas (prueba G entre grupo de estimulados a la misma edad).

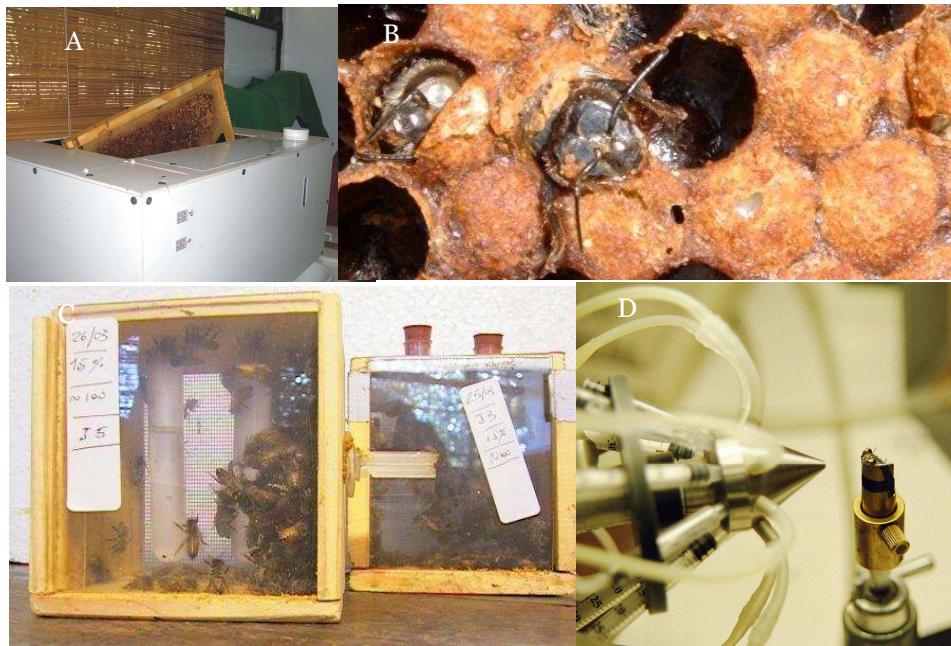


Fig. 3.1. Con el fin de controlar las experiencias olfativas de las abejas durante toda su vida, se colectaron individuos recién emergidos desde una incubadora A) y B), manteniéndolos en cautiverio bajo condiciones controladas C). A los 17 días de vida, las abejas fueron preparadas para ser evaluadas en el protocolo de REP D).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Condicionamiento clásico en abejas de laboratorio

La figura 3.3A y 3.3B muestra el porcentaje de abejas que extendió la probóscide como respuesta incondicionada (RI) al azúcar y el porcentaje de abejas condicionadas con éxito en tres ensayos de aprendizaje. En ningún caso se encontraron diferencias estadísticas entre las clases de edad (Prueba G para las RIs: $\text{GH} = 13.638$, $p = 0.058$; $N = 818$; $\text{df} = 7$ y para el porcentaje de individuos condicionados con éxito: $\text{GH} = 8,405$; $p = 0.298$; $N = 439$; $\text{df} = 7$). Hay que tener en cuenta que la disminución en el tamaño de la muestra entre las figuras 3.3A y 3.3B se explica no sólo por la exclusión de las abejas que no respondieron durante el condicionamiento, sino también por aquellas que presentaron respuestas espontáneas durante la primera presentación del olor o que respondieron frente al estímulo mecánico (flujo de aire).

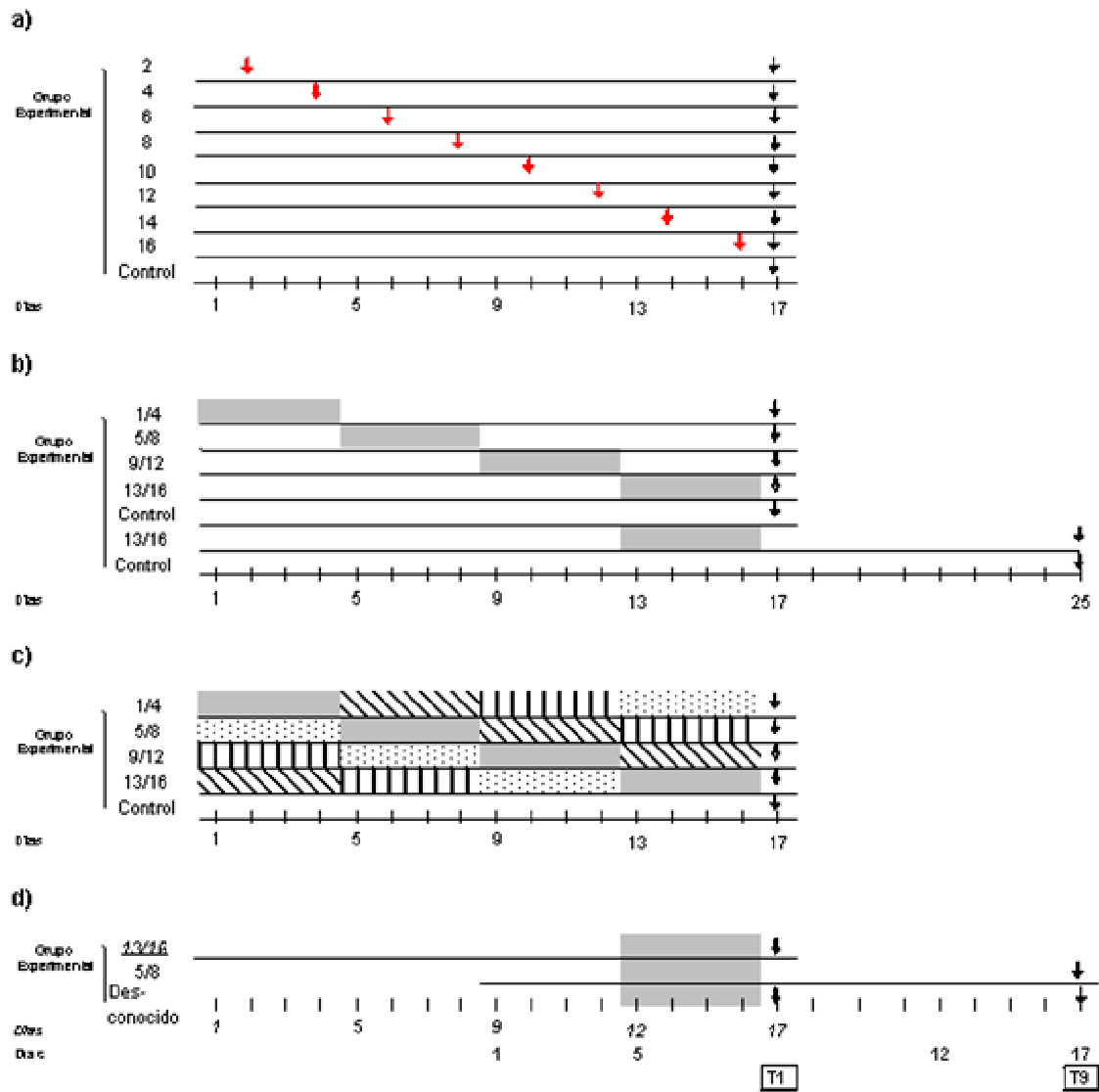


Fig. 3.2. Esquema de los distintos protocolos de estimulación a lo largo de la vida de la abeja para las diferentes series experimentales. a) Abejas de laboratorio que fueron condicionadas clásicamente a distintas edades (flecha roja). Las memorias olfativas se evaluaron a los 17 días (flechas negras) en el mismo contexto comportamental (REP). b) Abejas criadas en el laboratorio (o dentro de colmenas hospedadoras) que recibieron solución de azúcar aromatizada durante cuatro días consecutivos (recuadros de color gris) y fueron evaluadas a los 17 ó 25 días de edad en el paradigma de REP (flecha negra). c) Abejas criadas en el laboratorio sometidas a experiencias olfativas múltiples a lo largo de su vida (cajas grises, con líneas y punteadas). d) Abejas de vuelo libre que recibieron una solución aromatizada dentro de la colmena durante un periodo en el cual dos grupos de abejas marcadas presentaban 5-8 ó 13-16 días de edad. Una vez que estos grupos alcanzaron la edad de 17 días (E1 y E2) fueron capturadas y evaluadas (flecha negra). Adicionalmente evaluamos los niveles de RC de abejas con edad desconocida.

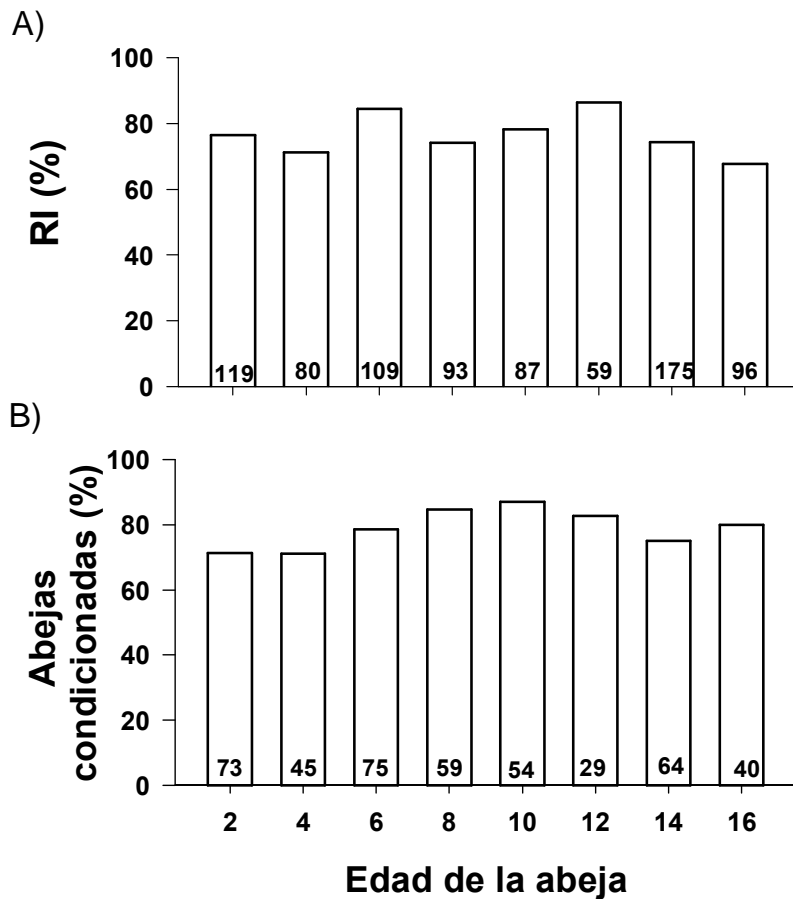


Fig. 3.3 Respuesta incondicionada (RI) y aprendizaje en función de la edad de la abeja. A) Porcentaje de obreras que presentó la RI (reflejo de extensión de la probóscide después de la aplicación de solución de sacarosa 1.8 M en las antenas a diferentes edades. B) Porcentaje de abejas que fueron exitosamente condicionado a LIO a diferentes edades.

Cuando las memorias de las abejas condicionadas tempranamente fueron evaluadas a los 17 días de edad, encontramos respuestas heterogéneas entre las clases de edad (prueba G en 2/4, 6/8, 10/12, 14/16 días de edad y el Control: $GH = 16.229$, $p = 0.002$, $N = 175$, $df = 4$; Fig. 3.4). Después de realizar las comparaciones múltiples observamos que la proporción de abejas que extendían su probóscide frente al olor condicionado no difirió significativamente entre edades. Sin embargo el grupo de las abejas condicionado a los 6/8 días de edad sí mostró diferencias con el control (véase la Fig. 3.4). En todos los casos, las abejas condicionadas mostraron bajos niveles de respuestas al olor novedoso (PHE) (Fig. 3.4).

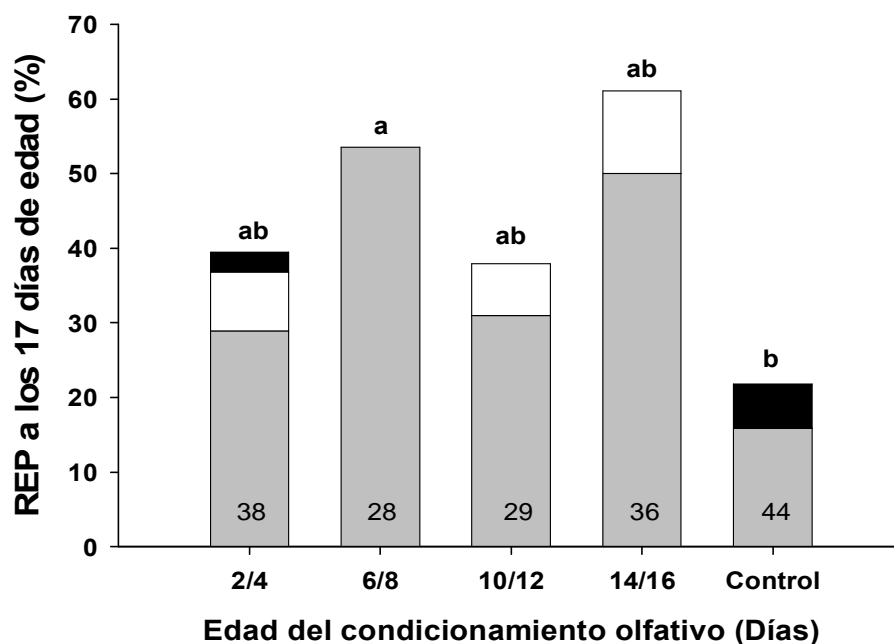


Fig. 3.4 Retención de las memorias olfativas adquiridas en el condicionamiento clásico a distintas edades. Después del condicionamiento, las abejas fueron devueltas a sus jaulas y se mantuvieron en las incubadoras hasta la evaluación (véanse los detalles en el texto). Las clases de edad fueron agrupados de a dos (2 / 4, 6 / 8, 10/12, 14/16 días de edad). La REP al olor aprendido (LIO) se presenta en gris (■), y al olor novedoso (PHE) en blanco (□), y a ambos en negro (■). Los grupos con diferentes letras difieren significativamente con un $P < 0.05$. El tamaño de la muestra se presenta en la parte inferior de cada barra.

3.3.2 Oferta de alimento aromatizado en abejas de laboratorio

Las experiencias olfativas tempranas establecidas tras la oferta de solución de azúcar aromatizada (Fig. 3.5) mostraron perfiles de REP similares a los observados previamente en abejas que aprendieron el olor en un condicionamiento clásico (Fig. 3.4). Las diferencias estadísticas entre abejas condicionado a LIO y PHE a los 5-8 días de edad no permitieron agrupar los datos (prueba G: $\text{GH} = 13.264$, $p < 0.001$, $N = 160$ $\text{df} = 1$) sin embargo encontramos diferencias significativas entre los grupos etáricos en ambas series experimentales (prueba G: $\text{GH LIO} = 55.778$, $p < 0.001$, $N = 366$, $\text{df} = 4$; $\text{GH PHE} = 40.811$, $p < 0.001$, $N = 392$, $\text{df} = 4$). Los grupos de abejas que experimentaron LIO en el alimento a los 5-8 y 13-16 días de edad presentaron niveles de respuesta homogéneos, pero difirieron de las abejas estimuladas a los 9-12 días de edad (prueba G: $\text{GH LIO} = 13.132$, $p = 0.034$, N

= 225; df = 4).

Las respuestas de abejas alimentadas con solución aromatizada durante los primeros días de vida (1-4 días de edad) también presentaron diferencias con el control (prueba G: GH LIO = 9,912, $p = 0.041$, $N = 141$, $df = 4$; Fig. 3.5A). Por otro lado, las abejas alimentadas con solución con PHE a los 5-8 y 13-16 días de edad presentaron niveles de REP homogéneos, pero diferente del resto de los grupos. En particular encontramos que este grupo difirió del grupo estimulado a los 9-12 días de edad (prueba G: GH PHE = 16.108, $p = 0.002$, $N = 275$, $df = 4$; Fig. 3.5B) y que los grupos estimulados a 1-4 y 9-12 días de edad, si bien fueron homogéneos con el control, difirieron del grupo 5-8 (prueba G: GH PHE = 19.823, $p < 0.001$, $N = 217$, $df = 4$).

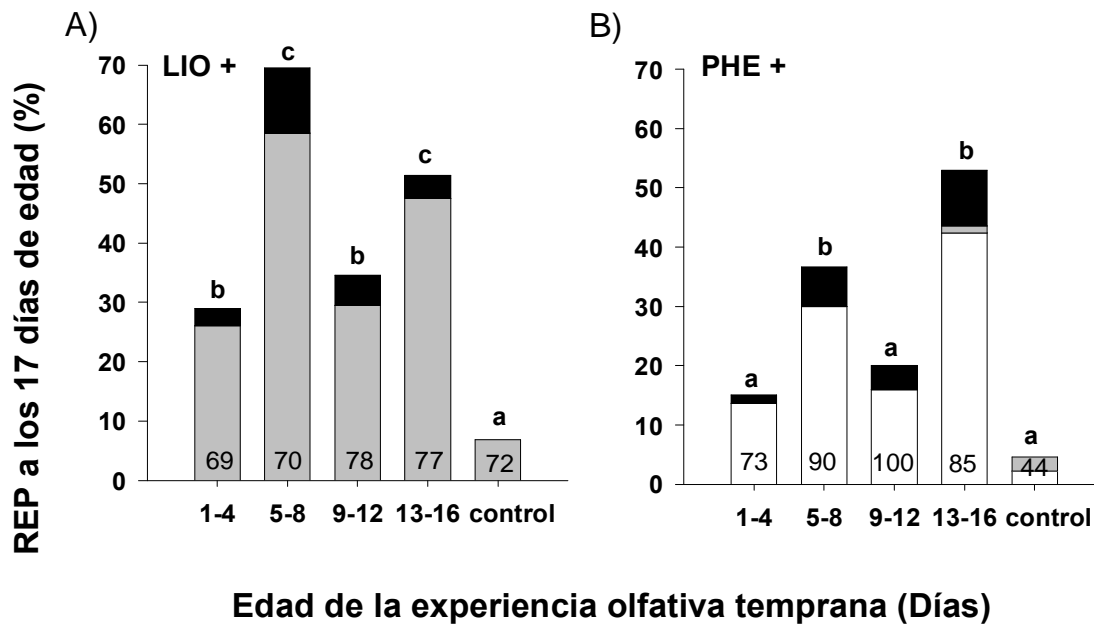


Fig. 3.5 La respuesta de extensión de probóscide (REP) en abejas enjauladas criadas en laboratorio que fueron alimentadas durante 4 días con solución de azúcar aromatizada. A) LIO como el olor diluido en la solución de azúcar (■), PHE como olor novedoso (□), y las respuestas suscitado por ambos olores (■). B) PHE como olor diluido en la solución de azúcar y LIO como novedoso. Letras diferentes indican diferencias significativamente con $P < 0.05$. El tamaño de las muestras se presenta en la parte inferior de cada barra.

Cuando evaluamos la habilidad de retener información a largo plazo de abejas estimuladas a los 13-16 días de edad encontramos diferencias significativas en los niveles de respuesta. Los porcentajes de REP obtenidos en abejas de 25 días de edad alimentadas con solución de azúcar aromatizada con PHE alcanzaron niveles de 54.43% mientras que los grupos control de 1.92% (prueba G: GH PHE = 40.088, $p < 0.001$, $N = 97$, $df = 1$). En consecuencia, y ya que los grupos evaluados a los 17 y a los 25 días de edad presentaron niveles de respuesta similares (42.4 y 54.4% respectivamente), podemos descartar que las respuestas obtenidas en abejas estimuladas a los 13-16 días de edad se deban solamente a un intervalo corto entre la adquisición y la evaluación.

3.3.3 Oferta de alimento aromatizado en abejas criadas dentro de colmenas

En la Figura 3.6 se muestran las REP de abejas criadas en jaulas dentro de colmenas hospedadoras. La ausencia de diferencias entre las respuestas de abejas alimentadas con soluciones aromatizadas con LIO y PHE nos permitieron agrupar los resultados de ambas series (prueba G: GH 1-4 = $-1E-13$, $p = 1$, $N = 76$, $df = 1$; GH = 5-8 0.970 , $p = 0.324$, $N = 88$, $df = 1$; GH 9-12 = 1.988 , $p = 0.158$, $N = 92$, $df = 1$; GH 13-16 = 1.493 , $p = 0.221$, $N = 82$, $df = 1$; GH control = 0.043 , $p = 0.835$, $N = 105$, $df = 1$). Luego, encontramos diferencias significativas entre grupos que experimentaron el olor a distintas edades (prueba G: GH agrupado = 57.198 , $p < 0.001$, $N = 451$, $df = 4$, Fig. 3.6). Las comparaciones mostraron que aquellas abejas expuestas al alimento aromatizado durante los primeros días de su vida adulta (1-4) resultaron homogéneos con el control pero difirieron de los grupos estimulados a los 9-12 días de edad. El resto de los tratamientos presentaron niveles de respuesta significativamente mayores (prueba G: GH agrupado = 33.202 , $p < 0.001$, $N = 281$, $df = 4$). Por otra parte, se detectó homogeneidad para las

respuestas de los grupos 5-8, 9-12 y 13-16 (prueba G: GH agrupado = 0.498, $p = 0.973$, $N = 262$, $df = 4$; Fig. 3.6). Como resultado general, obtuvimos diferencias significativas entre el grupo control y 1-4 y aquellas que aprendieron el olor a los 5-8, 9-12 y 13-16 días de edad (Fig. 3.6).

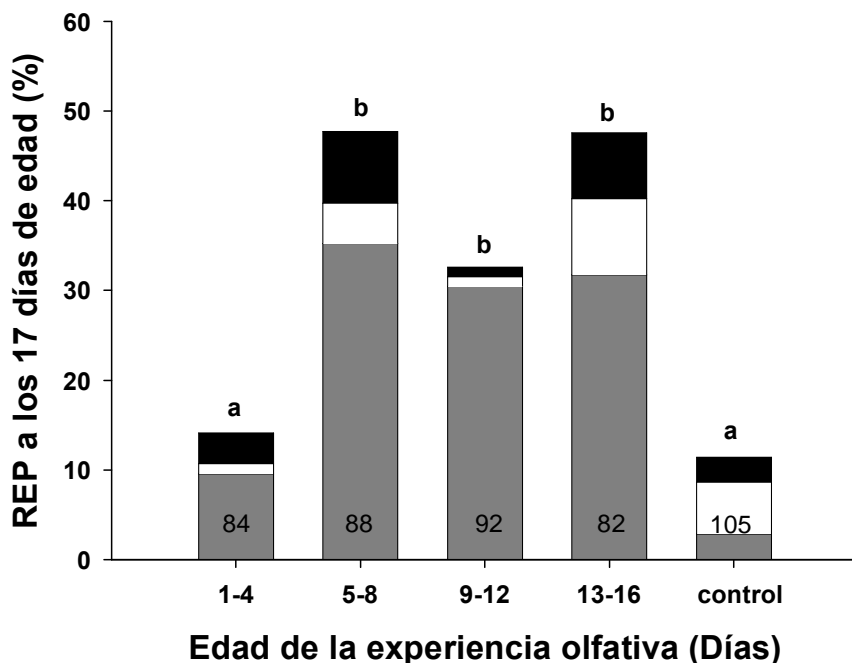


Fig. 3.6 La respuesta de extensión de probóscide (REP) en abejas enjauladas criadas en el interior de una colmena que fueron alimentadas durante 4 días con solución de azúcar aromatizada. Olor diluido en la solución de azúcar (■), olor novedoso (□), y las respuestas suscitado por ambos olores (■). Letras diferentes indican diferencias significativas con $P < 0.05$. El tamaño de las muestras se presenta en la parte inferior de cada barra.

3.3.4 Retención en abejas que recibieron múltiples experiencias olfativas en laboratorio

Las respuestas de extensión de probóscide de las dos series experimentales no mostraron diferencias estadísticas (prueba de G: GH 1-4 = $9.5E-1$, $p = 0.329$, $N = 55$, $df = 1$; GH 5-8 = 0.239, $p = 0.624$, $N = 61$, $df = 1$; GH 9-12 = 0.269, $p = 0.603$, $N = 46$, $df = 1$; GH 13-16 = 0.405, $p = 0.524$, $N = 50$, $df = 1$; GH control = 0.134, $p = 0.714$, $N = 43$, $df = 1$) lo que nos permitió agrupar los datos. Una vez agrupados encontramos diferencias significativas entre las distintas clases de edad (prueba G: GH agrupado = 50.595, p

<0.001; N = 255; df = 4, Fig. 3.7). Como sucedió en experimentos anteriores, las abejas expuestas a los 1-4 días de edad mostraron niveles de respuesta muy bajos resultando homogéneas con el control y diferentes de abejas que experimentaron el olor a los 9-12 días de edad (prueba G: GH agrupado = 9.742, p = 0.044; N = 144, df = 4; Fig. 3.7). A la vez, encontramos niveles homogéneos de REP en abejas alimentadas con solución aromatizado a los 5-8 y 13-16 días de edad los que difirieron de los estimulado a los 9-12 días de edad (prueba G: GH agrupado = 9.601, p <0.047, N = 157, df = 4; Fig. 3.7). En síntesis, las abejas expuestas a los 5-8 y 13-16 días de edad mostraron diferencias con el resto de los grupos, a la vez que aquellas estimuladas a los 9-12 días difirieron del grupo 1-4 y control.

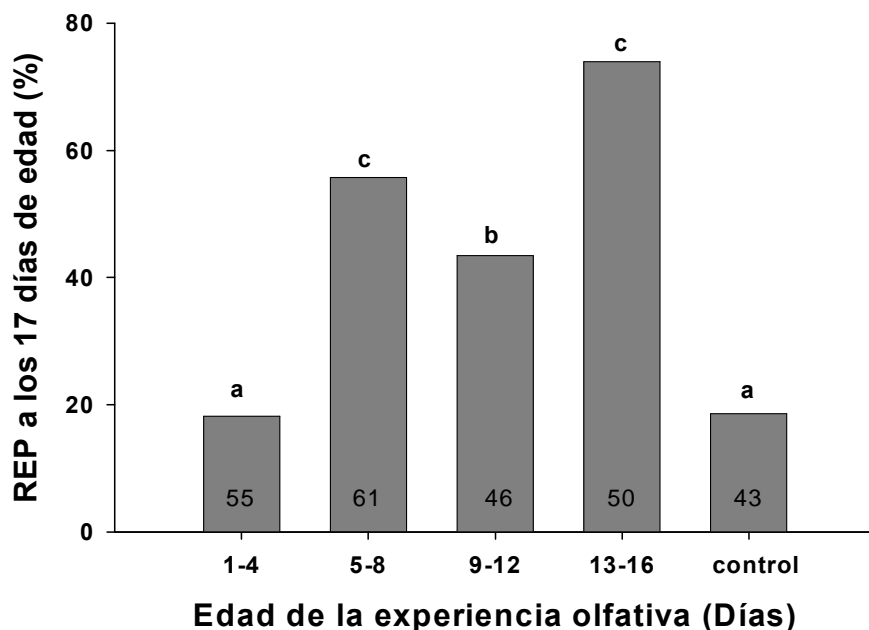


Fig. 3.7 La respuesta de extensión de probóscide (REP) en abejas enjauladas que fueron alimentadas con una solución perfumada distinta durante cada uno de los períodos definidos (véase el texto para más detalles). Los olores utilizados para aromatizar el alimento fueron: LIO, PHE, 2-NONA y 2-OCTA. Las respuestas condicionadas para LIO y PHE se agruparon. Letras diferentes indican diferencias significativamente con $p < 0,05$. El tamaño de las muestras se presenta en la parte inferior de cada barra.

3.3.5 Retención en abejas de vuelo libre

Las proporciones de respuestas de diferentes clases de edad no presentaron diferencias estadísticas para los distintos olores (LIO y PHE) y por lo tanto los datos se

agruparon. En la Figura 3.8, mostramos las proporciones de REP obtenidas a partir de abejas marcadas (abejas expuestas al alimento aromatizado a los 5-8 y 13-16 días de edad) y abejas sin marcar (abejas expuestas al alimentos aromatizado a edades desconocidas) que fueron capturadas un día (E1) y nueve días (E9) después de retirar la fuente de estimulación del interior de las colmenas. En E1 las respuestas hacia los olores condicionados se compararon entre abejas alimentadas a los 13-16 días de edad y abejas de

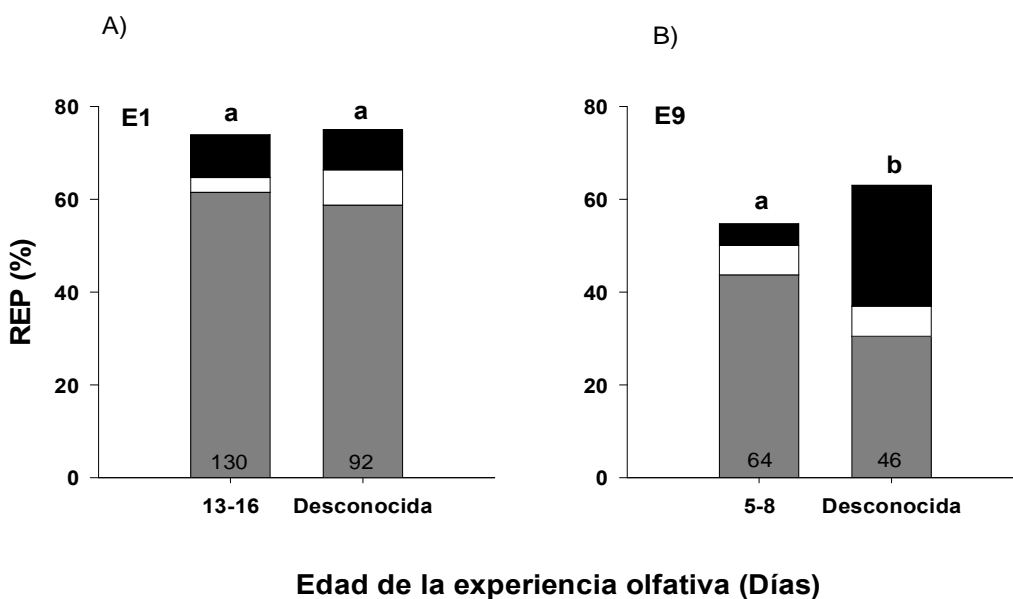


Fig. 3.8 Retención de las experiencias olfativas tempranas adquiridas a través del alimento aromatizado que se ofreció directamente dentro del nido en abejas de vuelo libre (véase el texto para más detalles). Abejas marcadas de edad conocida (5-8 y 13-16 días de vida) y abejas de edad desconocida fueron expuestas a alimento con olor dentro de la colmena para luego ser evaluadas a edades recolectoras. La fase de evaluación se realizó en dos momentos diferentes: E1, un día después de la estimulación (A) y E9, nueve días después de la estimulación (B). Abejas de edad desconocida también fueron evaluadas en ambos momentos. Olor diluido en la solución de azúcar (■), olor novedoso (□), y las respuestas suscitado por ambos olores (■). Letras diferentes indican diferencias significativamente con $P < 0.05$. El tamaño de las muestras se presenta en la parte inferior de cada barra.

edad desconocida en donde no encontramos diferencias estadísticas (prueba G: GH agrupado = 0.181; $p = 0.669$, $df = 1$, $N = 222$; Fig. 3.8A). Por otro lado, cuando las abejas estimuladas a los 5-8 días de edad se compararon con abejas de edad desconocida que

también fueron expuestas al olor 9 días antes (E9), encontramos diferencias significativas (prueba G: GH agrupado = 3.964, $p = 0.046$, $df = 1$, $N = 110$; Fig. 3.8B) lo que indica que la retención de memorias de 9 días no es igual en individuos estimulados a los 5-8 días de edad que en individuos con un rango de edades más amplio.

3.4 DISCUSIÓN

Dado que la retención de las memorias olfativas tempranas varía con el período en que ocurren las experiencias (y no con el intervalo de tiempo entre la adquisición y la evaluación), podemos decir que la retención de este tipo de memorias depende de la edad en la que la experiencia fue adquirida. Los resultados que presentamos acá muestran que las abejas son capaces de responder frente a un olor experimentado tempranamente, incluso 9-12 días después de la estimulación y en diferentes entornos en donde se desarrollaron las abejas. Tanto las obreras criadas en el laboratorio que adquirieron las experiencias asociativas en un condicionamiento clásico, como aquellas de vuelo libre que fueron estimuladas dentro de la colonia, mostraron que son capaces de retener la información de los olores del alimento desde los cinco días después de emerger. Los individuos condicionados con el procedimiento clásico y los alimentados con solución de azúcar aromatizada mostraron altos niveles de RC cuando fueron evaluados a los 17 días de edad. En ambos casos, los patrones de retención fueron similares lo que nos conduce a suponer que la contingencia entre estímulos debe presentar la misma fuerza asociativa.

Las variaciones en los perfiles de RCs parecen depender del periodo en el cual la información fue obtenida y de las distintas condiciones en las que se desarrollaron los individuos, haciendo hincapié en la complejidad de la interacción edad de adquisición-factor ambiental durante el desarrollo para modular la retención de los primeros recuerdos.

3.4.1 Las experiencias con olores en un ambiente controlado

Cuando ofrecimos solución de azúcar aromatizada dentro de las jaulas en donde las abejas se encontraban confinadas (Fig. 3.5), las memorias de los olores recompensados a los 5-8 ó 13-16 días presentaron niveles de retención mayores que los obtenidos en abejas condicionadas a los 9-12 días de edad. Sorprendentemente, las abejas expuestas a un olor recompensado entre los 5 y 8 días de la vida adulta (y en 6 / 8 días de edad, en Fig. 3.4) presentaron los niveles de REP mas altos medidos al día 17. Esto muestra que las abejas criadas en jaulas bajo condiciones de laboratorio pueden formar memorias olfativas estables y de largo plazo.

Esta evidencia se correlaciona con el período de maduración de las vías neuronales que participan en el procesamiento y percepción de olores en el cerebro de la abeja, el que ocurre alrededor de la primera semana de la vida adulta (Masson y Arnold, 1987; Winnington et al., 1996). Estudios sobre la ontogenia del sistema olfativo de este insecto (también ver sección 1.3.2) han sugerido la existencia de un período a partir de 3 días antes a 4-8 días después de que emerja como adulto durante el cual el sistema olfativo permanece muy flexible a los cambios ambientales (Masson et al., 1993). En este sentido, la ausencia de linealidad encontrada entre los niveles de RC de distintos grupos etarios y el intervalo adquisición-evaluación de las memorias tempranas sugiere que el periodo entre los 5-8 días de la vida adulta puede ser particularmente sensible para la retención de memorias olfativas en la abeja. Por lo tanto, la consolidación de las memorias olfativas establecidas a estas edades podría tener lugar a través de cambios que modifican la estructura y/o las funciones del sistema olfativo durante la fase final de su maduración.

Por otro lado, las diferencias en la retención entre distintas clases de edad también podrían ser explicadas, al menos en parte, por las variaciones en la eficacia de una solución de sacarosa como estímulo incondicionado (por diferencias en la motivación o el grado de

maduración del sistema químico-sensorial). Aún en ausencia de diferencias en la RI (Fig. 3.3A) para soluciones de 1.8 M, los umbrales de respuesta al azúcar podrían seguir siendo diferentes a distintas edades (Pankiw y Page, 2003). Durante la transición de tareas desde el interior del nido al exterior, las abejas experimentan numerosos cambios fisiológicos y anatómicos en el sistema nervioso pero también en tejidos no neuronales, principalmente asociados con los cambios en las hormonas circulantes y los niveles de aminas biogénicas, tales como la hormona juvenil (JH) y octopamina (OA) (Robinson 1992, Robinson y Vargo 1997, Bloch et al. 2002). La OA por ejemplo ha sido reconocida como un modulador del comportamiento de las abejas durante el aprendizaje asociativo (Hammer, 1993; Hammer y Menzel, 1995). En este sentido, se ha detectado un aumento de OA (relacionado con HJ) unos días después de la eclosión de las obreras seguido de una rápida reducción hasta niveles iniciales, para aumentar nuevamente varios días después al comenzar con las actividades de recolección (Jassim et al., 2000). Estos perfiles presentan una ligera correlación con las REP encontradas en este trabajo.

Al retrasar 9-12 días la evaluación de abejas estimuladas entre los 13 a 16 días de edad (evaluación al día 25) descartamos la posibilidad de que los altos niveles de REP puedan ser el resultado del breve intervalo entre condicionamiento y evaluación. Las diferencias encontradas con los controles, ya sea para intervalos cortos (intervalo de 1-4 días) o más largos (de 9-12 días) nos permite afirmar que al menos para memorias que se extienden por un periodo de 12 días, las variaciones en la retención parece ser principalmente una consecuencia de la edad en la cual se adquiere dicha memoria.

Cuando las abejas fueron expuestas a cuatro olores sucesivos en el laboratorio observamos nuevamente un patrón de respuesta bimodal. Los sujetos con experiencias a los 5-8 y 13-16 días de edad volvieron a presentar las RCs más altas (Fig. 3.7), mostrando que las experiencia olfativas tempranas (es decir, adquiridas en 5-8, 9-12 y 13-16 días de edad) podían ser recuperadas con éxito a los 17 días de vida, incluso después de la

formación de otras memorias. Sorprendentemente, las CRs obtenidas en las abejas estimuladas a los 5-8 y 13-16 días de edad también presentaron diferencias con las del grupo estimulado a los 9-12 días. Contrariamente a los resultados observados en abejas condicionadas clásicamente ó alimentadas con solución aromatizada, el grupo 9-12 también mostró diferencias significativas con el grupo 1-4. De este modo y aunque las experiencias olfativas previas podrían estar modificando la retención de otras experiencias apetitivas, los bajos porcentajes de respuesta obtenidos en individuos de 1-4 días de edad indican que las abejas sí pueden discriminar entre distintos olores experimentados en distintas etapas obteniendo información específica en cada una de ellas. Por otra parte, si las respuestas se debieran a un efecto de generalización se esperaría obtener altos niveles de respuesta para todos los olores ofrecidos en el alimento, incluidos los que se ofrecieron a los 1-4 días de edad (Fig. 3.7).

3.4.2 Olores experimentados dentro de la colmena

Cuando las abejas experimentales fueron criadas en colonias hospedadoras, las experiencias adquiridas en abejas de 9-12 días de edad presentaron altos niveles de respuestas (similares a los obtenidos en abejas estimuladas a los días 5-8 ó 13-16). Esto sugiere que la recuperación de las memorias no sólo depende de la edad de la adquisición, sino también de las condiciones ambientales en las que se desarrolla la abeja como adulta (Fig. 3.8). En este sentido, varios autores (Collins, 1980; Masson y Arnold, 1984; Pham-Delegue, et al. 1991; Vergoz et al., 2007) han reportado cambios en el comportamiento de las abejas obreras frente a señales olfativas con la edad; por ejemplo, existe evidencia de que las secreciones producidas por la reina juega un papel importante en el desarrollo del aprendizaje de la obrera y en la maduración de su sistema olfativo (Morgan et al., 1998). Sin embargo, la estimulación olfativa en general, incluidas las mezclas complejas de

feromonas que se distribuyen en toda la colonia o la circulación de néctares aromatizados, puede contribuir a alterar los niveles de respuesta entre las clases de edad. En las abejas, aunque parte del sistema nervioso central implicado en olfacción está plenamente innervado 2 días después de emerger (Masson et al., 1993), se cree que la formación de los circuitos neuronales involucrados en el aprendizaje de olores es dependiente de la actividad. Es decir que los individuos requerirían ser sometido a un rango de estímulos quimio-sensoriales para poder luego aprender correctamente (Winnington et al., 1996; Maleszka y Helliwell, 2001; Farris et al., 2001; Ichikawa y Sasaki, 2003). Como vimos en la sección 1.3.2 las respuestas electro fisiológicas de las NRO aumentan de manera constante desde la emergencia hasta los 4 días de vida adulta, manteniéndose elevadas hasta el día 8 (Masson y Arnold, 1987) pero también disminuyen abruptamente cuando las abejas son privadas de estímulos olfativos durante los primeros días de vida adulta (Masson y Arnold, 1984). En este marco, es razonable pensar que la baja retención de las memorias adquiridas luego del condicionamiento clásico o de la oferta de alimento con olor a los 9-12 días de edad se debe a la ausencia de las experiencias previas (incluida la estimulación mecánica, visual y/o químicas) probablemente ausentes durante los primeros 8 días de vida adulta en los insectos criados en condiciones de laboratorio.

Las abejas recientemente emergidas que se introdujeron en colonias tratadas con alimento aromatizado nos permitieron evaluar las respuestas comportamentales, no sólo en función de la maduración del sistema nervioso, sino también según el rol que la abeja está desempeñando en ese momento en el interior de la colmena (ver sección 1.4.1). Al igual que en el experimento anterior, la presencia de posibles fuentes de alimento productivas en el exterior podrían haber formado memorias que debiliten o incluso sustituyan aquellas más antiguas establecidas de manera artificial y controlada a través de los alimentadores de colmena. En particular, la propagación de esta información (fuentes naturales) podría haber sido transferida de forma más eficiente al estar acompañada por la

danza de reclutamiento (von Frisch, 1968 y sección 1.4.2). Sin embargo en E9, las abejas expuestas al olor a los 5-8 días de edad mostraron RCs superiores que su grupo control (Fig. 3.8B). Teniendo en cuenta que las abejas de edad desconocida podrían incluir obreras que aprendieron el EC a edades más tempranas que 5-8 o incluso recolectoras maduras, los resultados muestran una vez más que la retención de estas memorias depende de la edad, y que las abejas pueden recuperar mejor la información del alimento cuando lo aprenden a los 5-8 días de edad que a edades no particulares. En base a estos resultados sugerimos que cuanto mayor sea la variabilidad en el rango de edades para la adquisición de información olfativa, menor serán los niveles de retención de la RC. La retención de los olores de la solución durante la evaluación E1 fue similar entre las abejas estimuladas a 13-16 días de edad y a edades desconocido (Fig. 3.8A).

Este experimento provee un control adicionales para los experimentos anteriores en donde las abejas habían sido evaluadas a una edad fija de 17 días (ó 25). Las diferencias encontradas entre abejas estimuladas a 5-8 días de edad y otras a edad desconocida muestran que los resultados no pueden ser explicados simplemente por el tiempo transcurrido entre la experiencia y su evaluación.

4

Las experiencias olfativas tempranas modifican la actividad neuronal en el lóbulo antenal de la abeja madura

4.1 INTRODUCCIÓN

A pesar de la poca información disponible para comprender las influencias de las experiencias tempranas sobre el comportamiento de insectos maduros, en los capítulos anteriores mostramos que ciertos estímulos olfativos que se ofrecen durante un período particular y relativamente corto (cuando las abejas tienen entre 5 y 8 días de edad) se recuerdan mejor a edades maduras (17 días) que las mismas experiencias que ocurren antes (1-4 días de edad) o incluso después (9-12 d) de este período. Por lo tanto, la retención de estas primeras memorias olfativas depende de la edad y no del tiempo transcurrido entre la estimulación y el tratamiento.

En el sistema olfativo de los insectos, el lóbulo antenal (LA), análogo al bulbo olfativo en vertebrados, es el primer centro de integración de los estímulos olfativos y está estructurado en glomérulos. Como vimos en la sección 1.3.1 se ha demostrado que los olores están codificados en patrones de actividad glomerular (la presentación de un olor activa un conjunto de glomérulos en el LA que es olor-específico). Estas representaciones neuronales bien conservadas entre individuos, son dinámicas y varían ligeramente dependiendo de la información almacenada con anterioridad, cambiando sus componentes espacio-temporales después de algunos eventos de aprendizaje asociativo (Faber et al.,

1999; Sandoz et al., 2003; Yu et al., 2004; Daly et al., 2004).

Como ya vimos en la sección 1.3.2, varios autores coinciden que los circuitos neuronales presentes en el insecto adulto se establece durante la metamorfosis, aunque siguen siendo modificados durante los primeros días de vida imaginal (Masson, 1993; Winnington et al., 1996; Devaud et al., 2003). Esta hipótesis es sustentada por un estudio reciente que muestra que la actividad neuronal evocada por un olor es baja en abejas de 1-2 días de edad, pero aumenta de manera consistente durante las primeras semanas de vida adulta (Wang et al., 2005).

Aunque se ha demostrado que el condicionamiento olfativo en abejas adultas puede alterar los patrones de actividad glomerular (Faber et al., 1999; Sandoz et al., 2003), no hay pruebas acerca de los efectos a largo plazo de las experiencias olfativas tempranas que ocurren durante el desarrollo. En este capítulo estudiaremos si estas experiencias tempranas que observamos inducen cambios importantes en el comportamiento a edades maduras, hace más sensible o no al sistema olfativo frente al olor experimentado. Si la respuesta es sí, analizaremos si este efecto se limita al olor conocido o se generaliza a nuevos olores.

Con el fin de responder estas preguntas evaluamos el efecto de las experiencias en un ensayo de comportamiento mediante la oferta de solución de azúcar aromatizada en abejas enjauladas a la edad particular de 5-8 días. Luego se evaluaron las respuestas de extensión de probóscide (PER, Takeda 1961; Bitterman et al., 1983) a los 17 días de edad (Lindauer, 1952; Seeley, 1982). Las abejas fueron evaluadas frente al olor aprendido en el alimento (1-NON) y frente a tres olores novedosos (desconocidos para la abeja) con diferentes grados de similitud entre ellos y con el olor de la solución: Nonanal (NONA), 1-hexanol (1-HEX) y Hexanal (HEXA). Utilizando la técnica de “imaging” de calcio realizamos registros *in vivo* de las respuestas evocadas por los diferentes olores en el LA de

abejas adultas. Los resultados mostraron que las experiencias olfativas tempranas modificaron las respuestas comportamentales no solo de los olores experimentados en el alimento sino también frente a olores novedosos similares. Además, a nivel del LA las experiencias olfativas causaron un aumento en la intensidad de la señal de calcio y el número de glomérulos reclutados por cada olor.

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1 Animales

Las abejas obreras utilizadas para este experimento fueron obtenidas de igual forma que en 3.2.1 (obreras recién emergidas a partir de cuadros de cría sellada colocados en una incubadora a 36 ° C, 55% HR). Las jaulas ofrecieron solución de azúcar 1.8 M, agua y polen *ad-libitum*. Estas jaulas se mantuvieron en una estufa (32 ° C, 55% HR y en oscuridad) hasta que las abejas alcanzaron la edad de 17 días, momento en que fueron evaluadas.

4.2.2 Experiencias olfativas tempranas

Para establecer una experiencia olfativa controlada dentro de un contexto apetitivo ofrecimos una solución de azúcar aromatizada a los 5-8 días de vida adulta (detallado en sección 3.2.3.2). Durante este período las abejas fueron alimentadas con una solución aromatizada con 1-NON (50 µl de olor puro por litro de solución). Un segundo grupo de abejas alimentadas con una solución sin olor se utilizó como control.

A los 17 días de edad las abejas fueron encephadas para evaluar la retención de las memorias adquiridas tempranamente en el paradigma de PER o para registrar la actividad

neuronal en el LA. En ambos ensayos, utilizamos cuatro olores diferentes presentados a dos concentraciones: 1-NON como olor de solución y NONA, HEXA y 1-HEX como olores novedosos.

Debido a que los niveles de generalización de las abejas varían dependiendo principalmente del largo de cadena carbonada y el grupo funcional de los compuestos (Fig. 4.1) los olores fueron elegidos de tal manera de formar una matriz cuadrada en la que dos de los cuatro compuestos compartían el mismo grupo funcional (o aldehídos o alcoholes primarios) y otros dos compuestos el largo de cadena carbonada (C6 y C9).

4.2.3 Respuestas comportamentales

Las respuestas condicionadas (RC) se evaluaron utilizando el paradigma REP (Takeda, 1961; Bitterman et al., 1983) siguiendo el mismo procedimiento descrito en 3.2.2.

Training/Testing	1-NON	NONA	1-HEX	HEXA
1-NON	100	70.37	37.5	32
NONA	54.17	82.61	25	65.22
1-HEX	14.81	29.17	79.17	66.67
HEXA	11.11	17.24	14.81	78.26

Similarity	1-NON
NONA	62.27
1-HEX	26.16
HEXA	21.56

Fig. 4.1. Similitud perceptual entre los olores usados (según Guerrieri et al., 2005). A) Matriz de generalización que representa el porcentaje de respuestas de extensión de la probóscide (REP) observados para los olores no recompensados (columnas), después de tres ensayos de condicionamiento a cada uno de los cuatro olores (líneas). Sólo se presentan aquellas abejas que aprendieron el EC durante el entrenamiento, es decir, que respondieron al EC al menos en la tercera presentación del estímulo. B) La similitud comportamental entre 1-NON (olor de solución) y los tres olores novedosos, se calculó como la media de generalizaciones en cada par de olores. Esta similitud varía según el grupo funcional y la longitud de la cadena de carbono de los olores.

El dispositivo utilizado para controlar las presentaciones de los estímulos fue el mismo

utilizado en 3.2.2. En este caso cada abeja recibió cuatro olores en diferentes ensayos los cuales se presentaron en orden aleatorio y separado entre sí por intervalos de 15 min. Para comparar las REP entre grupos tratados y control utilizamos pruebas de Chi cuadrado que se aplicaron sobre la proporción de respuestas obtenidas para cada olor evaluado (Sokal y Rohlf, 1995). Para reducir el riesgo de errores de tipo 1 debido al uso múltiple de los mismos datos, utilizamos el método de Bonferroni ($\alpha' = \alpha / k$), con α : 0,05 y k: 4 para corregir el umbral de significancia.

4.2.4 Registros Opto-fisiológicos

4.2.4.1 Preparación y tinción de los cerebros

Las obreras adultas fueron capturadas desde las jaulas en donde recibieron la estimulación olfativa, anestesiadas en hielo y montadas individualmente en soportes de acrílico. La cabeza de la abeja fue fijada con cera de baja temperatura de fusión (Deiberit 502, Böhme y Schöps Odontología GmbH, el 16 de Goslar, Alemania) y las antenas, orientada hacia delante, fueron fijadas con alambres de acero muy finos. Alrededor de la cabeza de la abeja se formó una pequeña cavidad para contener solución salina. Esto se logró pegando pequeños trozos de lámina de plástico en la parte frontal y a ambos lados del soporte. Para sellar la cavidad, las bases de los flagelos de las antenas fueron pegadas con silicona de dos componentes lo que permitió aislar la región del cerebro de la de las antenas. Las antenas se mantuvieron intactas para ser estimuladas. Un pequeño trozo de cutícula fue retirado de la parte frontal de la cápsula de la cabeza para poder retirar las glándulas, tráqueas y membranas que cubren el cerebro y así exponer ambos LAS. Sistemáticamente la preparación se bañó con solución salina (en mm: NaCl: 130; KCl: 6; MgCl₂: 4; CaCl₂ 5; sacarosa: 160; glucosa: 25; HEPES: 10; pH 6,7, 500 mOsmol; todos los productos químicos de Sigma - Aldrich, Lyon, Francia). Para la tinción la solución salina

fue eliminada y el cerebro fue bañado completamente con 50 μ l solución colorante (50 μ g de calcio-Green-2 a.m. disuelto con 50 μ l Pluronic F-127, 20% en dimethylsulfoxide, DMSO) en 800 μ l de solución salina (Calcio-Green y Pluronic de sondas moleculares, Oregon, EE.UU.). Después de una hora de incubación (en oscuridad y refrigerado con hielo), el cerebro fue lavado varias veces con solución salina para eliminar los restos del marcador. Cuando fue necesario el abdomen del insecto fue inmovilizado con cera de baja temperatura de fusión para reducir los movimientos que causan cambios en la distancia focal e inducen errores en los registros.

4.2.4.2 Registros ópticos

Los registros *in vivo* se llevaron a cabo utilizando un sistema de imágenes T.I.L.L. Photonics (Martinsried, Alemania). Los preparados fueron observados y registrados en un microscopio de epi-fluorescencia (Olympus BX51WI Alemania) utilizando un objetivo de inmersión de 10x (NA 0.3, Olympus, Hamburgo, Alemania). Durante los registros el cerebro de la abeja permaneció cubierto de solución salina en donde estaba inmerso el objetivo. Cada registro fue capturado a una frecuencia de ~ 5 cuadros / s dando un total de 100 cuadros por registro (tiempo de integración cada 4 cuadros: 216 ms). Para esto usamos una cámara monocromática de 640 x 480 píxeles y 12 bits (T.I.L.L. Imago). La estimulación olfativa, presentada en el 15^o cuadro, duró 1 seg. La excitación con luz monocromática (475 nm) fue generada por una lámpara monocromática (T.I.L.L. Polychrom IV).

El dispositivo de filtros del microscopio estaba compuesto de un filtro dicróico de 505 nm, y un filtro de emisión LP de 515 nm. A lo largo de los registros, un flujo constante de aire (50 ml/s) fue presentado sobre la cabeza de la abeja a través de un tubo de vidrio (1 cm de diámetro) situado a 2 cm de la parte frontal de la abeja. El olor impregnado en un

papel de filtro (4 µl puro olor o 4 µl 1:10 olor diluido en 30 x 3 mm de papel) se colocó dentro de una pipeta la cual se conectaba con el tubo de vidrio y entregaba el olor a través de un flujo de aire (2.5 ml / s) inyectándolo en el flujo principal durante la estimulación. El intervalo entre presentaciones de olor fue de aproximadamente 80 seg. Los olores se presentaron en una secuencia semi-aleatoria que siempre comenzaba por la concentración más baja. Todas las abejas experimentales recibieron cada olor por triplicado en cada una de las concentraciones usadas.

4.2.4.3 Identificación de glomérulos

Para revelar la estructura glomerular del LA una vez terminados los registros *in vivo*, una mezcla de 125:1 (vol/vol) de una solución de proteasa (a partir de *Bacillus licheniformis* en propilenglicol; Sigma Aldrich) fue utilizada para digerir la cubierta del cerebro y permitir así teñir las membranas celulares con RH795 (disuelto en etanol absoluto de Molecular Probes). Una hora más tarde, el cerebro fue lavado con solución salina. Para reconstruir y poder identificar los glomérulos de la superficie del LA tomamos varias fotografías con 5 a 10 planos focales diferentes. Para ello utilizamos una luz monocromática de 530 nm para excitar la muestra y un conjunto de filtros dicróicos de 570 nm y de emisión de 590 nm. Después de editar las fotografías (Adobe Photoshop) para resaltar los límites de los glomérulos y hacerlos más visibles, estos fueron identificados según el Atlas publicado por Galizia (et al., 1999b). A partir de estas imágenes reconstruimos una máscara o molde que permitió determinar las coordenadas de los distintos glomérulos en los focos de actividad en las imágenes de calcio. Luego pudimos identificar al menos 19 glomérulos presentes en todos los individuos.

4.2.4.4 *Procesamiento de los datos*

Las imágenes se cuantificaron utilizando un software para PC, IDL (Research Systems Inc, Colorado, EE.UU.) que analizó cada registro en tres dimensiones: dos espaciales (x, y píxeles de la zona de interés) y una temporal (100 cuadros). Para calcular las señales, los datos fueron filtrados espacialmente con un filtro de mediana de 3 píxeles a fin de reducir el ruido fotónico. Para corregir el “bleaching” y las posibles irregularidades de iluminación generadas por la lámpara en el tiempo, cada píxel se le restó el valor medio de todos los píxeles de ese cuadro. Por último, los cambios de fluorescencia relativa ($\Delta F / F$) se calcularon como $(F-F_0) / F_0$, donde F_0 ó fluorescencia basal fue obtenida como el promedio de los tres cuadros previos a la estimulación (cuadros 5-7). Las señales evocadas por los diferentes olores estaban compuestas por dos componentes: el primero, un rápido incremento en la fluorescencia causado por el aumento de la concentración de calcio intracelular lo que refleja principalmente la actividad pre-sináptica de las neuronas receptoras olfativas (Galizia et al., 1998; Sachse y Galizia, 2003) y el segundo, un lento decremento en la fluorescencia por debajo de la línea de base debido al “bleaching”. Estas señales son las que comúnmente se obtienen al hacer aplicaciones de baño (Galizia et al., 1997; Stetter et al., 2001; Sandoz et al., 2003). Para cada uno de glomérulos identificados calculamos el curso temporal de los cambios de fluorescencia relativa a partir del promedio de los 25 píxeles (5 x 5) del centro de cada glomérulo que luego fue promediada con las otras estimulaciones registradas en un mismo animal.

Para estudiar si las experiencias olfativas tempranas provocan cambios en los niveles de activación de las respuestas evocadas por los olores utilizamos dos medidas: la intensidad de activación y el número de glomérulos activados. La intensidad se calculó como la suma de las respuestas ($\Delta F/F$) de los 19 glomérulos identificados dentro de cada animal. Esto nos permitió cuantificar el nivel general de activación que provoca un olor

particular en el LA. Por otra parte, el número de glomérulos activados se calculó sumando aquellos que respondieron con una amplitud de respuesta por encima del nivel de ruido el que se definió como dos DS de la señal previo a la presentación del estímulo (es decir entre los cuadros 12 y 14).

También nos propusimos estudiar si las experiencias olfativas tempranas modificaban cualitativamente la representación de los olores. Por lo tanto, comprobamos la similitud entre los patrones de actividad en abejas tratadas con el alimento aromatizado y frente a los otros tres olores de prueba. Para cuantificar la similitud entre los patrones, calculamos la correlación de Pearson entre los coeficientes de las respuestas en los 19 glomérulos. Como la representación neuronal de un olor puede considerarse como un vector con múltiples dimensiones, en la cual cada dimensión está representada por un glomérulo en particular, evaluamos la similitudes entre representaciones olfativas usando distancias euclidianas (Deisig et al., 2006). Ya que no es posible visualizar un espacio de 19 dimensiones, usamos un Análisis de Componentes Principales para proyectar los datos en un espacio de 3 y 2 dimensiones formado por un subconjunto de componentes que explican la mayor parte de su varianza.

El efecto de las experiencias olfativas tempranas se evaluó usando ANOVA de medidas repetidas, donde uno de los factores fue el tratamiento (dos niveles), y el otro los olores evaluados (cuatro niveles). Las comparaciones *post hoc* se realizaron con análisis de Scheffé. Las interacciones detectadas en el ANOVA se analizaron a través de los efectos simples. Para simplificar el análisis no incluimos a la concentración de los olores como otro factor del ANOVA. Por lo tanto, los datos se analizaron por separado.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Respuestas comportamentales

La Figura 4.3 muestra el porcentaje de respuestas de REP obtenidas para cada olor en abejas de 17 días de edad. Las abejas tratadas que recibieron solución de azúcar aromatizada con 1-NON como experiencia olfativa temprana mostraron niveles de respuestas más altos que los obtenidos en abejas sin tratar para dos de los cuatro olores evaluados. En primer lugar, se detectaron diferencias significativas para la experiencias con 1-NON, cuando se lo evaluó a alta concentración (1 / 1; Chi cuadrado: χ^2 1-NON 1 / 1 = 28.74, $p < 0.001$, $df = 1$) y también a 1 / 10 (Chi cuadrado: χ^2 1-NO 1 / 10 = 35.10, $p < 0.001$, $df = 1$).

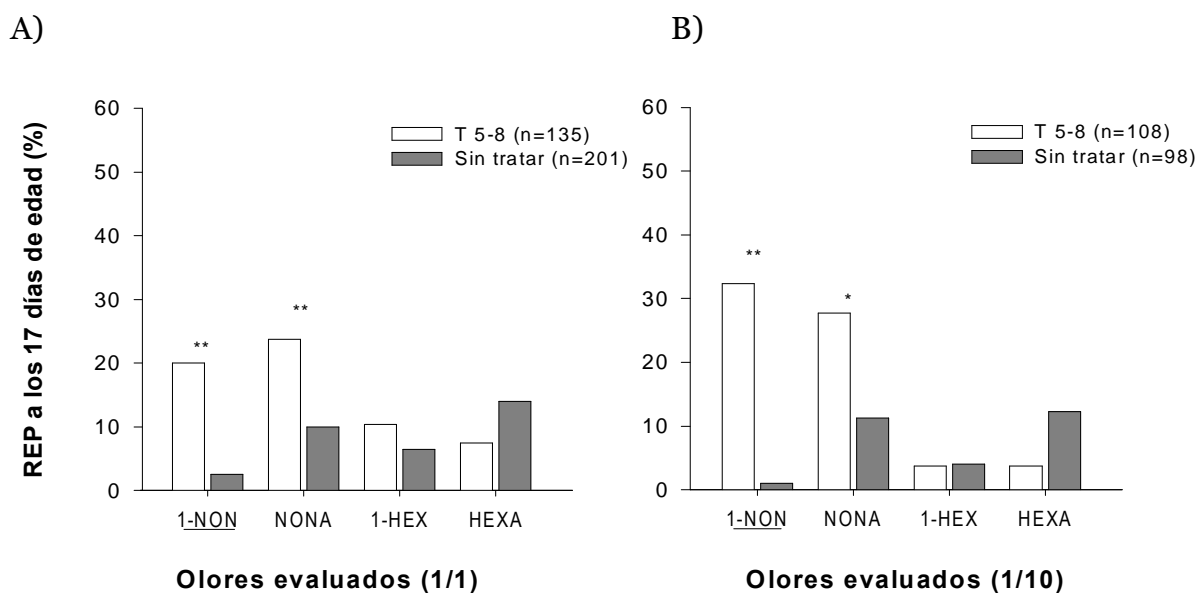


Fig. 4.2. Respuesta de extensión de probóscide (REP) evaluadas a los 17 días de edad frente al olor experimentado (1-NON) y tres olores novedosos (NONA, 1-HEX y HEXA). a) Respuestas de los olores de evaluación presentados en alta concentración (1 / 1). b) Olores de evaluación presentados a baja concentración (1 / 10). Los asteriscos indican diferencias estadísticas en pruebas de G, después de la corrección de Bonferroni (* $p < 0.0125$ ** $p < 0.001$, NS no significativo, ver los resultados para más detalles). Tamaño de la muestra se presenta en la leyenda.

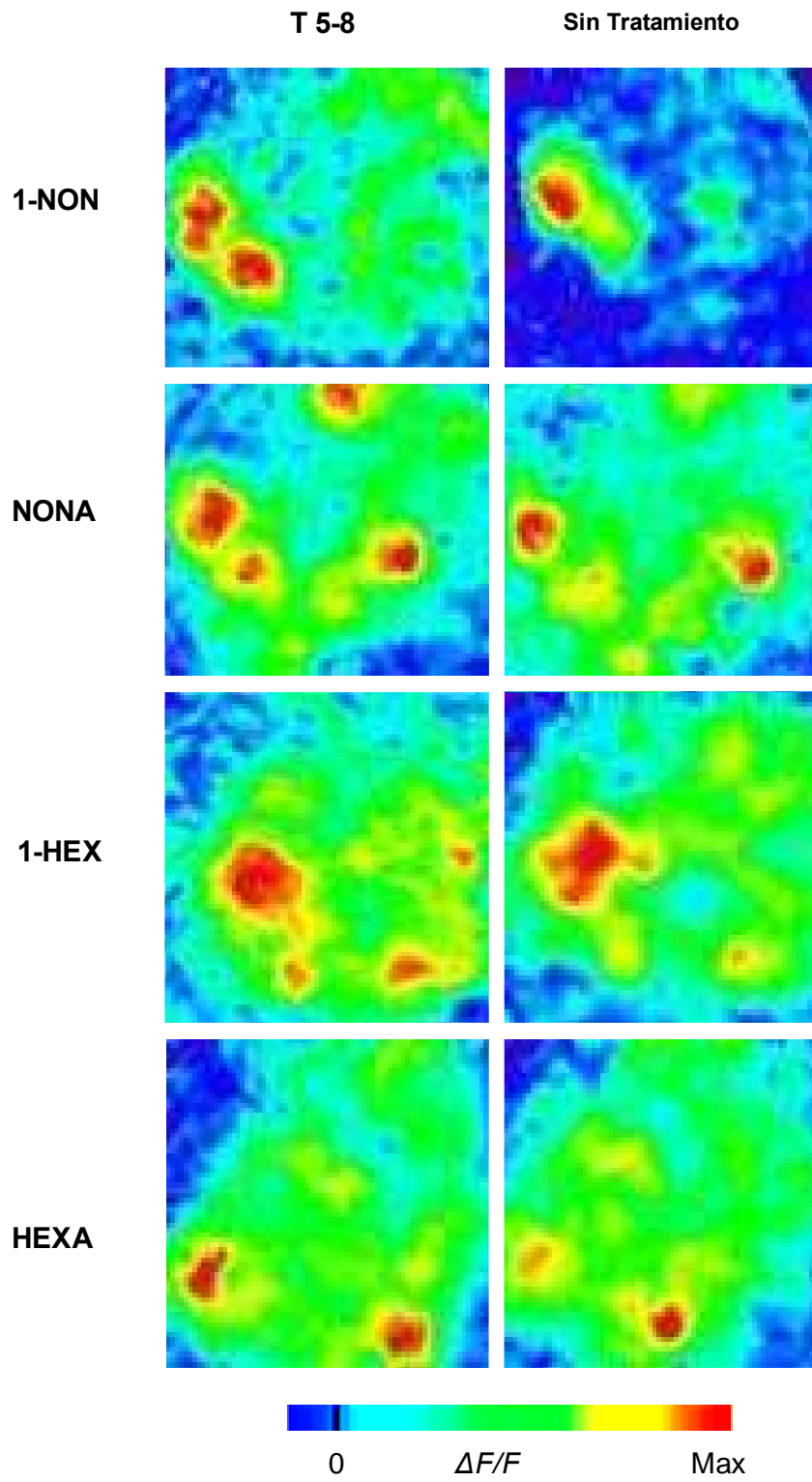
Además, la experiencia con solución aromatizada también afectó el porcentaje de respuestas a NONA, un olor novedoso que comparte la misma longitud de cadena de carbono (C9) y presenta una alta similitud perceptual con el olor recompensado (véase el Fig. 4.1). Una vez más, encontramos diferencias para ambas concentraciones (Chi² NONA 1 / 1 = 11.68, p < 0.001, df = 1; Chi² NONA 1 / 10 = 8.83, p = 0.003; gl = 1). Por otra parte, las respuestas a 1-HEX y HEXA entre abejas tratadas y control no mostraron diferencias para ninguna de las dos concentraciones. Llegamos a la conclusión de que las abejas que experimentaron 1-NON diluido en la solución de sacarosa a los 5-8 días de edad pueden recordarlo y generalizarlo con su aldehído correspondiente, NONA.

4.3.2 Respuestas Opto-fisiológicas

4.3.2.1 Las respuestas a los olores de la abeja melífera AL

Las respuestas de Calcio fueron monitoreadas en el LA frente a diferentes olores en abejas que recibieron experiencias olfativas tempranas y en abejas sin experiencias (Fig. 4.3A y 4.4). Las abejas que se sometieron a la experiencia olfativa temprana claramente presentaron patrones de actividad espacial diferentes para los distintos olores evaluados (Fig. 4.4). Del mismo modo, aquellas abejas que no recibieron ninguna estimulación controlada durante su vida adulta también mostraron patrones de actividad diferentes (Fig. 4.4). Los glomérulos activados por cada olor en ambos grupos fueron similares. Para comparar las respuestas evocadas por los olores en el LA entre abejas tratadas y control, evaluamos tres variables: intensidad de activación global, el número de glomérulos activado y la similitud entre olores.

A)



B)

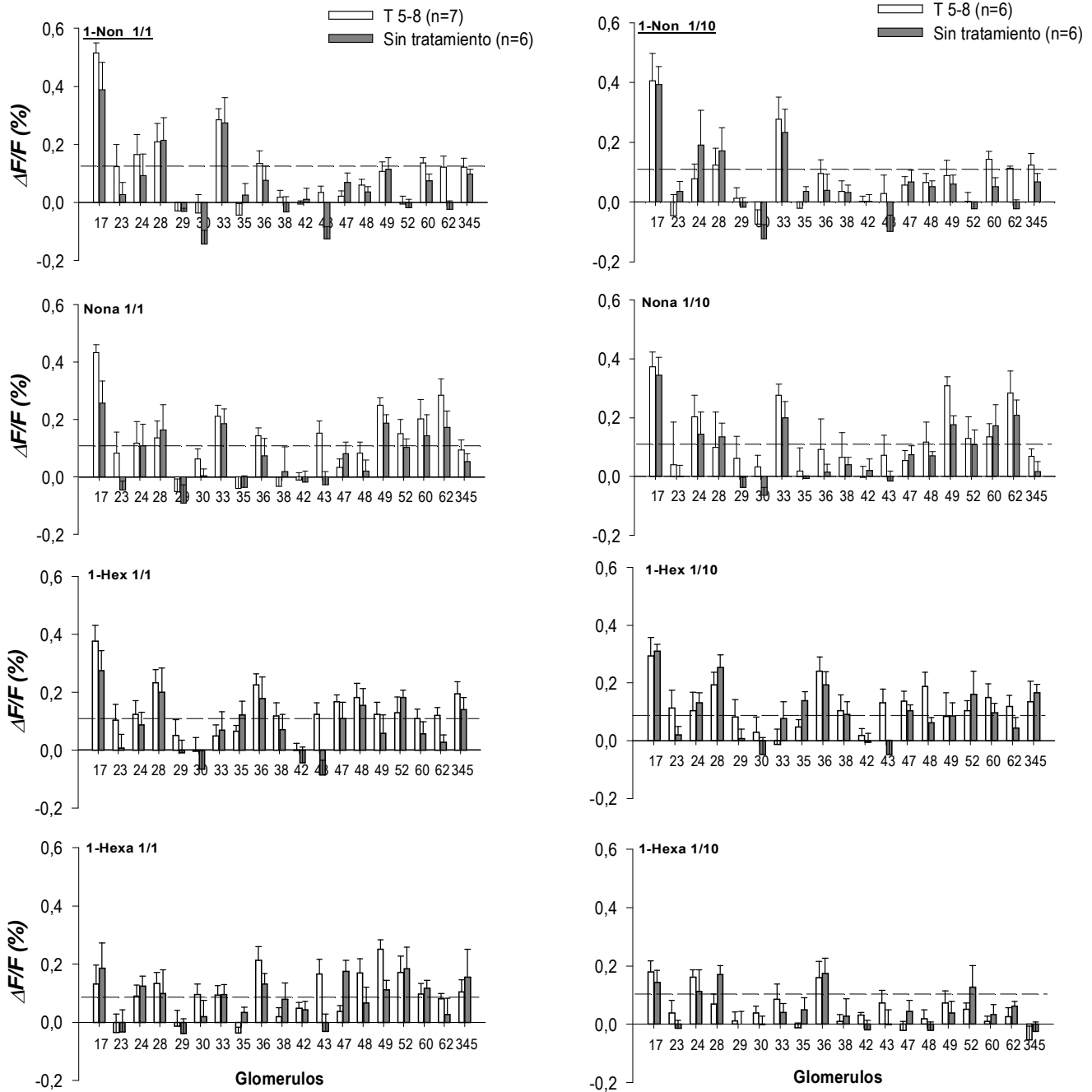


Fig. 4.4. A) Ejemplos de imágenes en falso color en abejas condicionadas (T5-8) y sin tratar frente al olor experimentado (1-NON) y a tres olores novedosos (NONA, 1-HEX y HEXA) presentados a alta concentración (1/1). B) Respuesta de 19 glomérulos identificados frente a los olores de evaluación para ambos grupos (T5-8 y Sin tratamiento). Las intensidades se expresan como cambios relativos en la fluorescencia durante la presentación de olor ($\Delta F/F$) \pm DS. La línea punteada muestra el nivel de ruido (2 DS de la señal antes de la presentación de olor).

Encontramos que las experiencias tempranas causaron un aumento en intensidad de la respuesta no solo frente al olor experimentado, sino también frente a olores novedosos (Fig. 4.5). Para ambas concentraciones, la intensidad global fue cualitativamente superior en aquellas abejas con experiencias, sin embargo solo detectamos diferencias estadísticas cuando los olores fueron presentados a alta concentración (ANOVA-1 / 1, $F = 4.97$, $p = 0.047$, $df = 1$). Por otro lado no se encontraron diferencias entre los olores evaluados ni tampoco para la interacción entre el tratamiento y los olores (ANOVA-olor-1 / 1, $F = 1.244$, $p = 0,309$, $df = 3$; ANOVA-olor-1 / 1, $F = 2.057$, $p = 0.124$, $df = 3$). Así, las experiencias olfativas tempranas modificaron cuantitativamente el patrón glomerular del olor aprendido pero también de los otros olores evaluados (Fig. 4.5A).

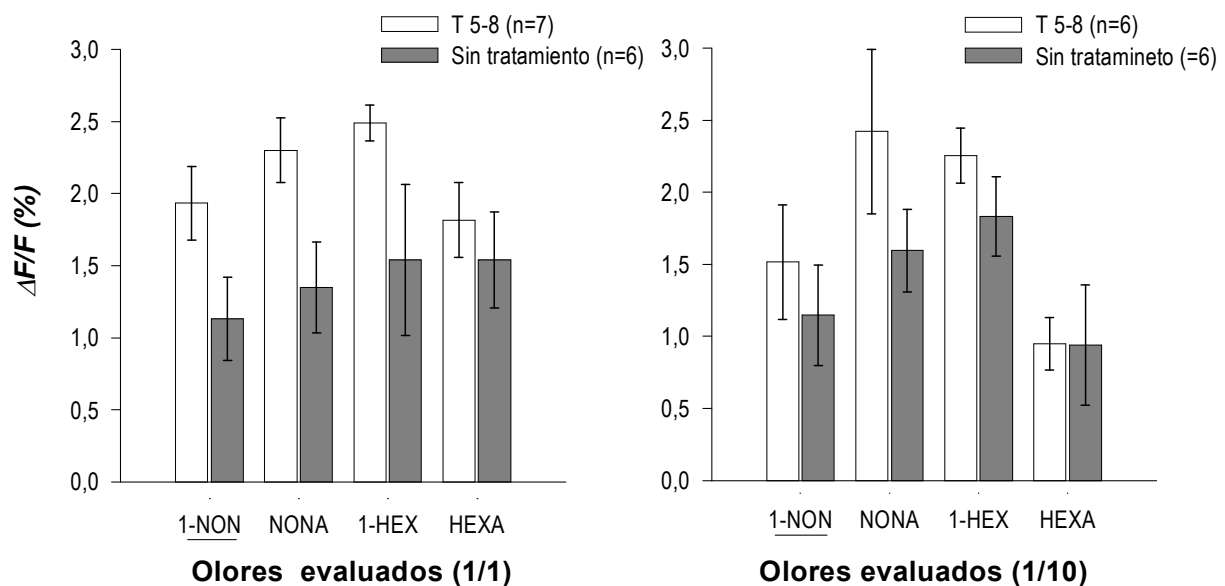


Figura 4.5. Intensidad global que se obtiene como la suma de los cambios de fluorescencia relativa ($\Delta F/F$) en los 19 glomérulos identificados en el LA de abejas de 17 días de edad. A) Intensidad global evocada por 1-NON como olor experimentado y NONA, 1-HEX y HEXA como olores novedosos presentados a alta concentración (1/1). El ANOVA de dos vías muestra una diferencia significativa entre la intensidad global de abejas tratadas y no tratadas. B) La intensidad global suscitada por los mismos olores presentados a baja concentración (1/10). El ANOVA no muestra diferencias por el tratamiento, pero un efecto significativo de los olores evaluados. El tamaño de la muestra se presenta en la leyenda.

Cuando la actividad glomerular se midió a una concentración menor (1 / 10) sólo detectamos diferencias entre los olores evaluados (ANOVA-Olor-1/10, $F = 7.342$, $p < 0.001$, $df = 3$). Sin embargo, no se observó ningún efecto del tratamiento o de la interacción entre factores (ANOVA-Tratamiento-1/10, $F = 0.502$, $p = 0.494$, $df = 1$; ANOVA-Tratamiento/olor-1/10, $F = 0.776$, $p = 0.516$, $df = 3$). El número de glomérulos activados se muestra en la Fig. 4.6 en donde se observa, al igual que para la intensidad global, un aumento significativo del número de glomérulos activados en abejas con experiencia olfativa para olores presentados a alta concentración (ANOVA-Tratamiento-1 / 1, $F = 5.419$, $p = 0.040$, $df = 1$, ANOVA-Tratamiento 1/10, $H = 0.001$, $p = 0.968$, $df = 1$).

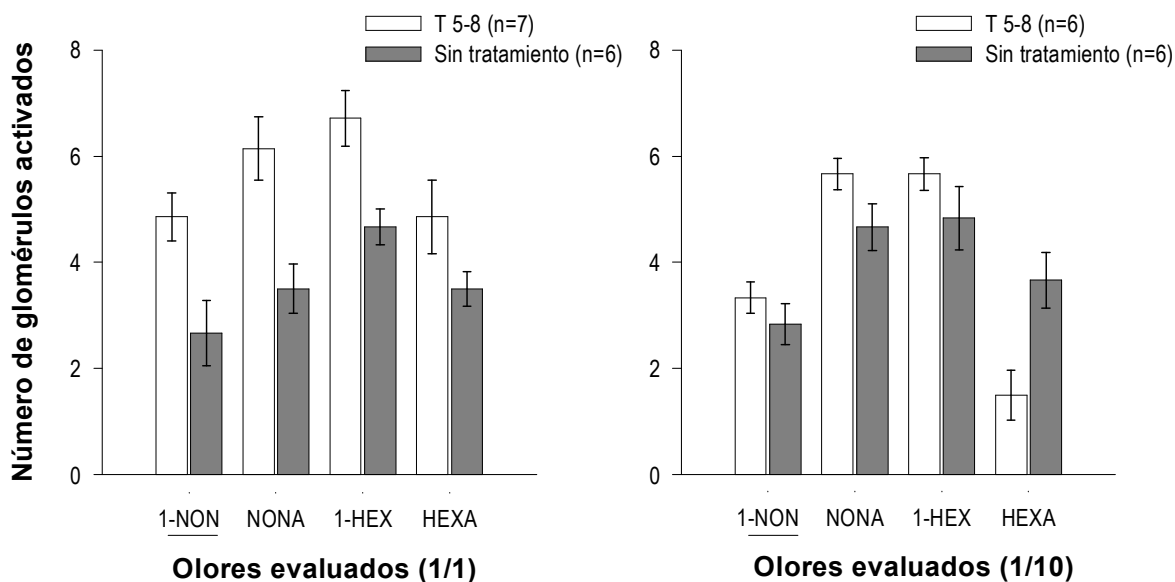


Fig. 4.6. Número de glomérulos en el LA de abejas de 17 días de edad. A) Número de glomérulos activados obtenidos para abejas tratadas con 1-NON y también para NONA, 1-HEX y HEXA como olores novedosos presentados a alta concentración (1/1). El ANOVA muestra una diferencia significativa entre las abejas tratadas y control (tratamiento factor, $p < 0.05$), pero también para diferentes olores novedosos (factor de olor, $p < 0.05$). B) Número de glomérulos activados por los mismos olores presentados a baja concentración (1/10). El ANOVA muestra una diferencia significativa entre el número de glomérulos suscitado por los olores novedosos cuando se presente a esta concentración. El número de glomérulos se calculó como el número de glomérulos que mostraron una amplitud de respuesta mayor al nivel de ruido. El tamaño de la muestra se presenta en la leyenda.

Una vez más, el aumento en el número de glomérulos no solo se detectó para el olor experimentado sino también para los novedosos: la interacción olor-tratamiento no fue significativa (ANOVA-Tratamiento-olor-1 / 1, $F = 0.317$, $p = 0.805$, $df = 3$). El número de glomérulos activados fue diferente para los distintos olores, tanto para las concentraciones altas como para las bajas (ANOVA-Olor-1 / 1, $F = 3.257$, $p = 0.033$, $df = 3$; medidas repetidas ANOVA-Olor 1 / 10, $F = 6.984$, $p = 0.001$, $df = 3$).

A continuación, nos preguntamos si las experiencias asociativas tempranas pueden cambiar los patrones de actividad glomerular de tal manera que la similitud perceptual entre los olores resulte modificada, en particular entre el olor experimentado y los olores novedosos. Para esto calculamos los coeficientes de correlación (r-valores) entre el olor de la solución aromatizada (1-NON) y los olores novedosos (NONA, HEX y HEXA). Una combinación perfecta entre los patrones de actividad glomerular entre dos olores daría como resultado un valor de r igual a 1 mientras que uno complementario -1 . En la Fig. 5.6 podemos ver los valores de r obtenidos entre el 1-NON y cada uno de los tres nuevos olores en base a los patrones de actividad de calcio en 19 glomérulos. Cualitativamente, los patrones evocados por 1-NON son muy parecidos a los de NONA, seguidos por los de 1-HEX y por último los de HEXA. En consecuencia, se encontró un efecto del olor para ambas concentraciones (ANOVA-Olor-1 / 1, $F = 10.750$, $p < 0.001$, $df = 2$; ANOVA-Odor-1/10, $F = 8.929$, $p = 0.002$, $df = 2$) que se explica por las diferencias en los valores de r entre 1-NON/NONA y 1-NON/HEXA (Scheffe *post hoc* 1 / 1, $P = 0.0009$; Scheffe *post hoc* 1/10, $p = 0.0024$) y 1-NON/1-HEX y 1-NON/HEXA (Scheffe *post hoc* 1 / 1, $p = 0.0074$; Scheffe *post hoc* 1 / 10, $p = 0.0217$). Si bien los pares 1-NON/NONA y 1-NON/1-HEX dieron como resultado una alta correlación positiva (probablemente porque muchos de los glomérulos más activos en uno estaban presentes también en el otro patrón), 1-NON/HEXA mostró un índice de correlación menor. Cabe señalar que la similitud encontrada entre los patrones de actividad glomerular encajan muy bien con los resultados

de comportamiento reportados anteriormente (Fig. 4.1 según Guerrieri et al. 2005). Del mismo modo nuestros resultados muestran coherencia con los niveles de generalización entre 1-NON y NONA obtenidos en los experimentos comportamentales (Fig. 4.2).

A pesar de las tendencias observadas entre los patrones de activación, la comparación de las similitud neuronales entre abejas tratadas y no tratadas para ambas concentraciones no mostró diferencias significativas (medidas repetidas de dos vías de tratamiento ANOVA-1 / 1, $F = 0.384$, $p = 0.547$, $df = 1$; ANOVA-Tratamiento-1/10, $F = 1.830$, $p = 0.205$, $df = 1$; Fig. 4.7).

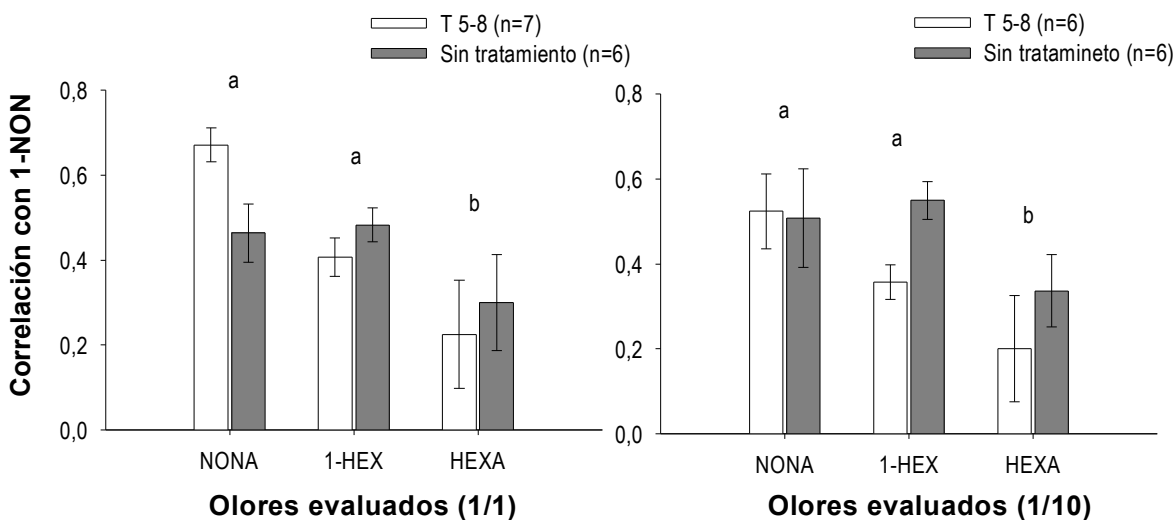


Fig. 4.7. Similitud fisiológica de olor en la AL de abejas de 17 días de edad. A) Índice de correlación (valores de r) entre el olor de solución (1-NON) y cada uno de los olores novedosos (NONA, 1-HEX y HEXA) presentados en alta concentración (1 / 1) y B) en baja (1/10). No se observaron diferencias significativas para el tratamiento, pero si entre pares de olores (ANOVA, olor factor, $p < 0,05$). Letras diferentes indican diferencias significativas en las comparaciones *post-hoc*. Tamaño de la muestra se presenta en la leyenda.

Para entender la relación entre las representaciones neuronales de los olores estudiados en abejas tratadas y sin tratar, proyectamos los patrones de actividad obtenidos

en un posible espacio perceptual de la abeja en el cual la actividad de cada glomérulo constituye una dimensión de dicho espacio perceptual (Fig. 4.8). Entonces realizamos un Análisis de Componentes Principales (ACP) para extraer aquellos factores que puedan explicar al menos en parte las variaciones observadas. Utilizando solo los tres primeros factores del ACP logramos explicar un 57,94% de la varianza total observada (31.9%; 12.31% y 8.86 % respectivamente Fig. 4.8). Para analizar mejor la contribución de cada uno de estos factores, también representamos nuestros resultados en gráficos de 2 dimensiones: Factor 1 vs. Factor 2 (Fig. 4.8B) y Factor 2 vs. Factor 3 (Fig. 4.8C). La Figura 5.7B muestra que el Factor 1, el cual provee la mayor contribución sobre la varianza, segrega las respuestas de acuerdo a su largo de cadena carbonada. De esta manera los estímulos de 9 carbonos aparecen claramente separados de los de 6. Sorprendentemente el Factor 2 segrega los datos de acuerdo a su grupo funcional (alcoholes vs. aldehídos, con los aldehídos en la parte superior y los alcoholes en la inferior). Sin embargo también presenta un componente que separa los datos de acuerdo a la experiencia temprana (Fig. 4.8B y 4.8C). Los datos de abejas experimentadas se concentran principalmente en la parte inferior del Factor 2 mientras que los no tratados en la superior. De hecho para una determinada concentración las abejas tratadas siempre aparecen sobre los animales control. Una mejor segregación de las representaciones neuronales fue observada para 1-NON, NONA y HEXA que para 1-HEX. Esto indica que la segunda contribución más importante a la varianza está dada por el aprendizaje olfativo temprano (Fig. 4.8).

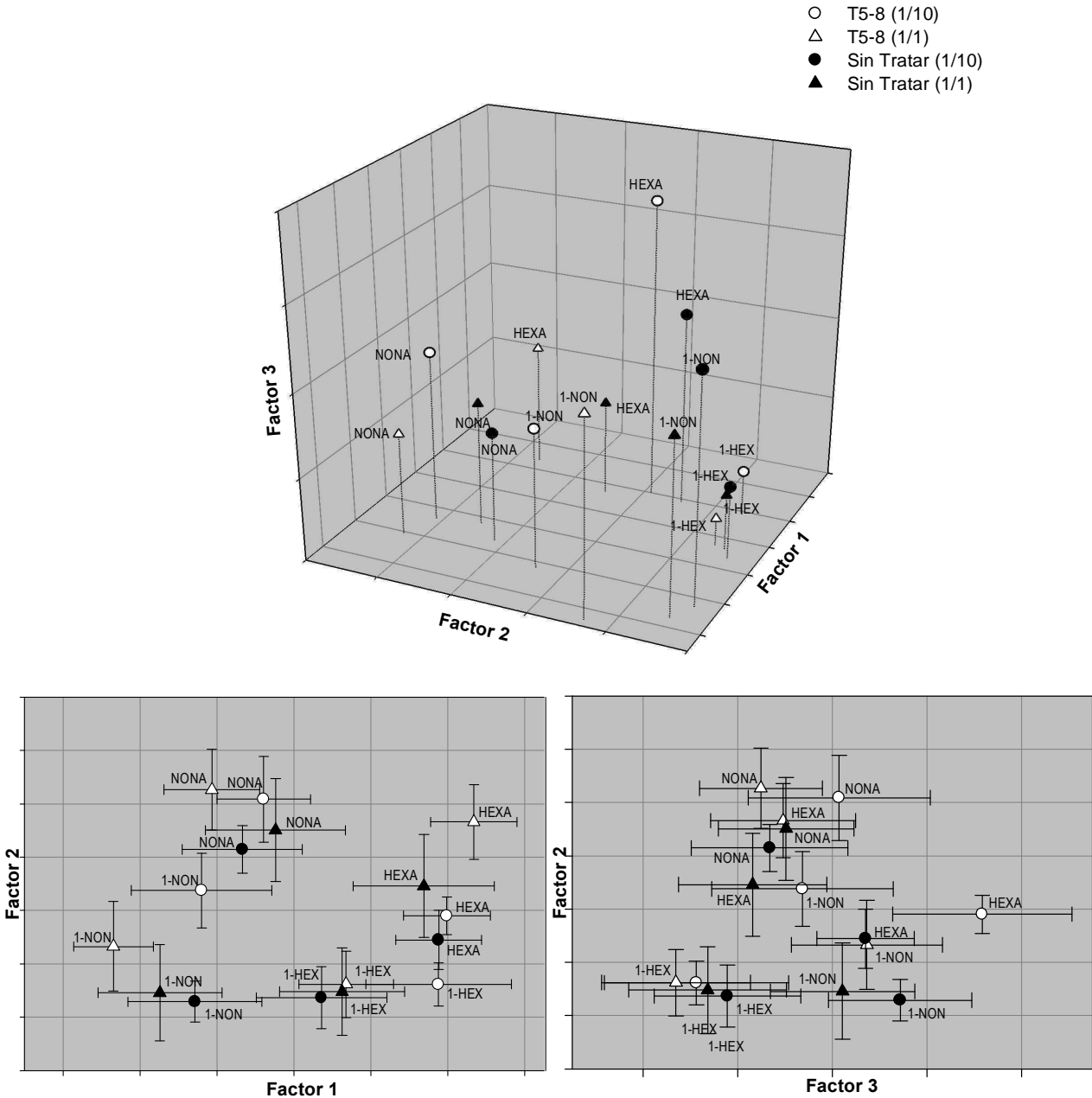


Fig. 4.8. Espacio olfativo de una abeja de 17 días de vida. A) Representación de la posición relativa de los patrones de actividad de acuerdo a los tres factores principales arrojados por el ACP que explican un 57,9 % de la varianza total de los datos. B) La representación de los olores según el Factor 1 y 2; y C) el Factor 2 y 3. Para una mejor ilustración de las representaciones de cada grupo solo mostramos los valores medios de las coordenadas obtenidas para el ACP. En B) y C) incluimos el error estándar de cada grupo (\pm S.E.). La posición de los patrones de activación glomerular de abejas con experiencia temprana se indican en blanco y de abejas sin tratamiento en negro. Las diferentes concentraciones se presentan con símbolos distintivos (círculos para la concentración baja y triángulos para la alta). Las características de los olores (largo de cadena carbonada claramente representado en el factor 1 el y grupo funcional representado en el Factor 2) el cual también segrega los datos de acuerdo a las experiencias precoces.

4.4 DISCUSIÓN

Se ha demostrado en los mamíferos que el aprendizaje asociativo de olores induce modificaciones funcionales persistentes a nivel neurofisiológico (Coopersmith y León, 1984; Sullivan y León, 1986; Wilson y León, 1988). Sin embargo en insectos los cambios en la actividad neuronal de estructuras olfativas se han detectado solo a corto plazo (por ejemplo en abejas: Faber et al., 1999; Faber y Menzel, 2001; en moscas: Yu et al. 2004; en polillas: Daly et al., 2004; en langostas: Bazhenov, 2005). En este trabajo mostramos por primera vez que el condicionamiento olfativo temprano modifica la actividad neuronal en el LA en largo plazo. Nuestros resultados indican que el patrón de actividad glomerular de un olor experimentado a los 5-8 días de edad resulta modificado al ser evocado a los 17 días, (cuando las abejas comienzan con las tareas de búsqueda de alimento; Rösch, 1925; Lindauer, 1952; Seeley, 1982). El olor condicionado presentado 9-12 días después generó una actividad glomerular aumentada a la vez que modificó la dinámica espacio-temporal de las respuestas del LA, cambios que se deberían a la memoria olfativa formada durante las experiencias tempranas.

Estos resultados confirman que el olor de los alimentos adquiridos en abejas de 5-8 días de edad puede ser recuperado muchos días después al ser evaluadas en abejas de 17 días de edad. En capítulos anteriores mostramos que contrariamente a lo que sería esperable por la simple extinción de la memoria por efecto del tiempo, la exposición al alimento con olor a los 5-8 días presentó niveles de retención más altos que cuando fue ofrecida a edades intermedias (9-12 días de edad). Debido al efecto no lineal de las experiencias olfativas tempranas, proponemos que la consolidación de las memoria olfativa adquiridas entre los 5 y 8 días podría provocar cambios funcionales y/o estructurales en el LA, en especial porque se sabe que el sistema olfativo termina de madurar exactamente en esta etapa (Masson y Arnold, 1987; Winnington et al., 1996). Sin

embargo, ya que no medimos el efecto de la experiencia olfativa durante otras ventanas temporales (por ejemplo a los 9-12 días de edad), aún no podemos concluir que el efecto observado sea específico para este periodo o generalizable a otras edades en que se recibe la experiencia sensorial.

En este capítulo mostramos que las experiencias tempranas pueden alterar los patrones de actividad glomerular en el primer centro de procesamiento de información olfativa de la abeja. En este sentido se ha propuesto que la plasticidad inducida por este tipo de experiencias en las estructuras primarias es más fuerte en los sistemas fisiológicos en desarrollo que en los ya maduros (Woo y León, 1987; Hamrick et al, 1993). Se sabe que las regiones periféricas del cerebro son más propensas a ser modificadas por la experiencia tempranas, mientras que las regiones centrales lo son a edades más avanzadas (véase también Wilson y Sullivan, 1994). Los cambios observados en abejas estimuladas tempranamente apoyan esta hipótesis y abren la posibilidad de que la estimulación adquirida a los 5-8 días de edad sea esencial para el correcto desarrollo y maduración del sistema olfativo (Gascuel y Masson, 1991; Masson et al., 1993). Un ejemplo claro del impacto de los olores en el desarrollo normal del sistema olfativo es el caso de la feromona mandibular de la reina. La exposición a este compuesto altera los niveles de dopamina en el cerebro de la abeja obrera (Beggs et al., 2007) mientras modifica drásticamente su capacidad de aprender estímulos aversivos (Vergoz et al., 2007).

Las pruebas encontradas de que el LA de la abeja es un sitio para la formación de la memoria olfativa de corto término (martillo y Menzel, 1998; Müller, 2000) y de plasticidad (Faber et al., 1999; Sandoz et al., 2003) fue confirmado en otros modelos como *Drosophila* (Yu et al., 2004). Datos electro fisiológicos en langostas (Bazhenov et al., 2005) y en polillas (Daly et al., 2004) también apoyan el rol del LA en la formación de memoria olfativas de corto plazo. Recientemente sin embargo, se observó que las neuronas de

proyección del LA de *Drosophila* participan en la formación de memorias de largo plazo induciendo patrones de síntesis de proteínas que son específicos para cada olor aprendido (Ashraf et al., 2006) los que fueron detectados incluso 24 horas después de la formación de la memoria. En concordancia con estos resultados, nuestros experimentos de colorimetría revelaron que los patrones de respuestas del LA continúan siendo modificados incluso 9-12 días después de la experiencia olfativa.

Sin embargo, algunas observaciones deben realizarse en el momento de interpretar los resultados de nuestros experimentos. En primer lugar, debido al procedimiento de tinción de baño en donde todo el cerebro de la abeja resulta marcado, las señales de fluorescencia obtenidas podrían representar la actividad de un conjunto de neuronas pertenecientes incluso a distintas poblaciones dentro del LA (neuronas receptores olfativas, inter-neuronas, neuronas de proyección, o incluso de células gliales; Lohr et al., 2002). Entre ellas las que responden a información aferente parece hacer la contribución más importante a esta señal (Galicia et al., 1998; Vetter y Galicia, 2005). Segundo, nuestros registros opto-fisiológicos solamente describen la porción dorsal del LA, que es la región accesible al abrir la capsula de la cabeza (~12% de los ~160 glomérulos del LA de la abeja), por lo que no podemos excluir la posibilidad de que las experiencias precoces tengan un efecto diferente en otras regiones del LA. Además, a pesar de que los cambios encontrados muestran una buena correlación con las respuestas de comportamiento en etapas tardías, se debe tener en cuenta que otras regiones del cerebro como los cuerpos pedunculados también podrían intervenir en estos procesos (Hammer y Menzel, 1998).

Un importante hallazgo de nuestro estudio fue que, al igual que las abejas que experimentaron 1-NON en el alimento generalizaron su respuesta frente a un olor similar (NONA) en los experimentos de comportamiento, la plasticidad observada a nivel del LA no sólo se observó para las respuestas del olor experimentado (1-NON), pero también a olores novedosos. Las presentaciones de NONA y 1-HEX generaron un aumento en la

actividad generales del LA (Fig. 4.5) y un número mayor de glomérulos activados (Fig. 4.6). Este efecto fue algo menor para HEXA, el olor perceptualmente mas disímil con el olor condicionado, 1-NON (véase Fig. 4.1). Así, encontramos una tendencia general hacia una mayor plasticidad en olores con alta similitud con el experimentado.

Esta conclusión está avalada por el ACP (Fig. 4.8), el cual identificó al largo de cadena carbonada y al grupo funcional como factores fundamentales que describen la variación en nuestro conjunto de datos. Más importante aún, mostramos que uno de los principales factores que explican la distribución de las representaciones neuronales se debió al aprendizaje olfativo temprano ya que segrega abejas tratadas de no tratadas. Esta observación enfatiza el hecho de que el aprendizaje precoz induce cambios consistentes y de muy largo término en la actividad del LA de abejas recompensadas a los 5-8 días de vida.

Curiosamente, la misma observación se hizo en un estudio anterior, en el que después de condicionar diferencialmente a las abejas (un olor recompensado y otro sin recompensar), la intensidad de la respuesta glomerular se incrementó para el olor condicionado positivamente pero también para un olor novedosos y desconocido para las abejas. Por otro lado la respuesta al olor no recompensado se mantuvieron sin cambios (Faber et al., 1999). Por lo tanto concluimos que la exposición olfativa temprana parece afectar tanto la conducta como las respuestas neuronales del condicionado además de otros olores novedosos de acuerdo con su similitud perceptual.

En nuestro estudio el efecto del aprendizaje temprano se observó claramente para ambas concentraciones (1 / 1 y 1 / 10). Sin embargo los efectos sobre la actividad general del LA y el número de glomérulos reclutados fueron significativos sólo cuando las respuestas se evaluaron a concentración alta (1 / 1). Se sabe que el aumento en la

intensidad de un olor puede cambiar su patrón de activación glomerular, llevando incluso a diferencias cualitativas entre los patrones de un mismo olor (Sachse y Galicia, 2003) y afectando también la percepción cualitativa en experimentos de comportamiento (Ditzen et al., 2003; Wright et al., 2005). Como en nuestro estudio no pudimos conocer la concentración del olor experimentado por las abejas durante la oferta de alimento aromatizado, podemos interpretar que una respuesta más clara frente a la concentración alta indica que esta pudo haber sido percibida como más similar a la ofrecida durante la adquisición.

En conclusión, el LA que participa en el procesamiento de la información olfativa también podría estar implicado en el almacenamiento de los primeros recuerdos de olores.

5

El aprendizaje asociativo a edades tempranas mejora la retención de memorias de largo término

5.1 INTRODUCCIÓN

Las respuestas comportamentales de los animales están continuamente modificadas por las experiencias sensoriales adquiridas en su entorno. Sin embargo, este fenómeno es mucho más pronunciado en las primeras etapas de vida, cuando las experiencias pueden causar efectos irreversibles en el comportamiento del individuo maduro (Lorenz, 1935). Desde los mamíferos hasta los insectos se ha demostrado que el aislamiento a edades tempranas o la cría en ambientes empobrecidos tiene consecuencias negativas sobre las habilidades cognitivas del adulto, llevando en casi todos los casos a un aprendizaje más lento o a una peor retención de las memorias (Oitzl et al., 2000; Iso et al., 2007; Ichikawa y Sasaki, 2003). En los seres humanos, se sabe que el desarrollo del habla depende principalmente de la presencia de los estímulos adecuados en el medio ambiente. La ausencia de modelos del habla en los niños parecería afectar negativamente a la adquisición del lenguaje (Neal, 1972), mientras que la exposición a un entorno multilingüe parece mejorar los resultados de aprendizaje (Bialystok, 2001).

En el capítulo anterior vimos que las experiencias olfativas tempranas que se forman en un contexto apetitivo pueden ser recordadas varios días después dependiendo tanto del momento en que se adquiere la información como del medio ambiente en donde se desarrolla el individuo como adulto. Sin embargo, si la exposición o el aprendizaje de

olores durante periodos específicos mejoran la retención de nuevos eventos de aprendizajes aún requiere de ser probado. Cuando las abejas condicionadas con un único olor a los 5-8 días de edad fueron criadas privadas de estímulos sociales, presentaron niveles de retención mayores que las condicionadas a los 9-12 días de edad (Fig. 3.5) sin embargo estas diferencias no pudieron ser detectadas cuando los individuos se criaron dentro de colmenas (Fig. 3.6). Por lo tanto, es posible que las memorias establecidas a edades con bajos niveles de retención (es decir a los 9-12 días) sean retenidas mejor luego de recibir una entrada sensorial apropiada. Para probar esta hipótesis expusimos a distintos grupos de abejas a una experiencia olfativa recompensada inmediatamente (1-4 días de edad) o pocos días (5-8 días de edad) después de que emergen como adultas. Para separar el efecto de las experiencias recompensadas de aquellas estimulaciones sensoriales no recompensadas, también expusimos distintos grupos a la estimulación con compuestos volátiles presentados de forma pasiva en el ambiente.

5.2 MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1 Sitio de estudio y los animales

Los experimentos se llevaron a cabo en la temporada de verano 2007/2008 en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (34 ° 32'S, 58 ° 26'W). Abejas obreras de edad conocida se obtuvieron de cuadros de cría sellada desde una incubadora a 36 °C, 55% de humedad relativa y oscuridad. Como en los experimentos anteriores (3.2.1) las obreras que emergían eran recogidas en grupos de 100 abejas que eran confinadas en jaulas de madera (10 cm x 10 cm x 10 cm). Las abejas enjauladas eran alimentadas con solución de azúcar 1.8M, agua y polen *ad libitum* y mantenidas a 32 °C, 55% de humedad relativa y en oscuridad hasta alcanzar la edad de 17 días cuando fueron evaluadas en el paradigma de REP.

5.2.2 Procedimiento experimental

5.2.2.1 Abejas condicionadas con alimento aromatizado

La oferta de alimentos aromatizados se utilizó como un método no invasivo para condicionar olfativamente a las abejas jóvenes (Farina et al., 2005). El alimento aromatizado se ofreció dentro de las jaulas, cuando las abejas alcanzaban los 1-4, 5-8 ó 9-12 días de edad (Fig. 5.1A). Dentro de estos períodos, el alimento aromatizado permanecía dentro de las jaulas como única fuente de azúcar. Los tres tratamientos (1-4, 5-8 o 9-12 días) se repitieron utilizando Linalool (LIO) y Fenilacetaldehido (PHE) como estímulos condicionados diluidos en la solución de azúcar (más detalles en 3.2.3.2).

5.2.2.2 Abejas estimuladas con solución antes de ser condicionadas olfativamente

Con el fin de determinar el efecto de una experiencia olfativa sobre el aprendizaje asociativo posterior, los grupos de abejas que recibieron una solución de azúcar aromatizada como experiencia temprana a los 1-4 y 1-4 ó 5-8 también fueron condicionados con el mismo procedimiento a los 5-8 ó 9-12 días de edad. Como resultado obtuvimos 3 grupos experimentales distintos que fueron alimentados con alimento aromatizado durante 8 días (a los 1-4 + 5-8, 5-8 + 9-12 y 1-4 + 9-12 días de edad; Fig. 5.1B). Mientras que las memorias establecidas durante los primeros 4 días no fueron evaluadas, las establecidas en el segundo periodo se cuantificaron en 5 eventos de extinción cuando las abejas alcanzaron los 17 días de edad. Cuando LIO fue utilizado para aromatizar la solución durante el segundo periodo (olor evaluado), PHE se utilizó para aromatizar el alimento en el primer periodo (olor no evaluado) y viceversa.

5.2.2.3. Abejas expuestas a un compuesto volátil antes de ser condicionadas

Siguiendo el mismo diseño que en el experimento anterior, las abejas criadas en jaulas fueron expuestas a un olor puro que se presentó como compuesto volátil (olor no evaluado) antes de la oferta de alimento aromatizado. Para llevar a cabo la exposición del olor, las jaulas de abejas se trasladaron a otra incubadora (mismas condiciones de temperatura, humedad relativa y la oscuridad) y se colocaron dentro de cajas de plástico (80.5 cm x 48 cm x 35 cm). Las mismas presentaban 300 µl de olor puro embebido en 3 papeles de filtro (20 cm² de superficie de evaporación total) pegados sobre las paredes de la caja. Para reducir la acumulación del olor durante la exposición, utilizamos un extractor de aire conectado a la incubadora.

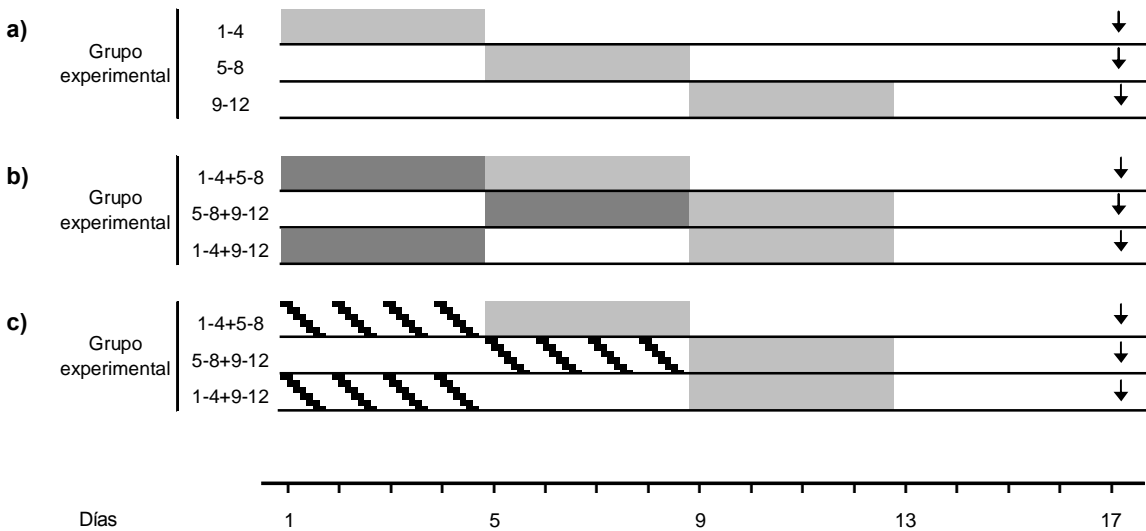


Fig. 5.1. Esquema de los distintos protocolos de estimulación a lo largo de la vida de la abeja para las diferentes series experimentales. a) Abejas que recibieron solución de azúcar aromatizada durante cuatro días consecutivos (recuadros de color gris) y fueron evaluadas a los 17 días de edad en 5 eventos de extinción en el paradigma de REP (flecha negra). b) Adicionalmente a la oferta de alimento aromatizado descrito en a) las abejas recibieron una segunda estimulación con solución de azúcar aromatizada durante los 1-4 ó 5-8 días de edad la cual no fue evaluada (recuadros de color gris oscuro). c) Abejas que fueron expuestas pasivamente a olores volátiles por cuatro días (recuadros rallados) antes de recibir solución de azúcar aromatizado (recuadros grises). Las memorias de los olores expuestos no fueron evaluadas.

Después de la exposición olfativa, las jaulas fueron reemplazadas por otras nuevas y devueltas a la primera incubadora para prevenir la contaminación de olores durante periodos de no exposición. Cuando utilizamos LIO como olor recompensado (olor evaluado), PHE se utilizó como olor expuesto.

5.2.3 Evaluación en el REP

A lo largo de las distintas series de este experimento las memorias de largo plazo se cuantificaron en cinco eventos de extinción (10-min. de intervalo entre ensayos). En este tipo de evaluación múltiple generalmente se considera al primer evento de extinción como la "retención" de la memoria mientras que se habla de "extinción" al considerar el curso de la respuesta a lo largo de los cinco eventos de evaluación. Cada ensayo de extinción duró 40 segundos. Antes de la presentación de olor, las abejas permanecieron 15 s frente al flujo de aire para evaluar su respuesta mecánica. Las respuestas condicionadas se midieron durante los 6s en que se presentó el olor (más detalles en 3.2.2).

5.2.4 Estadísticas

Para comparar las REP de los distintos grupos etáricos utilizamos un análisis de varianza para medidas repetidas (RM-ANOVA). Los estudios de Monte Carlo han demostrado que se posible utilizar ANOVA en datos dicotómicos (Lunney, 1970). En los casos en que se detectaron diferencias estadísticas en los factores principales realizamos comparaciones *a posteriori* (LSD de Fisher).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Abejas condicionadas con alimento aromatizado

Diferentes experiencias olfativas tempranas generaron diferencias en los niveles de retención. Para ambos olores (LIO y PHE) las abejas estimuladas a los 5-8 días de vida exhibieron los niveles de RC más altas. El ANOVA mostró diferencias significativas entre las clases de edades (LIO: $F_{2,115} = 3.907$, $p < 0.021$; PHE: $F_{2,160} = 7.203$, $p = 0.001$; Fig.5.2a y 5.2b) y los eventos de extinción (medida repetida, LIO: $F_{2,159} = 3.38$, $p = 0.036$; PHE: $F_{2,131} = 5.08$, $p = 0.007$; Fig. 5.2a y 5.2b). Las comparaciones *a posteriori* evidenciaron diferencias significativas entre los grupo 1-4 y 5-8 y entre 5-8 y 9-12 días de edad (LIO: $p_{1-4 \text{ vs } 5-8} = 0.022$, $p_{5-8 \text{ vs } 9-12} = 0.03$; PHE: $p_{1-4 \text{ vs } 5-8} = 0.009$, $p_{5-8 \text{ vs } 9-12} = 0.005$; Fig. 5.2a y 5.2b). Por otro lado, no se detectaron diferencias entre abejas alimentadas con solución aromatizada a los 1-4 y 9-12 días de edad ni tampoco en las interacciones entre los grupos de edad y los eventos de extinción, lo que sugiere que la dinámica de extinción de las memorias es similar entre las clases de edad (LIO: $F_{8,636} = 1.58$, $p = 0.127$; PHE: $F_{8,524} = 0.99$, $p = 0.436$; Fig. 5.2a y 5.2b).

5.3.2 Abejas estimuladas con dos solución aromatzadas

Cuando ofrecimos dos soluciones de azúcar aromatzadas dentro de las jaulas, los niveles de RCs en abejas de 9-12 días de edad aumentaron. En consecuencia sólo detectamos diferencias significativas entre los eventos de extinción (LIO: $F_{2,81} = 0.61$, $p = 0.547$, Fig. 5.2c; PHE: $F_{2,93} = 1.19$, $p = 0.307$, Fig. 5.2d). No encontramos diferencias ni para las clases de edad (LIO: $F_{4,324} = 32.97$, $p < 0.001$; PHE: $F_{4,372} = 24.77$, $p < 0.001$; Fig. 5.2c y 5.2d) ni para la interacción entre factores (LIO: $F_{8,324} = 0.27$, $p = 0.974$; PHE: $F_{8,372} = 0.52$, $p = 0.844$). Esto sugiere nuevamente que los procesos de extinción son similares entre

tratamientos, apoyando la idea de que las experiencias olfativas tempranas mejoran la retención de las abejas condicionadas a los 9-12 días de edad.

5.3.3 Abejas expuestas a un compuesto volátil antes de ser condicionadas

Como vimos en abejas alimentadas con una única solución aromatizada, en este experimento también encontramos diferencias en la RC cuando expusimos a las abejas a LIO antes de condicionarlas a PHE ($F_{2, 105}=3.42$, $p=0.036$; Fig. 5.2e). Los contrastes mostraron que las respuestas obtenidas para 1-4+5-8 fueron diferentes a las obtenidas en abejas de 5-8+ 9-12 y 1-4+9-12 días de edad ($p_{1-4+5-8 \text{ vs } 5-8+9-12}=0.026$, $p_{1-4+5-8 \text{ vs } 1-4+9-12}=0.026$, Fig. 5.2e). Sin embargo no encontramos diferencias entre los grupos que fueron expuestos a PHE en de medio ambiente seguidos por la oferta de alimento con olor (LIO: $F_{2, 147}=2.21$, $p=0.114$; Fig. 5.2f). El análisis estadístico también reveló diferencias significativas entre los eventos de extinción para ambos olores: LIO y PHE (LIO: $F_{4, 588}=66.96$, $p<0,001$, Fig. 5.2e; PHE: $F_{4, 420}=35.53$, $p<0.001$; Fig. 5.2f) No se han detectado interacciones en este experimento (LIO: $F_{8, 588}: F=1.72$, $p=0.091$; PHE: $F_{8, 420}=1.54$, $p=0.142$). Así el efecto de la exposición temprana de olores sobre la retención de la memoria depende de la identidad del olor y el momento en que ocurre la exposición.

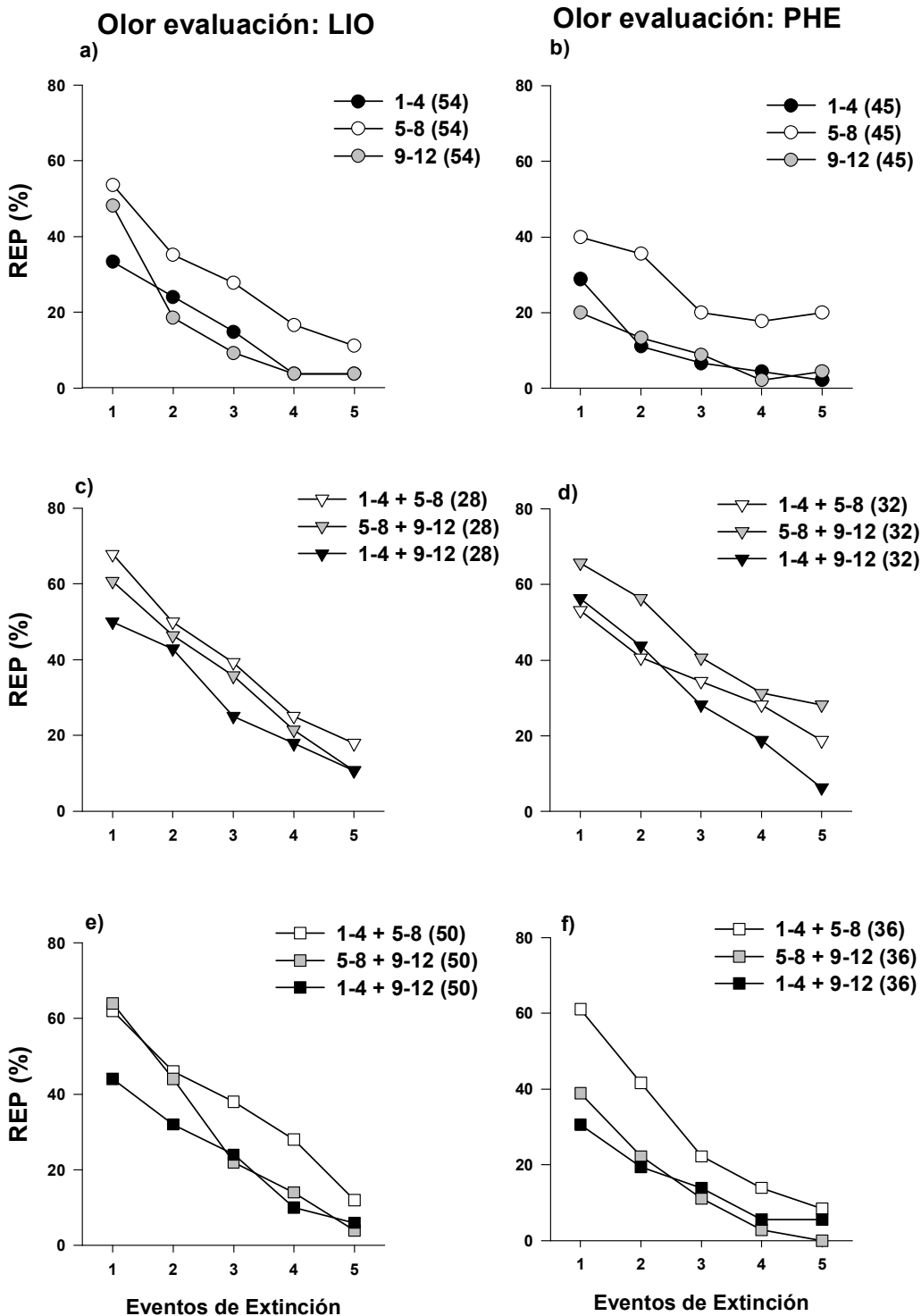


Fig. 5.2. Memorias olfativas tempranas en abejas de 17 días de edad. LIO (panel de la izq.) o PHE (panel de la der.) fueron usados como olores de evaluación cuando LIO (a) o PHE (b) fueron ofrecidos solos en la solución de azúcar (*círculos*); cuando PHE (c) o LIO (d) fue utilizado como olores no evaluados usados alternativamente para aromatizar el alimento (*triángulos*); y cuando PHE (e) o LIO (f) fueron usados como olor no evaluado expuestos como volátiles en el ambiente (*cuadrados*). El tamaño de la muestra se indica entre paréntesis en la leyenda.

5.4 DISCUSIÓN

En este capítulo mostramos por primera vez que los estímulos olfativos que se experimentan en las primeras etapas de vida del insecto mejoran la retención de las memorias. Por un lado las estimulaciones asociadas a recompensa que tienen lugar durante los primeros cuatro días de edad o incluso durante los cuatro días siguientes (5-8 días de edad) generan un aumento en los niveles de retención de las memorias de largo plazo que se adquieren varios días después (Fig. 5.2c y 5.2d). Por otra parte, la exposición pasiva de volátiles en el entorno de la jaula también mejora la retención de las memorias de largo plazo adquiridas a edades intermedias (9-12 días), aunque su efecto se limita a la interacción entre la identidad del olor y el momento de la exposición (es decir estos niveles se incrementaron sólo cuando PHE fue expuesto inmediatamente antes del condicionamiento).

Ambos tipos de experiencias olfativas, recompensadas y no recompensadas, podrían actuar facilitando el aprendizaje y la retención del mismo tipo de información en un momento posterior. Sin embargo, diferentes resultados para cada tipo de experiencia sugieren diferentes mecanismos por el cual la retención de la memoria es mejorada. Ahora se sabe que incluso las abejas recién emergidas son capaces de adquirir y almacenar información de olores recompensados de forma asociativa (Behrends y Scheiner, 2009), un proceso que induce cambios en el circuito olfativo en el lóbulos antenal y que afecta el procesamiento y la consolidación de la información de olores (Faber et al., 1999; Daly et al., 2004, ver capítulo 4). Estos cambios podrían fortalecer las vías olfativas permitiendo una mejor recuperación de aquella información adquirida a una edad muy temprana, pero también la que se adquirió más tarde por ejemplo cerca de las edades en donde las abejas comienzan las tareas de recolección.

Existe evidencia de que la exposición pasiva de olores no forma memorias de largo

plazo (Fernandez et al., 2009). Por lo tanto la posibilidad de que una mejora en la retención de abejas expuestas a 5-8 + 9-12 días de edad se deba a cambios inducidos por el aprendizaje que persisten en el cerebro es poco plausible. Sin embargo, se ha demostrado que la exposición de ciertos compuestos como los feromonales también pueden alterar el desarrollo normal del sistema olfativo. En particular la feromona mandibular de la reina altera los niveles de dopamina en el cerebro de las abejas obreras jóvenes (Beggs et al., 2007) afectando su desempeño durante el condicionamiento aversivo (Vergoz et al., 2007). Alternativamente, la exposición a PHE entre el 5^o y 8^o día podría sensibilizar a los animales en el corto plazo, facilitando la posterior adquisición de señales olfativas y mejorando la resistencia a la extinción de los nuevos eventos de aprendizaje.

Nuestros resultados sugieren fuertemente que las experiencias olfativas durante la primera semana (sobre todo las adquiridas en un contexto apetitivo) son fundamentales para el desarrollo de las habilidades de retener memoria, al menos en abejas de 9-12 días de edad. Como propusimos en capítulos anteriores, las experiencias con olores podrían ser importantes para la correcta maduración de las vías olfativas (Masson et al., 1993). Por lo tanto, es posible que las abejas jóvenes tengan que ser sometidos a una constelación de estímulos quimio-sensoriales (como los olores en el alimento o del entorno en donde se desarrollan) para mejorar las habilidades de aprender y retener información de olores a edades más avanzadas (Winnington et al., 1996; Maleszka y Helliwell, 2001; Farris et al., 2001).

Varios autores sostienen que el desarrollo en un entorno repleto de estímulos debe ser la situación natural en el desarrollo de animales, mientras que la privación de estímulos es a menudo una situación artificial que da lugar a anomalías en el comportamiento (Sahakian et al., 1975, Lodge et al., 2003). En la abeja melífera, observamos que las experiencias olfativas tempranas (principalmente aquellas recompensadas) impiden el déficit en las memorias olfativas establecidas a edades

intermedias y en medio ambientes empobrecidos de estímulos. La privación de estímulos, por lo tanto, representaría una situación artificial que deja ver que la capacidad de las abejas para retener memorias olfativas depende de la edad.

6

Discusión general

Como vimos a lo largo de esta Tesis, la abeja de la miel presenta muy buenas habilidades para aprender y memorizar estímulos ambientales asociados a recompensa (von Frisch, 1967; Menzel 1999; Giurfa, 2004). En estudios previos estas habilidades se estudiaron extensamente en el condicionamiento de REP utilizando en la mayoría de los casos abejas recolectoras (por ej. Bitterman et al., 1983; Menzel y Müller, 1996; Erber et al., 1998; Giurfa, 2004). Solo unos pocos estudios abordaron el aprendizaje en abejas jóvenes (Ray y Ferneyhough, 1997; Morgan et al., 1998; Pham-Delègue et al., 1990; Laloï et al., 2001; Behrends y Scheiner, 2009). Sin embargo, no existía evidencia hasta el momento del rol que tenía el aprendizaje olfativo precoz sobre los comportamientos de abejas adultas de edades avanzadas ni de sus posibles implicancias ecológicas en la recolección del néctar.

6.1 Aprendizaje olfativo en abejas jóvenes

Estudios anteriores describieron que las abejas jóvenes presentan respuestas condicionadas pobres y poco constantes al entrenarlas con estímulos olfativos en el laboratorio antes de los 6/7 días de edad (Ray y Ferneyhough, 1997; Morgan et al., 1998; Ichikawa y Sasaki, 2003). Esto no es trivial ya que se cree que a pesar de que la metamorfosis se completa antes de emerger, la maduración del sistema olfativo continúa por varios días después de la eclosión. En nuestro estudio, observamos porcentajes de

respuesta altos y homogéneos en todos los grupos etarios (el más bajo fue del 71% para las abejas condicionadas a los 4 días de edad, Fig. 3.3B), lo que indica que las diferencias observadas en la recuperación de la memoria olfativa a edades recolectoras (al menos para las abejas condicionadas clásicamente) no pueden ser fácilmente explicadas por diferencias en las habilidades de aprender de los grupos.

Estos resultados aparentemente contradictorios podrían explicarse por los diferentes entornos de cría usados en los distintos estudios. Por otro lado, la concentración de azúcar de la solución utilizada como recompensa también podría representar una explicación posible. Si bien en los diferentes capítulos se utilizó una solución de azúcar 1.8M, en otros estudios (por ejemplo, Pham-Delègue et al., 1990, Ray y Ferneyhough, 1997; Laloï et al., 2001) los condicionamientos fueron realizados utilizando concentraciones más bajas (cerca de 1 M). En este sentido, las diferencias en el umbral de respuesta al azúcar podrían explicar las variaciones en el desempeño de las abejas cuando diferentes concentraciones de solución de azúcar se utilizan como recompensa durante el aprendizaje (Scheiner et al., 2001). Otros autores (Pham-Delègue et al., 1990; Laloï et al., 2001) también vieron que las abejas recién emergidas podían aprender. En particular Behrends y Scheiner, (2009) mostraron que incluso abejas de 1-2 días de edad eran capaces de establecer asociaciones estables entre una recompensa de sacarosa y un olor si presentaban un cierto nivel de respuesta al azúcar basal.

6.2 Experiencias tempranas y maduración del sistema olfativo

A lo largo de las distintas series experimentales observamos que el olor de los alimentos adquiridos en abejas de 5-8 días de edad puede ser recuperado muchos días después, al ser evaluados a los 17 días. En los capítulos anteriores (3, 4 y 5) mostramos que

contrariamente a lo que cabría esperar por la simple extinción de la memoria por efecto del tiempo, la exposición al alimento con olor a los 5-8 días presentó niveles de retención más altos que cuando la misma experiencia fue ofrecida a edades intermedias (9-12 días de edad). Debido al efecto no lineal de estas experiencias, proponemos que la consolidación de las memoria olfativa adquiridas entre los 5 y 8 días podría provocar cambios específicos en los circuitos olfativos, en especial porque se sabe que el sistema olfativo termina de madurar exactamente en esta etapa (Masson y Arnold, 1987; Winnington et al., 1996).

Estudios sobre la ontogenia del sistema olfativo de este insecto han sugerido la existencia de un período a partir de 3 días antes a 4-8 días después de que emerja como adulto durante el cual el sistema olfativo permanece muy flexible a los cambios ambientales (Masson et al., 1993). En este sentido, la ausencia de linealidad encontrada entre los niveles de RC de distintos grupos etarios y el intervalo adquisición/evaluación de las memorias tempranas, es consistente con la hipótesis anterior, en donde el periodo comprendido entre los 5-8 días de la vida parecería presentar una sensibilidad más alta para adquirir/retener memorias olfativas. Por lo tanto, la consolidación de estas memorias podría tener lugar a través de cambios que modifican la estructura y/o las funciones del sistema olfativo durante la fase final de su maduración.

En el capítulo 4 mostramos que el aprendizaje de olores entre los 5-8 días de edad afecta los patrones de actividad glomerular a largo término. El olor condicionado evocó respuestas de actividad neuronal aumentadas y patrones espacio-temporales alterados con respecto a aquellos evocados por el mismo olor en grupos que no fueron estimulados. Estos cambios podrían ser el sustrato responsable de las memorias olfativas establecidas precozmente. Aunque hasta el momento solo había evidencia de que LA podía almacenar memorias olfativas de corto término, nuestros resultados sugieren que también podría ser una estructura que guarda información de olores a muy largo plazo. Una posibilidad para

explicar porque no se han detectado MLT en el LA de abejas maduras es que las memorias se almacenen en distintas estructuras dependiendo del grado de desarrollo en el que se encuentran cada estructura cuando se produce la consolidación. Sin embargo, aunque en insectos maduros las MLT se han ligado con los cuerpos pedunculados (Pascual y Prát, 2001; Maleska et al., 2009) aun no existen pruebas contundentes de que sea así.

6.3 Experiencias tempranas mejoran la retención de memorias olfativas

A lo largo de esta Tesis, se repitió la tendencia de que las abejas estimuladas con solución aromatizada a los 9-12 días de edad presentaban niveles de retención aumentados cuando eran sometidas a algún tipo de experiencia olfativa previa al condicionamiento (controlada o no). Este fenómeno se observó cuando las abejas condicionadas a edad intermedia fueron criadas dentro de la colmena, (Fig. 3.6) o aún habiendo sido criadas en jaulas, recibieron experiencias olfativas que antecedieron al condicionamiento (Fig. 3.7, 5.2c y 5.2d).

En el capítulo 5 mostramos que las experiencias olfativas tempranas (ya sea las adquiridas a los 1-4 ó 5-8 días de edad) pueden aumentar la retención de un olor que se aprendió a los 9-12-días, cuando se lo evalúa a los 17 días de vida. Los niveles más altos de retención a esta edad fueron obtenidos para memorias establecidas en abejas entre el 5^{to} y 8^{vo} día de vida, los cuales no resultaron ser mejorados con las experiencias anteriores. Por otro lado las memorias asociativas adquiridas a los 9-12 días de edad mostraron un débil efecto sobre la retención para los olores pre-expuestos, el cual se observó solo cuando el compuesto volátil se ofreció inmediatamente antes del condicionamiento. Estos resultados sugieren que los eventos de aprendizaje asociativo que ocurren pocos días después de la eclosión mejoran las memorias establecidas a edades intermedias (Fig. 5.2c y 5.2d). El

momento y la naturaleza de la estimulación sensorial precoz parecen interactuar para mejorar la retención de los eventos de aprendizaje que se adquieren más tarde en la vida de una abeja.

Las experiencias con olores podrían ser importantes para la correcta maduración de las vías olfativas y parece plausible que las abejas jóvenes tengan que ser sometidos a una constelación de estímulos quimio-sensoriales para lograr buenas habilidades de aprender y retener información de olores a edades más avanzadas (Winnington et al., 1996; Maleszka y Helliwell, 2001; Farris et al., 2001). Un ejemplo claro del impacto de los olores en el desarrollo normal del sistema olfativo es el caso de la feromona mandibular de la reina. La exposición a este compuesto altera los niveles de dopamina en el cerebro de la abeja obrera (Beggs et al., 2007) mientras modifica drásticamente su capacidad de aprender estímulos aversivos (Vergoz et al., 2007).

Una vez más, un LA más activo y con un mayor número de glomérulos involucrados en la representación del olor condicionado precozmente (pero también de otros olores novedosos similares), podrían corresponder a modificaciones en el sustrato neuronal inducidos por el aprendizaje asociativo. En otras palabras, las modificaciones detectadas en las representaciones espacio-temporales de los olores serían responsables, al menos en parte, de una mejor recuperación de la información que se adquiere a edades intermedias bajo condiciones de laboratorio.

6.4 ¿Periodo crítico en la abeja?

Durante un corto período durante las primeras etapas de la vida, la presencia o ausencia de una experiencia sensorial particular puede modificar el comportamiento de los animales de forma permanente. Probablemente el ejemplo más extremo es el de

“imprinting”, un proceso por el cual el animal adquiere una referencia permanente a partir de un patrón de estímulos que se le presenta durante un periodo crítico o sensible de su desarrollo, y que permanece estable durante el resto de su vida. En 1935, Lorenz logró que gansos recién salidos del huevo generaran una impronta sobre él (“imprinting”), por lo cual lo identificaban y seguían como si fuese su propia madre. Lorenz propuso que el “imprinting” difería de un aprendizaje asociativo verdadero en varios aspectos. Primero porque está confinado a un periodo breve: el periodo sensible. Segundo, porque una vez realizada la impronta es irreversible.

Otros procesos como el lenguaje en humanos, el canto de aves (Immelmann, 1969; Kuhl, 2003; 2004) y la orientación del salmón (Harden Jones, 1968) también se han observado que ocurren durante periodos sensibles o crítico. Un período crítico se define como un momento durante la vida temprana en la que el desarrollo y la maduración de las propiedades funcionales del cerebro se ven fuertemente influido por las experiencias y las condiciones ambientales (Sengpiel, 2007). En la visión de mamíferos Wiesel y Hubel (1963) demostraron que la plasticidad a través de la interacción binocular también se manifestaba durante un periodo crítico. Durante este periodo se observó que la privación monocular e incluso las alteraciones en las entradas sensoriales (por ejemplo las causadas por el estrabismo) causan una pérdida permanente de la agudeza visual (ambliopía) en el ojo privado, un fenómeno que es evidente sólo cuando la manipulación de las entradas sensoriales se realiza temprano en el desarrollo.

El sistema olfativo de la abeja en cambio, parecería no presentar un periodo crítico para la retención de olores florales. A pesar de que la abeja exhibe una sensibilidad aumentada frente a ciertos estímulos ambientales a los 5-8 días de vida, la ausencia de esta estimulación no genera efectos irreversibles en el animal. Las abejas privadas de estimulaciones olfativas controladas durante los 5-8 días de edad pueden establecer y

retener muy bien las memorias de largo término adquiridas en una etapa posterior [a los 13-16 días de edad (Fig. 3.4, 3.5, 3.6)]. Entonces, si bien las entradas olfativas durante la primera semana de vida parece ser importante para mejorar las habilidades cognitivas a los 9-12 días, no lo serían a edades mayores. Por otro lado, mostramos que los cambios que mejoran la retención en individuos de 9-12 días de edad son generados en su mayoría por procesos asociativos (Fig. 5.2c, 5.2d, 5.2e y 5.2f).

6.5 La identidad del olor en las experiencias olfativas tempranas

La identidad de un olor está determinada por un conjunto de características físico-químicas que le otorgan propiedades particulares. Entre ellas el grupo funcional del compuesto (átomo o grupo de átomos unidos de manera característica y que determinan, en mayor o menor medida, las propiedades del compuesto en el que están presentes), el largo de la cadena carbonada y su concentración parecen ser las más relevantes para que las abejas puedan diferenciar a los olores como distintos. Se sabe por ejemplo que en algunos olores un aumento en la concentración puede inducir diferencias perceptuales entre distintas intensidades, llevando incluso a diferencias cualitativas entre patrones de activación glomerular (Sachse y Galizia, 2003). En concordancia con esta observación, en el capítulo 4 vimos que los efectos sobre la actividad general del LA y el número de glomérulos reclutados solo fueron significativos cuando las respuestas se evaluaron a mayor concentración (1 / 1). Estas diferencias podrían corresponder a la activación de distintas combinaciones de receptores ante dos concentraciones distintas de un mismo olor (Firestein, 2001). Por otro lado una respuesta opto fisiológica más clara frente a la concentración alta podría indicar que dicha concentración es percibida como más similar a la aprendida durante el condicionamiento.

Independientemente de la intensidad en la que se presentan los estímulos olfativos,

los animales pueden presentar niveles de respuesta muy distintos según su sensibilidad frente al olor. A lo largo de nuestras series experimentales observamos asimetrías en los niveles de respuestas evocadas por Linalool (LIO) y Fenilacetaldhido. Ya sea cuando estudiamos las preferencias recolectoras de abejas estimuladas dentro del nido (2.3.1), la retención (3.3.2) o la resistencia a la extinción (4.3.1) de memorias tempranas adquiridas bajo condiciones controladas de laboratorio, las respuestas condicionadas evocadas por LIO fueron siempre mayores que las obtenidas para el otro olor. Estas asimetrías ya habían sido reportadas en la abeja *Apis mellifera* (Sandoz et al., 2000) pero también en la polilla *Manduca sexta* (Daly et al., 2001) y en abejorros *Bombus terrestris* (Laloi et al., 2004), sugiriendo una mayor sensibilidad del sistema olfativo frente a este compuesto debido al significado innato que reviste para estos insectos (también vea tabla 2.1).

En este sentido, las teorías recientes del aprendizaje asociativo (Rescorla y Wagner, 1972; Sutton y Barto, 1990) hacen referencia a la importancia o “saliencia” de un estímulo como una característica constante e independiente de la experiencia del animal que determina la velocidad con la que el estímulo pueda ser asociado a recompensa. Las diferentes encontradas entre LIO y PHE podrían entonces estar determinadas periféricamente por la afinidad, distribución o abundancia de receptores lo que favorecería su adquisición y en consecuencia una mejor retención (Skiri et al., 2005).

La longitud o forma de la cadena carbonada y el grupo funcional del compuesto son importantes para codificar e identificar olores en el sistema olfativo, características que afecta drásticamente la generalización entre estímulos (Smith y Menzel, 1989; Daly y Smith, 2000). La generalización, un característica que exhiben casi todos los seres vivos y les permite tratar a estímulos parecidos pero distintos como equivalente, también tiene su correlato fisiológico en los patrones de actividad glomerular del LA (lóbulo antenal, Guerrieri et al., 2005) en donde se ve que los olores con alto grado de generalización muestran a su vez patrones de actividad neuronal muy semejantes entre sí, es decir con

regiones de actividad muy solapadas. Vale remarcar que a diferencia de las respuestas de generalización a corto término encontradas en estudios previos (por ej. Guerrieri et al., 2005) en el capítulo 4 observamos respuestas de generalización que se extendieron por 9-12 días. Utilizando técnicas que nos permitieron observar cambios en la concentración intracelular de Ca^{++} pudimos mostrar que la generalización observada en comportamiento era además consistente con cambios en la actividad neuronal registrados en el LA. Estos cambios fueron más evidentes en aquellas abejas con experiencias precoces, los patrones de actividad glomerular entre olores que compartían cadenas de 9 carbonos se asemejaron más luego de que uno de ellos fuese asociado a recompensa o por el contrario, se hicieron más disímil si el olor condicionado y el evaluado no compartían características en común.

Siguiendo esta línea de pensamiento, las experiencias olfativas permitirían discriminar mejor olores bien distintos (es decir olores que no comparten características) de lo que lo harían abejas que no experimentaron ese olor (4.3.1). Por el contrario, olores semejantes al aprendido podrían ser confundidos con mayor facilidad. La habilidad de discriminar o generalizar estímulos tendría su base en que los animales puedan aumentar el rango de estímulos útiles para predecir recompensa y separarlos de aquellos que carecen de este valor. En este sentido es posible que los aromas de un mismo tipo floral tenga un abanico de variantes dependiendo de la variedad de la inflorescencia o de los factores ambientales en donde crece. Así mismo, y debido a que en general las fragancias florales son mezclas de muchos compuestos con distintas presiones de vapor, es de esperar que el aroma que percibe la abeja estando lejos del parche floral esté compuesto por mezclas enriquecida con los compuestos más volátiles mientras que muy cerca de la flor lo esté con aquellos que lo son menos (Raguso, 2001).

6.6 Implicancias

Teniendo en cuenta que los individuos adultos jóvenes son capaces de adquirir información de olores del mismo modo que los de mayor edad (Fig. 3.3), resulta muy interesante observar que bajo las distintas condiciones experimentales recreadas en este estudio, las abejas fueron capaces de retener información de olores desde los 4 ó 5 días de vida después de la eclosión del imago (Fig. 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 y 5.2) pero rara vez antes (Fig. 3.5A). No obstante, las memorias establecidas durante los primeros días de vida adulta (1-4 días) pueden modificar las habilidades posteriores de retener memorias (Fig. 5.2). De acuerdo con esta observación es posible ver que aunque las memorias establecidas inmediatamente después de emerger no puedan ser cuantificadas a edades forrajeras, estas juegan un rol importante en la maduración del sistema olfativo de la abeja.

Es importante destacar que a lo largo de esta Tesis las experiencias olfativas fueron ofrecidas y los efectos causados por las mismas evaluados, en un mismo estadio del insecto: el estadio adulto. A diferencia de lo encontrado en otros insectos no sociales que exhibieron habilidades para recordar compuestos volátiles a edades adultas luego de ser experimentados en etapas pre-imaginales, nuestros experimentos demostraron que la abeja presenta una gran plasticidad dentro de un mismo estadio. Desde el punto de vista fisiológico, los cambios drásticos que ocurren durante la metamorfosis en la reorganización de los circuitos neuronales y en particular de los olfativos, podrían ser la clave para que cierto tipo de información adquirida en estadios tempranos “sobreviva” hasta estadios siguientes. Es intuitivo pensar que en insectos con crecimientos discretos los cambios se desarrollen fundamentalmente entre estadios y que piezas de información relevantes adquiridas en estadios tempranos puedan ser transferidas a otros de forma que queden almacenados como memorias estables y poco susceptibles de ser interferidas por las claves ambientales. Se observó por ejemplo que las experiencias adquiridas durante la

alimentación en la larva de la polilla *Trichoplusia ni*, influyen las preferencias del adulto durante la búsqueda de sitios de oviposición (Shikano y Isman, 2009). Del mismo modo las larvas de *Manduca sexta* pueden retener información de olores asociados a estímulos aversivos a través de la metamorfosis. Algo similar ocurre en la larva de la avispa parasitoide *Aphidius ervi* cuyas memorias olfativas pueden persistir y modificar las preferencias del adulto al buscar un hospedador (Gutiérrez et al., 2007). Estas observaciones tienen una fuerte implicancia ecológica y evolutiva ya que la retención de memorias olfativas adquiridas en la larva podrían influir en la elección del hospedador o en la selección de hábitat en estos insectos. Aunque no descartamos la posibilidad de que la abeja melífera presente la habilidad de retener información olfativa adquirida en estadios larvales hasta el estadio adulto, sus implicancias ecológicas y evolutivas serían muy distintas a las propuestas para especies solitarias.

En el contexto social de la colmena, la retención de memorias dentro del estadio adulto podría favorecer la coordinación y organización de las tareas recolectoras, haciendo la búsqueda de recursos más eficiente. Dada la complejidad olfativa que existe dentro de una colmena, las abejas jóvenes están constantemente expuestas a aprender olores. Mientras que las recolectoras traen al nido distintos tipos de olores diluidos en el néctar, las obreras más jóvenes son capaces de aprenderlos mientras que el alimento va siendo transferido a las compañeras de la colmena (ver sección 1.4.2). Por otra parte, las abejas dentro de la primer semana de vida, generalmente involucradas en el cuidado de la cría o el procesamiento de alimento (ver también sección 1.4.1), a menudo tienen la oportunidad de aprender diferentes fragancias florales de manera asociativamente al manipular directamente el alimento desde las celdas (Free, 1969). Las memorias así formadas podrían persistir hasta edades recolectoras sesgando las preferencias recolectoras durante los vuelos de forrajeo.

Más aún, el hecho de que bajo ciertas condiciones el aprendizaje asociativo de olores que ocurre algunos días después de emerger sea importante para mejorar la retención de memorias adquiridas a edades intermedias (Fig. 5.2) también es relevante en el contexto de la colmena. Los eventos de aprendizaje que tienen lugar algunos días después de la eclosión (5-8 días de vida adulta) podrían “preparar” a las obreras jóvenes para desempeñarse en las tareas que siguen, generalmente más complejas y que requieren mejores habilidades cognitivas para ser realizadas de forma eficiente. Los estímulos olfativos aprendidos precozmente (principalmente en el contexto apetitivo) podrían entonces favorecer la maduración del sistema olfativo, permitiendo que abejas que aún no se desempeñan como recolectoras (abejas de 9-12 días) puedan anticiparse a realizarlo si las condiciones del nido lo requieren.

Aunque los efectos a largo término a escala colectiva no han sido estudiados aún, la posibilidad de que exista información “global” accesible a todas las abejas del nido (y no solo a las encargadas de recolectar; Grüter et al., 2006) sumado a la capacidad de abejas jóvenes de retener información de olores hasta edades forrajeras puede ser muy importante para entender las bases de la organización de la recolección de néctar. En este marco es plausible incorporar en la discusión si realmente existen abejas “reclutadas” (ver sección 1.4.2), las cuales se suponen que son “naïves” para cualquier tipo de información relativa a alimento descubierto. La posibilidad de que bajo ciertas circunstancias en donde una misma floración se extiende por más de una generación de abejas las obreras cuenten con información específica de las fuentes a explotar incluso antes de ser advertidas por las forrajeras exitosas, representaría una ventaja importante para facilitar e incluso activar de forma dirigida la recolección hacia ese recurso.

Por otro lado, el hecho de que los olores predominantes puedan cambiar periódicamente como resultado de la modificación de las distintas especies florales en el

exterior, es factible que la presencia de distintos grupos de recolectoras con preferencias diferentes frente a los olores del ambiente coexistan en la colonia aumentando las posibilidades de la colonia de responder eficientemente ante cambios repentinos en la disponibilidad de flores. Distintas entradas de alimento aromatizado podrían conformar abejas obreras con distinta predisposición de responder y ser reclutadas dependiendo de las características de la fuente. Este fenómeno permitiría, entre otras cosas, que la recolección se organice en base a distintos grupos “especializados” en la recolección de determinados tipos florales. Estos sesgos en las preferencias por responder a un determinado estímulo no serían estrictamente específicos para el olor aprendido, ya que observamos efectos de generalización a muy largo plazo frente a olores novedosos pero similares (por ej. Fig. 4.2). Esto permitiría que un determinado grupo de obreras no se encuentre circunscrito a un único tipo floral sino a un conjunto con características comunes.

Luego de mostrar que las memorias olfativas que se adquieren en las primeras etapas de la vida adulta de un insecto pueden guiar el comportamiento varios días después del aprendizaje, y que estos recuerdos pueden vincularse a la modificación de la actividad neuronal en el cerebro, la abeja ofrece una nueva perspectiva para estudiar la ontogenia del aprendizaje y la memoria así como sus efectos a escala colectiva al formarse información social que puede persistir a largo término dentro de estas numerosas sociedades animales.

7

Referencias

- Ashraf, S.I., McLoon, A.L., Sclarsic, S.M., Kunes S.N. (2006) Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell*, 124: 191-205.
- Balsam, P.D. (1985) The function of context in learning and performances. En: *Context and Learning* (Ed. by P. D. Balsam y A. Tomie), pp. 1–22. Hillsdale, New Jersey: L. Erlbaum.
- Bazhenov, M., Stopfer, M., Sejnowski, T.J., Laurent, G. (2005) Fast odor learning improves reliability of odor responses in the locust antennal lobe. *Neuron*, 46: 483-492.
- Beckers, R., Lachaud, J.P., Fresneau, D. (1994) The influence of olfactory conditioning on food preference in the ant *Lasius niger* (L.) *Ethology Ecology and Evolution* 6 (2): 159-167
- Beekman M. (2005) How long will honey bees (*Apis mellifera* L.) be stimulated by scent to revisit past-profitable forage sites? *J. Comp. Physiol. A* 191: 1115-1120
- Beggs, K.T., Glendining, K.A., Marechal, N.M., Vergoz, V., Nakamura, I., Slessor, K.N., Mercer, A.R. (2007) Queen pheromone modulates brain dopamine function in worker honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 104: 2460-2464.
- Ben-Shahar Y, Thompson CK, Hartz SM, Smith BH, Robinson GE (2000) Differences in performance on a reversal learning test and division of labor in honey bee colonies. *Anim. Cogn.* 3: 119–125
- Bernays, E.A., Chapman, R.F. (1994) *Host-plant selection by phytophagous insects*. Chapman & Hall, New York
- Bhagavan S, Benatar S, Cobey S, Smith BH (1994) Effect of genotype but not of age or caste on olfactory learning performance in the honey bee, *Apis mellifera*. *Anim. Behav.*, 48: 1357-1369
- Bhagavan, S., Smith, B.H. (1997) Olfactory conditioning in the honey bee, *Apis mellifera*: Effects of odor intensity *Physiology and Behavior* 61 (1): 107-117
- Bitterman M.E., Menzel R., Fietz A., Schafer S. (1983) Classical-conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Psychol.* 97:107-119

- Bloch G, Sullivan P, Robinson G (2002) Juvenile hormone and circadian locomotor activity in the honey bee *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 48: 1123–1131.
- Blodgett, H. C. (1929) The effect of the introduction of reward upon the maze performance of rats. *Univ. Calif. Publ. Psychol.* 4: 113–134.
- Bowdish, T.I., Bultman, T.L. (1993) Visual cues used by mantids in learning aversion to aposematically colored prey. *Am. Midl. Nat.* 129: 215-222
- Brandon, J.G., Coss, R.G. (1982) Rapid dendritic spine stem shortening during one-trial learning: The Honeybee's first orientation flight *Brain Research* 252 (1): 51-61
- Brown, S.M., Napper, R.M., Mercer, A.R., 2004. Foraging experience, glomerulus volume, and synapse number: a stereological study of the honey bee antennal lobe. *Journal of Neurobiology* 60: 40–50.
- Carew T.J. (2000) *Behavioral Neurobiology: the cellular organization of natural behavior.* Sinauer Associates, Inc. Publishers
- Carlsson, M.A., Galizia, C.G., Hansson, B.S. (2002) Spatial representation of odours in the antennal lobe of the moth *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chem. Senses.* 27: 231-244.
- Caubet, Y., Jaisson, P. Lenoir, A. (1992) Preimaginal induction of adult behaviour in insects. *J. Exp. Psychol. B* 44: 165–178.
- Chabaud, M.A., Devaud J.M., Pham-Delègue M., Preat T., Kaiser, L. (2006) Olfactory conditioning of proboscis activity in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A* 192: 1335-1348.
- Chandra, S.B. C., Hosler, J.S., Smith, B.H. (2000) Heritable variation for latent inhibition and its correlation to reversal learning in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol. A*, 114: 86–97.
- Chapman, 1998 *The Insects: Structure and Function.* By R.F. Chapman. 770 pp. Cambridge University Press.
- Cinelli, A.R., Hamilton, K.A., Kauer, J.S. (1995) Salamander olfactory bulb neuronal activity observed by video rate, voltage-sensitive dye imaging. III. Spatial and temporal properties of responses evoked by odorant stimulation. *J. Neurophysiol.* 73: 2053–2071.
- Collins, A. (1980) Effect of age on the response to alarm pheromones by caged honeybees. *Ann. Entomol Soc. Am* 73:307–309
- Coopersmith, R., León, M. (1984) Enhanced neural response to familiar olfactory cues. *Science* 4664: 849–851.

- Cornwell-Jones C.A., Velasquez P., Wright E.L., McGaugh J.L. (1988) Early experience influences adult retention of aversively motivated tasks in normal, but not DSP4-treated rats. *Dev. Psychobiol.* 21: 177–185
- Couvillon, P.A., Arakaki, L., Bitterman, M.E. (1997) Intramodal blocking in honeybees. *Animal Learning and Behavior* 25 (3): 277-282.
- Cramer, C.P., Pfister, J.P., Haig, K.A. (1988) Experience during suckling alters later spatial learning. *Dev Psychobiol* 21: 1–24
- Daly, K.C., Smith, B.H. (2000) Associative olfactory learning in the moth *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 203: 2025–2038.
- Daly, K.C., Christensen, T.A., Lei, H., Smith, B.H., Hildebrand, J.G. (2004) Learning modulates the ensemble representations for odors in primary olfactory networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101: 10476-10481
- Davis, M. (1974). Sensitization of the rat startle response by noise. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, 87: 571-581.
- Davis, R.K., Cherry, J., Dauwalder, B., Han, P.L., Skoulakis, E. (1995) The cyclic AMP system and *Drosophila* learning. *Molecular and Cellular Biochemistry* 149-150, 271-278
- Davis, R.L. (1993) Mushroom bodies and *Drosophila* learning. *Neuron* 11 (1): 1-14
- De Belle, J.S., Heisenberg, M. (1994) Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* 263 (5147): 692-695
- DeGrandi-Hoffman, Hagler (2000) The flow of incoming nectar through a honey bee (*Apis mellifera* L.) colony as revealed by a protein marker. *Insectes soc.* 47: 302–306
- Deisig, N., Giurfa, M., Lachnit, H., Sandoz, J.C. (2006) Neural representation of olfactory mixtures in the honeybee antennal lobe. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1161-1174.
- Deisig, N., Lachnit, H. Giurfa M. (2002) The effect of similarity between elemental stimuli and compounds in olfactory patterning discriminations. *Learn. Mem.*, 9: 112–121.
- Dethier, V.G., Solomon, R.L., Turner, L.H. (1965). Sensory input and central excitation and inhibition in the blow fly. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, 60, 303-313.
- Devaud, J.M., Acebes, A., Ramaswami, M. Ferrús, A. (2003) Structural and functional changes in the olfactory pathway of adult *Drosophila* take place at a critical age. *Inc. J Neurobiol* 56, 13–23.
- Devaud, J.M., Masson, C. (1999) Dendritic pattern development of the honeybee antennal lobe neurons: a laser scanning confocal microscopic study. *Journal of Neurobiology* 39: 461–474.

- Distler, P.G., Bausenwein, B., Boeckh, J. (1998) Localization of odorinduced neuronal activity in the antennal lobes of the blowfly *Calliphora vicina*: a [³H] 2-deoxyglucose labeling study. *Brain Res.* 805: 263–266.
- Ditzen, M., Evers, J.F., Galizia, C.G. (2003) Odor similarity does not influence the time needed for odor processing. *Chem. Senses* 28: 781–789.
- Dornhaus A., Chittka L. (1999) Evolutionary origins of bee dances. *Nature* 401: 38
- Dudai, Y. (1989). *The neurobiology of memory. Concepts, findings, trends.* New York: Oxford Univ. Press.
- Durst, C., Eichmüller, S., Menzel, R. (1994). Development and experience lead to increased volume of subcompartments of the honey bee mushroom body. *Behavioral and Neural Biology* 62: 259–263.
- Erber, J., Masuhr, T., Menzel, R. (1980) Localization of short-term memory in the brain of the bee, *Apis mellifera*. *Physiol. Entomol.* 5: 343–358
- Erber, J., Kierzek, S., Sander, E., Grandy, K (1998) Tactile learning in the honeybee. *J. Comp. Physiol. A* 183: 737–744
- Faber, T., Joerges, J., Menzel, R. (1999) Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nat. Neurosci.* 2: 74–78.
- Fahrbach, S.E., Moore, D., Capaldi, E.A., Farris, S.M., Robinson, G.E., (1998). Experience-expectant plasticity in the mushroom bodies of the honeybee. *Learn. Mem.* 5: 115–123.
- Farina, W.M., Grüter, C., Acosta, L.E., McCabe, S. (2007) Honeybees learn floral odors while receiving nectar from foragers within the hive. *Naturwissenschaften* 94: 55–60
- Farina, W.M., Grüter, C., Diaz, P.C. (2005) Social learning of floral odours within the honeybee hive. *Proc. R. Soc. B* 272: 1923–1928
- Farris, S.M., Robinson, G.E., Fahrbach, S.E. (2001) Experience- and age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. *J. Neurosci.* 21(16): 6395–6404
- Ferguson, H., Cobey, S., Smith, B.H. (2001) Sensitivity to a change in reward is heritable in the honeybee, *Apis mellifera*. *Anim Behav* 61: 527–534
- Firestein, S. (2001) How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413 (6852): 211–218
- Free, J.B. (1958) Attempts to condition bees to visit selected crops. *Bee World* 39 (9): 221–230

- Friedrich, R.W., Korsching, S.I. (1997) Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb visualized by optical imaging. *Neuron* 18: 737–752.
- Frisch K. von (1923) Über die "Sprache" der Bienen. *Zool Jahrb (Zoologie und Physiologie)* 40: 1-186
- Frisch K. von (1967) The dance language and orientation of bees. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Fuch, E., Dustmann, H., Stadler, H., Schürmann, F.W. (1989) Neuroactive compounds in the brain of the honeybee during imaginal life. *Comp. Biochem. Physiol.* 92C: 337.
- Galizia, C.G., McIlwrath, S.L., Menzel, R. (1999a) A digital three-dimensional atlas of the honeybee AL based on optical sections acquired using confocal microscopy. *Cell Tissue Res.* 295: 383–394.
- Galizia, C.G., Joerges, J., Kuttner, A., Faber, T., Menzel, R. (1997) A semi-in vivo preparation for optical recording of the insect brain. *J. Neurosci. Meth.* 76: 61–69.
- Galizia, C.G., Nägler, K., Hölldobler, B., Menzel, R. (1998) Odour coding is bilaterally symmetrical in the AL of honeybees (*Apis mellifera*). *Eur. J. Neurosci.* 10, 2964–2974.
- Galizia, C.G., Sachse, S., Rappert, A., Menzel, R. (1999b) The glomerular code for odor representation is species specific in the honeybee *Apis mellifera*. *Nat. Neurosci.*, 2, 473–478.
- Galizia, C.G., Vetter, R. (2005) Optical methods for analyzing odor-evoked activity in the insect brain. In: *Advances in Insect Sensory Neuroscience* (Christensen TA, ed), pp 349–392. Boca Raton, FL: CRC.
- Gascuel, J., Masson, C. (1991). Developmental study of afferented and deafferented bee antennal lobes. *J. Neurobiol.*, 22: 795-810.
- Gerber, B., Wüstenberg, D., Schütz, A., Menzel, R. (1998) Temporal determinants of olfactory long-term retention in honeybee classical conditioning: nonmonotonous effects of the training trial interval. *Neurobiol. Learn Mem.* 69:71–78
- Gerber, B., Geberzahn, N., Hellstern, F., Klein, J., Kowalksy, O., Wüstenberg, D., Menzel, R. (1996) Honey bees transfer olfactory memories established during flower visits to a proboscis extension paradigm in the laboratory. *Anim. Behav.*, 52, 1079–1085
- Gil M., De Marco R.J. (2005) Olfactory learning by means of trophallaxis in *Apis mellifera*. *J. Exp. Biol.* 208: 671-680
- Giurfa, M. (2003) Cognitive neurothology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Curr. Opin Neurobiol.* 13: 726-735
- Giurfa, M. (2004) Conditioning procedure and color discrimination in the honeybee *Apis mellifera*. *Naturwissenschaften* 91: 228–231.

- Giurfa, M. (2007) Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: A taste from the magic well. *J. Comp. Physiol A* 193 (8): 801-824
- Gong, Z.F., Xia S.Z., Liu L., Feng C.H., Guo A.K. (1998) Operant visual learning and memory in *Drosophila* mutants dunce, amnesiac and radish. *J. Insect. Physiol.* 44 (12): 1149-1158
- Goodman, C.S., Shatz C.J. (1993) Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 72/Neuron 10 (Suppl), 77-98.
- Gould, J. L. (1993). Ethological and comparative perspectives on honey bee learning. En: *Insect Learning* (Ed. by D. R. Papaj y A. C. Lewis), pp. 18-50. New York: Chapman y Hall.
- Gronenberg, W., Heeren, S., Hölldobler, B., (1996). Age-dependent and task-related morphological changes in the brain and the mushroom bodies of the ant *Camponotus floridanus*. *J. Exp. Biol.* 199: 2011-2019.
- Groves, P.M., Lee, D., Thompson, R.F. (1969). Effects of stimulus frequency and intensity on habituation and sensitization in acute spinal cat. *Physiology and Behavior*, 4: 383-388.
- Grüter, C., Acosta L.E., Farina W.M. (2006) Propagation of olfactory information within the honeybee hive. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 60: 707-715
- Grüter, C., Farina, W.M. (2009) The honeybee waggle dance: can we follow the steps? *Trends in Ecology and Evolution* 24 (5): 242-247.
- Gschanes, A., Eggenreich U., Windisch M., Crailsheim K. (1998) Early postnatal stimulation influences passive avoidance behaviour of adult rats. *Behav. Brain Res.* 93: 91-98
- Guerrieri, F., Schubert, M., Sandoz, J.C., Giurfa, M. (2005) Perceptual and neural olfactory similarity in honeybees. *PLoS Biol.*, 3, e60.
- Gutiérrez-Ibáñez, C., Villagra, C.A., Niemeyer, H.M. (2007) Pre-pupation behaviour of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Haliday) and its consequences for pre-imaginal learning. *Naturwissenschaften* 94: 595-600.
- Hammer, M. (1993) An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366: 59-63
- Hammer, M., Menzel, R. (1995) Learning and memory in the honeybee. *J. Neurosci.* 15 (3): 1617-1630
- Hammer, M., Menzel, R. (1998) Multiple Sites of Associative Odor Learning as Revealed by Local Brain Microinjections of Octopamine in Honeybees. *Learn. Mem.* 5: 146-156
- Hamrick, W.D., Wilson, D.A., Sullivan, R.M. (1993) Neural correlates of memory for odor detection conditioning in adult rats. *Neuroscience Letters* 163: 36-40

- Hansson, B.S. (2002) Spatial representation of odours in the antennal lobe of the moth *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chem. Senses*, 27: 231–244
- Harden Jones, F.R. (1968) Biological aspect of migration *Fish Migration*
- Heil, J.E., Oland, L.A., Lohr, C. (2007) Acetylcholine-mediated axon-glia signaling in the developing insect olfactory system. *Eur. J. Neurosci*, 26: 1227-1241
- Hildebrand, J.G., Shepherd, G.M. (1997) Mechanisms of olfactory discrimination: Converging evidence for common principles across phyla *Annu. Rev. Neurosci.*, 20: 595-631
- Huang, Z.Y., Plettner, E., Robinson, G.E. (1998) Effects of social environment and worker mandibular glands on endocrine-mediated endocrinal behavioral development in honey bees. *J. Comp. Physiol. A* 183: 143-152
- Ichikawa, N., Sasaki, M. (2003) Importance of social stimuli for the development of learning capability in honeybee. *Appl. Entomol. Zool.*, 38: 203-209.
- Immelmann, K. (1969) Zur Wirtsvogelsynchronisation brutschmarotzender Vögel im südlichen Afrika. *Oecologia* 3 (3-4): 401-408
- Iso, H., Simoda, S., Matsuyama, T. (2007) Environmental change during postnatal development alters behaviour, cognitions and neurogenesis of mice. *Behav. Brain Res.* 179: 90–98
- Jandt, J.M., Jeanne, R.L. (2005) German yellowjacket (*Vespula germanica*) foragers use odors inside the nest to find carbohydrate food sources. *Ethology* 111: 641-651
- Jassim, O., Huang, Z.Y., Robinson, G.E. (2000) Juvenile hormone profiles of worker honey bees, *Apis mellifera*, during normal and accelerated behavioural development. *J. Insect Physiol.* 46: 243-249
- Jermy, T. (1986) The role of experience in the host selection of phytophagous insects. En: *Perspectives in Chemoreception and Behavior* (Ed. by R. F. Chapman, E. A. Bernays y J. G. Stoffolano), pp. 143–157. New York: Springer-Verlag.
- Joerges, J., Küttner, A., Galizia, C.G., Menzel, R. (1997) Representations of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature* 387: 285–288.
- Kaissling, K.E. (1974) Sensory Transduction in Insect Olfactory Receptors. *Mosbacher Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie. Biochemistry of Sensory Functions.* L. Jaenicke (ed.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 243-273.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (Eds.) (1992). *Principles of neural science.* New York, Amsterdam, London, Tokyo: Elsevier.

- Kerguelen, V., Cardé, R.T. (1996) Increased host acceptance in experienced females of the parasitoid *Brachymeria intermedia*: Which types of oviposition behaviour contribute to experience? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 78 (1): 95-103
- Knudsen J.T., Tollsten L., Bergstrom L.G. (1993) Floral scents - A checklist of volatile compounds isolated by headspace techniques. *Phytochemistry* 33: 253-280.
- Krasne, F.B., Glanzman, D.L. (1986). Sensitization of the crayfish lateral giant escape reaction. *J. Neurosci.* 6: 1013-1020.
- Kuhl, P.K. (2003). Human speech and birdsong: communication and the social brain. *PNAS* 100: 9645-9646.
- Kuhl, P.K. (2004). Early language acquisition: cracking the speech code. *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 831-843
- Laloi, D., Pham-Delègue, M.H. (2004) Bumble Bees Show Asymmetrical Discrimination Between Two Odors in a Classical Conditioning Procedure. *J. Insect Behav.* 17, 3: 385-396.
- Laloi, D., Gallois, M., Roger, B., Pham-Delègue, M.H. (2001) Changes with age in olfactory conditioning performance of worker honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 32: 231-242
- Laloi, D., Sandoz, J.C., Picard-Nizou, A.L., Marchesi, A., Pouvreau, A., Tasei, J.N., Poppy, G., Pham-Delègue, M.H. (1999). Olfactory conditioning of the proboscis extension in bumble bees. *Entomol. Exp. Appl.* 90: 123-129.
- Lerner, R.L., Gyorgy, T.K., Reagan, J., Roby-Shemkovitz, A., Rybcynski, R., Vogt, R.G. (1990) Peripheral events in moth olfaction. *Chem. Senses* 15: 191-198
- Lewis, A.C. (1993) Learning and the evolution of resources: pollinators and flower morphology. En: *Insect Learning* (Ed.: D.R. Papaj y A. C. Lewis), 219-242. New York: Chapman y Hall.
- Lindauer, M. (1952) Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z vergl Physiol.*, 34: 299-345
- Lodge, D.J., Lawrence, A.J. (2003). The effect of isolation rearing on volitional ethanol consumption and central CCK/dopamine systems in Fawn-Hooded rats. *Behav. Brain Res.* 141: 113-22.
- Lorenz, K. (1935) Der Kumpan in der Umwelt des Vogels. *Zeitschrift für Ornithologie*, 83: 137-213, 289-413
- Lucchetta, P., Bernstein, C., Théry, M., Lazzari, C., Desouhant, E. (2008) Foraging and associative learning of visual signals in a parasitic wasp. *Animal Cognition* 11 (3): 525-533
- Lunney, G.H. (1970) Using analysis of variance with a dichotomous dependent variable: an empirical study. *J. Educ. Meas.* 7: 263-269

- Mackintosh, N.J. (1994) Animal learning and cognition. Academic Press, London, UK.
- Maleszka, J., Barron, A.B., Helliwell, P.G., Maleszka, R. (2009) Effect of age, behaviour and social environment on honey bee brain plasticity. *J. Comp. Physiol. A*, 1-8. En prensa.
- Maleszka, R., Helliwell, P. (2001) Effect of juvenile hormone on short-term olfactory memory in young honeybees (*Apis mellifera*) *Hormones and Behav.* 40: 403–408
- Malun, D., Oland, L.A., Tolbert, L.P. (1994) Uniglomerular projection neurons participate in early development of olfactory glomeruli in the moth *Manduca sexta*. *J. Comp. Neurol.* 350: 1–22.
- Marcus, E.A., Nolen, T.G., Rankin, C.H., Carew, T.J. (1988). Behavioral dissociation of dishabituation, sensitization, and inhibition of *Aplysia*. *Science* 241: 210-213.
- Masson, C., Mustaparta, H. (1990) Chemical information processing in the olfactory system of insects. *Physiol. Rev.* 70: 199–245.
- Masson, C., Arnold, G. (1987) Organization and plasticity of the olfactory system of the honeybee, *Apis mellifera*. En: Menzel R, Mercer A, editors. *Neurobiology and Behavior of Honeybee*. Springer Verlag Berlin Heidelberg. pp. 280-295
- Masson, C., Arnold, G. (1984) Ontogeny, maturation and plasticity of the olfactory system in the worker bee. *J. Insect Physiol.* 30: 7-14
- Masson, C., Pham-Delègue, M.H., Fonta, C., Gascuel, J., Arnold, G., Nicolas, G., Kerszberg, M. (1993) Recent advances in the concept of adaptation to natural odour signals in the honeybee *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 24: 169-194
- Matthews K, Robbins TW (2003) Early experience as a determinant of adult behavioural responses to reward: the effects of repeated maternal separation in the rat. *Neurosci. Biobehav. R.* 27: 45–55
- Mc Cabe, S.I., Hartfelder, K., Santana, W.C., Farina, W.M. (2007). Odor discrimination in classical conditioning of proboscis extension in two stingless bee species in comparison to Africanized honeybee. *J. Comp. Physiol. A* 193: 1089-1099.
- Menzel R. (1968) Das Gedächtnis der Honigbiene für Spektralfarben. I. Kurzzeitiges und langzeitiges Behalten. *Z. vergl. Physiol.* 60: 82-102
- Menzel, R., Erber, J., Masuhr, T. (1974) Learning and memory in the honeybee. *Experimental Analysis of Insect Behaviour*, 195-217
- Menzel, R. (1993) Associative learning in honey bees. *Apidologie* 24 (3): 157-168
- Menzel, R., Durst, C., Erber, J., Eichmüller, S., Hammer, M., Hildebrandt, H., Maelshagen, J., Müller, U., Rosenboom, H., Rybak, J., Schäfer, S., Scheidler, A. (1994). The mushroom bodies in the honeybee: from molecules to behaviour. En: Schildberger K,

Elsner N, editors. Fortschritte der zoologie. Neural basis of behavioral adaptations. Stuttgart: Fischer. P 81–102.

Menzel, R. Müller, U. (1996) Learning and memory in honeybees: From Behavior to Neural Substrates. *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 379-404

Menzel, R. (1999) Memory dynamics in the honeybee. *J. Comp. Physiol. A* 185: 323-340.

Mery, F. (2007) Aging and its differential effects on consolidated memory forms in *Drosophila*. *Exp. Gerontol.* 42: 99–101

Michener, C.D., (2007) The professional development of an entomologist *Annual Review of Entomology* 52: 1-15.

Moore, J. (2001) A neuroscientist's guide to classical conditioning. Springer.

Morgan, S.M., Butz Huryn, V.M., Downes, S.R., Mercer, A.R. (1998) The effects of queenlessness on the maturation of the honey bee olfactory system. *Behav. Brain. Res.* 91: 115–126

Nixon H.L., Ribbands C.R. (1952) Food transmission within the honeybee community. *Proc. R. Soc. B* 140: 43-50

Oitzl, M.S., Workel, J.O., Flutterm, M., Frosch, F., De Kloet, E.R. (2000) Maternal deprivation affects behaviour from youth to senescence: Amplification of individual differences in spatial learning and memory in senescent Brown Norway rats. *Eur. J. Neurosci.* 12 (10): 3771-3780.

Pankiw, T., Page, R. Jr (2003) Effect of pheromones, hormones, and handling on sucrose response thresholds of honey bees (*Apis mellifera* L.) *J. Comp. Physiol. A* 189: 675–684

Papaj DR, Prokopy RJ. (1989). Ecological and evolutionary aspects of learning in phytophagous insects. *Ann. Rev. Entomol.* 34: 315–350.

Pascual, A., Pr at, T.,(2001) Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294 (5544): 1115-1117.

Peele P., Ditzen M., Menzel R., Galizia C. G. (2006) Appetitive odor learning does not change olfactory coding in a subpopulation of honeybee antennal lobe neurons. *J. Comp. Physiol. A* 192: 1083–1103

Pham-Delègue, M.H., Roger, B., Charles, R., Masson, C. (1990) Effet d'une pré-exposition olfactive sur un comportement d'orientation en olfactomètre dynamique a quatre voies chez l'abeille (*Apis mellifera* L.) *Insectes Soc.* 37: 181-187.

Pham-Delègue, M.H., Masson, C., Etievant, P. (1991). Allelochemical mediated forging behaviour: The bee-sunflower model. In: Goodman LJ, Fisher RC, Editors. *Behaviour and Physiology of Bees*. CAB International, Wallingford. pp. 163-184

- Pinsker, H., Hening, W., Carew, T. J., Kandel, E. R. (1973). Long-term sensitization of a defensive withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science* 182: 1039.
- Prokopy, R.J., Chiou Ling Hsu, Vargas, R.I. (1993) Effect of source and condition of animal excrement on attractiveness to adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) *Environmental Entomology* 22 (2): 453-458.
- Prokopy, R.J., Bergweiler, C., Galarza, L., Schwerin, J. (1994) Prior experience affects the visual ability of *Rhagoletis pomonella* flies (Diptera: Tephritidae) to find host fruit. *Journal of Insect Behavior* 7 (5): 663-677
- Pryce, C.R., Feldon, J. (2003) Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci Biobehav R* 27: 57-71
- Raguso, R.A. (2001) Floral scent, olfaction, and scent-driven foraging behavior. En L. Chittka y J.D. Thomson, editors P 83-105. *Cognitive ecology of pollination; animal behavior and floral evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Raubenheimer, D., Tucker, D. (1997) Associative learning by locusts: Pairing of visual cues with consumption of protein and carbohydrate. *Anim. Behav.* 54 (6): 1449-1459
- Ray, S., Ferneyhough B. (1999) Behavioral development and olfactory learning in the honeybee (*Apis mellifera*). *Dev. Psychobiol.* 34: 21-27
- Ray, S., Ferneyhough, B. (1997) The effects of age on olfactory learning and memory in the honey bee *Apis mellifera*. *NeuroReport* 8: 789-793
- Rescorla, R.A., Durlach, P.J., Grau, J.W. (1985) Context learning in Pavlovian conditioning. In: *Context and Learning* (Ed. by P. D Balsam & A. Tomie), 23-56. Hillsdale, New Jersey: L. Erlbaum.
- Rescorla, R.A.; Wagner, A.R. (1972) A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. In: Black, A. H.; Prokasy, W. F., eds. *Classical conditioning II*. New York: Appleton Century Crofts; 1972: 64-99.
- Ribbands, C.R. (1954) Communication between honeybees. I: the response of crop-attached bees to the scent of their crop. *Proc. R. Soc. A* 29: 141-144
- Robinson, G. (1992) Regulation of division of labor in insect societies. *Ann Rev Entomol* 37, 637-665
- Robinson, G., Vargo, E. (1997) Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. *Arch Insect Biochem* 35: 559-583
- Roces, F. (1990) Olfactory conditioning during the recruitment process in a leaf-cutting ant. *Oecologia* 83: 261-262

- Rodrigues, V. (1988) Spatial coding of olfactory information in the AL of *Drosophila melanogaster*. *Brain. Res.*, 453: 299–307
- Rösch, G.A. (1925) Untersuchungen über die Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z. vergl. Physiol.*, 2: 571-631
- Rössler, W., Randolph, P.W., Tolbert, L.P., Hildebrand, J.G. (1999) Axons of olfactory receptor cells of transsexually grafted antennae induce development of sexually dimorphic glomeruli in *Manduca sexta*. *J. Neurobiol.* 38: 521–541.
- Rubin, B.D., Katz, L.C. (1999) Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron*, 23: 499-511.
- Sachse, S., Rappert, A., Galizia, C.G. (1999) The spatial representation of chemical structures in the AL of honeybees: steps towards the olfactory code. *Eur. J. Neurosci.* 11: 3970–3982.
- Sachse, S., Galizia, C.G. (2002) The role of inhibition for temporal and spatial odor representation in olfactory output neurons: a calcium imaging study. *J. Neurophysiol.*, 87, 1106–1117.
- Sachse, S., Galizia, C.G. (2003) The coding of odour-intensity in the honeybee antennal lobe: local computation optimizes odor representation. *Eur. J. Neurosci.*, 18: 2119–2132.
- Sahakian, B.J., Robbins, T.W., Morgan, M.J., Iversen, S.D. (1975) The effects of psychomotor stimulants on stereotypy and locomotor activity in socially deprived and control rats. *Brain Res* 84: 195
- Sandoz, J.C., Laloi, D., Odoux, J.F., Pham-Delègue, M.H. (2000) Olfactory information transfer in the honeybee: Compared efficiency of classical conditioning and early exposure. *Anim. Behav.* 59: 1025–1034
- Sandoz, J.C., Pham- Delègue, M.H., Renou, M., Wadhams, L.J. (2001) Asymmetrical generalisation between pheromonal and floral odours in appetitive olfactory conditioning of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. A* 187: 559–568.
- Sandoz, J.C., Galizia, C.G., Menzel, R. (2003) Side-specific olfactory conditioning leads to more specific odor representation between sides but not within sides in the honeybee antennal lobes. *Neuroscience*, 120: 1137–1148.
- Schäble, S., Poeggel, G., Braun, K., Gruss, M. (2007) Long-term consequences of early experience on adult avoidance learning in female rats: Role of the dopaminergic system. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87: 109–122
- Schacter, D.L., Buckner, R.L. (1998) Priming and the brain. *Neuron* 20: 185-195
- Schneider, D., Steinbrecht, R.A. (1968) Checklist of insect olfactory sensilla. *Symp. Zool. Soc.* 23: 279-297

- Scheiner, R., Page, R.E. Jr, Erber, J. (2001) The Effects of Genotype, Foraging Role, and Sucrose Responsiveness on the Tactile Learning Performance of Honey Bees (*Apis mellifera* L.) *Neurobiol. Learn. Mem.* 76: 138–150
- Schröter, U. Malun, D. (2000) Formation of Antennal Lobe and Mushroom Body Neuropils During Metamorphosis in the Honeybee, *Apis mellifera*. *The Journal of comparative neurology* 422: 229-245.
- Seeley, T.D. (1982) Adaptive significance of the age polytheism schedule in honeybee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 11 (4): 287-293
- Sengpiel, F. (2007) The critical period. *Current Biology* 7, 4: R742-R743
- Shikano, I., Isman, M.B. (2009) A sensitive period for larval gustatory learning influences subsequent oviposition choice by the cabbage looper moth. *Anim. Behav.* 77 (1): 247-251.
- Sigg, D., Thompson, C.M., Mercer, A.R. (1997). Activity-dependent changes to the brain and behavior of the honey bee, *Apis mellifera* (L.). *J. Neurosci.* 17: 7148 –7156.
- Skinner, B.F. (1938) *The behavior of organisms*. Appleton, New York.
- Skiri, H.T., Galizia, C.G. Mustaparta, H. (2005) Representation of Primary Plant Odorants in the Antennal Lobe of the Moth *Heliothis virescens* Using Calcium Imaging. *Chem. Senses* 29: 253–267.
- Smith, B.H. (1993). Merging mechanism and adaptation: An ethological approach to learning and generalization. En Papaj, D. R., y Lewis, A. C. (ed.), *Insect Learning: Ecological and Evolutionary Perspectives*, Chapman and Hall, New York, pp. 126–157.
- Smith, B.H., (1997) An analysis of blocking in binary odorant mixtures: an increase but not a decrease in intensity of reinforcement produces unblocking. *Behavioral Neuroscience* 111: 57–69.
- Smith, B.H., Cobey, S. (1994) The olfactory memory of honey bee, *Apis mellifera*: II. Blocking between odorants in binary mixtures. *J. Exp. Biol.* 195: 91–108.
- Smith, B.H., Menzel, R. (1989) The use of electromyogram recordings to quantify odorant discrimination in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 35: 369–375.
- Snodgrass, R.E (1984) *Anatomy of the Honey bee*. Cornell University Press Ltd., London.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1995) *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, (ed. W. H. Freeman and Co.), 715-724. New York.
- Spivak, M., Masterman, R., Ross, R., Mesce, K.A. (2003). Hygienic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.) and the modulatory role of octopamine. *J. Neurobiol* 55: 341-354
- Squire, Kandel, (1999) *Memory: from mind to molecules*. Scientific American Library.

- Stetter, M., Greve, H., Galizia, C.G., Obermayer, K. (2001) Analysis of calcium imaging signals from the honeybee brain by nonlinear models. *Neuroimage*, 13: 119–128.
- Strambi, C., Cayre, M., Strambi, A. (1999) Neural plasticity in the adult insect brain and its hormonal control. *International Review of Cytology* 190: 137-174.
- Sullivan, R.M., León, M. (1986) Early olfactory learning induces an enhanced olfactory bulb response in young rats *Dev. Brain Res.*, 27, 278-282.
- Sutton, R.S., Barto, A.G., (1990) Time-derivative models of pavlovian reinforcement. *Learning and Computational Neuroscience: Foundations of Adaptive Networks*, M. Gabriel y J. Moore Eds.
- Takeda, K. (1961). Classical conditioned response in the honey bee. *J. Insect Physiol.* 6: 168-179
- Thorpe, W.H. (1939) Further studies on preimaginal conditioning in insects. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 127: 424-433
- Thorpe, W. H. (1963) *Learning and instinct in animals*, 1st edn. London, UK: Methuen.
- Turlings, T.C.J., McCall, P.J., Alborn, H.T., Tumlinson, J.H. (1993) An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to emit chemical signals attractive to parasitic wasps. *Journal of Chemical Ecology* 19 (3): 411-425.
- Uchida, N., Takahashi, Y.K., Tanifuji, M. & Mori, K. (2000) Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nat. Neurosci.*, 3: 1035–1043.
- Vergoz, V., Roussel, E., Sandoz, J.C., Giurfa, M. (2007) Aversive learning in honeybees revealed by the olfactory conditioning of the sting extension reflex. *PLoS ONE* 2(3): e288.
- van den Berg, M.J., Ziegelberger, G. (1991) On the function of the pheromone binding protein in the olfactory hairs of *Antheraea polyphemus*. *J. Insect Physiol.* 3: 79-85
- Vergoz, V., Schreurs, H.A. & Mercer, A.R. (2007) Queen pheromone blocks aversive learning in young worker bees. *Science*, 317: 384-386.
- von Frisch, K. (1968) The role of dances in recruiting bees to familiar sites. *Anim Behav* 16: 531-533
- Walters, E.T. (1987). Multiple sensory neuronal correlates of site-specific sensitization in *Aplysia*. *Journal of Neuroscience*, 7: 408-417.
- Wang, W.S., Zhang, S., Sato, K., Srinivasan, M.V. (2005) Maturation of odor representation in the honeybee antennal lobe. *J. Insect Physiol.*, 51: 1244–1254.
- Wenner, A.M., Wells, P.H., Johnson, D.L. (1969) Honey bee recruitment to food sources: olfaction or language? *Science* 164: 84–86

- Wiesel, T.N., Hubel, D.H. (1963) Effects of visual deprivation on morphology and physiology of cells in the cat's lateral geniculate body. *J. Neurophysiol.* 26: 978-993.
- Wilson, D.A., León, M. (1988) Noradrenergic modulation of olfactory bulb excitability in the postnatal rat. *Dev. Brain Res.* 42: 69-75
- Wilson, D.A., Sullivan, R.M. (1994) Neurobiology of associative learning in the neonate: Early olfactory learning. *Behav. Neural. Biol.*, 61: 1-18.
- Wilson, E.O. (1971) *The insect societies*. Belknap Press of Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts
- Winnington, A., Napper, R.M., Mercer, A.R. (1996) Structural plasticity of identified glomeruli in the antennal lobes of the adult worker honey bee. *J. Comp. Neurol.* 365: 479-490.
- Winston, M.L. (1987) *Biology of the honey bee*. Harvard University Press, Cambridge.
- Withers, G.S., Fahrbach, S.E., Robinson, G.E. (1993) Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. *Nature* 364 (6434): 238-240.
- Withers, G.S., Fahrbach, S.E., Robinson, G.E. (1995) Effects of experience and juvenile hormone on the organization of the mushroom bodies of honey bees. *Journal of neurobiology* 26 (1): 130-144.
- Woo, C.C., León, M. (1987) Sensitive period for neural and behavioral response development to learned odors *Dev. Brain Res.*, 36: 309-313.
- Wright, G.A., Thomson, M.G.A. & Smith, B.H. (2005) Odour concentration affects odour identity in honeybees. *Proc. R. Soc. B*, 272, 2417-2422.
- Yu, D., Ponomarev, A., Davis, R.L. (2004) Altered representation of the spatial code for odors after olfactory classical conditioning: memory trace formation by synaptic recruitment. *Neuron*, 42: 437-449.
- Zanen, P.O., Carde, R.T. (2001) Learning and the role of host-specific volatiles during in-flight host-finding in the specialist parasitoid *Microplitis croceipes*. *Physiological Entomology* 16 (3): 381-389.
- Zhang, S.W., Lehrer, M., Srinivasan, M.V. (1999) Honeybee memory: Navigation by associative grouping and recall of visual stimuli. *Neurobiology of Learning and Memory* 72 (3): 180-201.
- Ziegelberger, G. (1995) Redox-shift of the pheromone-binding protein in the silkworm *Antheraea polyphemus*. *European Journal of Biochemistry* 232 (3): 706-711.